

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA**

**ESTUDO CLÍNICO-CITOLÓGICO EM OVINOS SADIOS E
PORTADORES DE AFECÇÕES PULMONARES DE
OCORRÊNCIA NATURAL, UTILIZANDO-SE O LAVADO
TRAQUEOBRÔNQUICO COMO AUXÍLIO DIAGNÓSTICO**

JULIO SIMÕES MARCONDES

**BOTUCATU - SP
FEVEREIRO / 2007**

JULIO SIMÕES MARCONDES

**ESTUDO CLÍNICO-CITOLÓGICO EM OVINOS SADIOS E
PORTADORES DE AFECÇÕES PULMONARES DE
OCORRÊNCIA NATURAL, UTILIZANDO-SE O LAVADO
TRAQUEOBRÔNQUICO COMO AUXÍLIO DIAGNÓSTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

BOTUCATU

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Marcondes, Julio Simões.

Estudo clínico-citológico em ovinos sadios e portadores de afecções pulmonares de ocorrência natural, utilizando-se o lavado traqueobrônquico como auxílio diagnóstico / Julio Simões Marcondes. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Assunto CAPES: 50501062

1. Ovino - Doenças - Diagnóstico

CDD 636.30896

Palavras-chave: Afecções respiratórias; Citologia; Ovinos; Lavado traqueobrônquico

JULIO SIMÕES MARCONDES

**ESTUDO CLÍNICO-CITOLÓGICO EM OVINOS PORTADORES DE
AFECÇÕES PULMONARES DE OCORRÊNCIA NATURAL E
SADIOS, UTILIZANDO-SE O LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO
COMO AUXÍLIO DIAGNÓSTICO**

Banca Examinadora:

Roberto Calderon Gonçalves

Alice Maria Melville Paiva Della Libera

Simone Biagio Chiacchio

Botucatu, 22 de fevereiro de 2007

Aos meus pais

Plínio Antônio de Salles Marcondes e Edna Maria Simões Marcondes,

*pelo amor, exemplo de vida, ensinamentos, pela honestidade e coragem,
apoio, carinho, confiança e pelo investimento que sempre me dedicaram sem
nenhuma cobrança;*

Aos meus irmãos

Aline Simões Marcondes e Felipe Simões Marcondes, *pela
maravilhosa convivência, vida de harmonia, amizade, carinho, compreensão,
paz e muito amor que temos e, apesar de todas as dificuldades encontradas,
souberam, de alguma forma, retribuir todo o carinho.*

Ao meu orientador

Roberto Calderon Gonçalves, *pelos ensinamentos, oportunidades,
confiança, companheirismo e amizade que conquistamos ao longo deste
trabalho.*

DEDICO ESSE TRABALHO

Agradecimentos

À **DEUS**,

pela vida, saúde, pelos amigos que colocou em meu caminho, oportunidades que me oferece todos os dias e pela família maravilhosa que tenho.

Ao **Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves** pelo convívio durante os dois anos de residência e dois de mestrado, pelos ensinamentos passados, orientações, pelas nossas conversas e conselhos. Por ter me recebido em sua equipe de trabalho, pelos auxílios e oportunidades que me proporcionou nesses anos de convívio, e principalmente por realizar um sonho. Serei sempre grato.

À minha madrinha **Adélia Morelli**, pelo carinho, incentivo, confiança, auxílios e pelos maravilhosos momentos que passamos em família.

À amiga e “irmã” **Marcela Marcondes Pinto Rodrigues**, pelas primeiras orientações na parte laboratorial deste trabalho, que teve disposição, vontade, e paciência nas orientações e apoio durante o desenvolvimento. Pelo carinho, incentivo, companheirismo e pelos momentos que passamos em Botucatu.

À minha namorada **Marlene Luchini** pelo amor, companheirismo, incentivo, força, confiança e pelo apoio imprescindível na finalização deste trabalho, e momentos que passamos e passaremos juntos.

Ao **Prof. Ass. Dr. Alexandre Secorum Borges** por ter me recebido na clínica de grandes animais durante a residência, pela orientação durante esse período, ensinamentos, convivência e amizade.

Aos **Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio e Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim**, pelos ensinamentos durante a residência, conselhos e sugestões na realização desse trabalho.

Aos professores **Wilson Machado de Souza, Mary Marcondes Feitosa e Francisco Leydson Feitosa**, por me iniciarem na vida acadêmica, orientação, confiança e convívio durante a graduação. E a todos os outros professores que fizeram parte da minha formação.

À professora do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP **Prof. Ass. Dr^a. Noeme Souza Rocha**, pelo apoio que me foi dado, cedendo o laboratório de Citopatologia para que as amostras fossem processadas.

À Prof^a. Ass. Dr^a. **Reneé Laufer Amorim** pela atenção e colaboração cedendo o equipamento para documentação fotográfica das lâminas.

Agradeço a todos os amigos que me ajudaram na realização deste trabalho. Em especial aos amigos **Alfredo Lima, José Maria Russo Júnior (JR), José Charl Noujaim, Caio Burini, Prof. João Ferreira, Sílvia e Giovanna** pelo convívio, carinho e amizade que solidificamos nesses tempos. E todos os outros que me apoiaram nessa trajetória.

Aos colegas de residência e trabalho **José Paes de Oliveira Filho, Éric Pivari Rosa e Letícia Yonezawa** pela convivência e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos residentes **Priscila Fantini e Danilo Ferreira** pelos momentos juntos e cooperações cedidas, e à **Raffaela Teixeira** pelas traduções e auxílios durante a execução deste trabalho.

Ao **Prof. Tit. Dr. Márcio Rubens Graff Kuchembuck e esposa Prof^a Lígia Boretti**, pelos ensinamentos, conselhos, conversas e campanha antitabagista.

Aos funcionários da Clínica de Grandes Animais **Marcos Gouveia (Marcão) e Marcos (Marquinho)**, pela convivência e amizade.

Aos residentes do Serviço de Patologia Veterinária e Ornitopatologia pelo apoio.

À **Cabanha Garantã** e ao seu excelente funcionário Everaldo que nos permitiu visitas e disponibilizou tempo e animais para a execução deste estudo e que sempre nos recebeu muito bem.

Aos demais proprietários que confiaram e permitiram a utilização de seus ovinos na realização deste experimento.

Agradeço a todos funcionários da FMVZ – Botucatu, pelos momentos de convivência, brincadeiras e momentos agradáveis em que nos encontramos, em especial ao **Sr. Irineu Figueira, Mauri Raul, Baio, Negão e Vado** pela amizade e companheirismo durante a residência e pós-graduação.

Ao amigo **Paulo Goizo** pelo auxílio na análise estatística.

Aos colegas **Hélio Rubens de Carvalho Nunes e Adriano Dias** pela atenção, e realização da análise estatística, que não mediram esforços para a colaboração nesta etapa.

Ao **CNPq** pela bolsa concedida durante a realização desse trabalho.

À seção de Pós Graduação de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP – Campus de Botucatu, nas pessoas dos funcionários **Denise A. Fioravante Garcia; Maria Regina T. Forlin, Maria A. Manuel e José Roberto**, por serem sempre atenciosos e prestativos.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Critérios clínicos para a diferenciação dos animais sadios (GS) e dos acometidos de afecção respiratória (GD).	30
TABELA 2	Média (<i>m</i>), mediana (<i>md</i>) e desvios-padrão (<i>s</i>) de parâmetros vitais: temperatura (T°), frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC) dos animais do grupo de animais sadios (GS) e animais com enfermidade respiratória (GD).	43
TABELA 3	Número (<i>n</i>) e porcentagem (%) dos achados clínicos presentes nos animais sadios (GS, <i>n</i> =19) e animais com afecções respiratórias, caracterizando-os em grupo doente (GD, <i>n</i> =23).	44
TABELA 4	Número total de células nucleadas (CN) e hemácias (He) do lavado traqueobrônquico: média (<i>m</i>), desvios-padrão (<i>s</i>) e mediana (<i>md</i>) em ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD).	48
TABELA 5	Média (<i>m</i>), desvios-padrão (<i>s</i>) e mediana (<i>md</i>) da porcentagem de macrófagos (M), células epiteliais cilíndricas (CE), neutrófilos (N), linfócitos (L) e eosinófilos (E) do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD).	50
TABELA 6.	Mediana (<i>md</i>) e Intervalo interquartilico (Iiq) e <i>p</i> valores da comparação entre os grupos sadio e doente com relação às características observadas.	52
TABELA 7	Valores individuais dos parâmetros vitais dos animais do grupo sadio (GS – <i>n</i> = 19).	102
TABELA 8	Valores individuais dos parâmetros vitais dos animais do grupo com afecções respiratórias (GD – <i>n</i> = 23).	103

TABELA 9.	Contagem total de células nucleadas e hemácias do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios (GS – n=19)	104
TABELA 10	Contagem total de células nucleadas e hemácias do lavado traqueobrônquico de ovinos portadores de afecções respiratórias (GD – n=23).	105
TABELA 11	Contagem diferencial de células provenientes de lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios (GS – n=19).	106
TABELA 12	Contagem diferencial de células provenientes de lavado traqueobrônquico de ovinos portadores de afecções respiratórias (GD – n=23).	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Delineamento da constituição dos grupos experimentais	32
FIGURA 2	Material utilizado para realização do lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal em ovinos.	38
FIGURA 3	Contenção e passagem do tubo guia por via nasotraqueal.	38
FIGURA 4	Passagem da sonda de polietileno através da sonda guia siliconizada. Observar a fixação da extremidade da sonda guia e contenção da cabeça do animal.	39
FIGURA 5	Momento da realização da infusão e aspiração da solução injetada para obtenção da amostra.	39
FIGURA 6	Número total de células nucleadas (CN) e hemácias (He) do lavado traqueobrônquico de ovinos dos grupos sadio (GS) e com enfermidade do sistema respiratório (GD).	49
FIGURA 7	Contagem diferencial em porcentagem das células do lavado traqueobrônquico em ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD), apresentada por células.	51
FIGURA 8	Visão panorâmica de células do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios, com predomínio de macrófagos (A) - Shorr (500x), e de portadores de afecções respiratórias, com predomínio de neutrófilos (B) – Giemsa (500x).	54
FIGURA 9	Apresentação das células epiteliais cilíndricas ciliadas em ovinos sadios (A) - Giemsa (500x), e nos portadores de afecções respiratórias, com predomínio destas células desprovidas de cílios (B) – Shorr (500x).	55
FIGURA 10	Aglomerados de células epiteliais cilíndricas ciliadas (A) e presença de células epiteliais cilíndricas ciliadas isoladas ou aos pares (B) – Giemsa (200x).	56

- FIGURA 11.** Neutrófilos íntegros em animal sadio (A) - Giemsa (400x) e neutrófilos com aspecto degenerado, entremeados em matriz eosinofílica (muco) em amostra de animal com broncopneumonia - Giemsa (400x). 57
- FIGURA 12** Predomínio de macrófagos com citoplasma abundante e vacuolizados, nota-se presença de linfócitos (➡) – Shorr (400x). 58
- FIGURA 13** Presença de macrófagos binucleados em ovino com broncopneumonia, notar presença de muco e fagocitose de leucócito no centro- Giemsa (400x). 58
- FIGURA 14** Presença de macrófagos com citoplasma vacuolizados e ao centro macrófago fagocitando bactérias, presentes em amostra de ovinos com broncopneumonia – Giemsa 59 (500x).
- FIGURA 15** Presença de célula epitelial escamosa com presença de bactérias em sua superfície, demonstrando contaminação desta amostra – Giemsa (640x). 59
- FIGURA 16.** Presença de eosinófilos em animal com enfermidade respiratória – Shorr (540x). 60

LISTA DE ABREVIATURAS

To	Tosse
CN	Corrimento nasal
DE	Dispneia expiratória
FTr	Frêmito traqueal
FTo	Frêmito torácico
RTosse	Reflexo de tosse
RLTr ↑	Ruído laringotraqueal aumentado
RTB ↑	Ruído traqueobrônquico
RBBr	Ruído broncobronquiolar rude
AS	Área de silêncio
IE	Inspiração entrecortada
CG	Crepitação grossa
CF	Crepitação fina
RS	Roncos e sibilos
RP	Roce pleural
OPE	Odor expiratório pútrido
T° ↑	Temperatura aumentada
FR ↑	Frequência respiratória aumentada
FC ↑	Frequência cardíaca aumentada
CEC	Célula epitelial cilíndrica
mpm	Movimentos por minuto
bpm	Batimentos por minuto
BAL	Lavado broncoalveolar
LTB	Lavado traqueobrônquico
GS	Grupo Sadio
GD	Grupo de animais com afecção respiratória
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ORVA	Obstrução Recorrente de Vias Aéreas

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Exame Clínico.....	8
2.2 Lavado Traqueobrônquico.....	15
2.3 Células de defesa pulmonar.....	19
2.4 Estudo Citológico do lavado.....	22
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais e amostras.....	29
4.2 Grupos experimentais.....	29
4.3 Colheita do lavado traqueobrônquico.....	33
4.3.1 Sondagem nasotraqueal.....	33
4.4 Processamento da amostra.....	35
4.4.1 Citocentrifugação.....	35
4.4.2 Fixação e coloração do material nas lâminas.....	35
4.5 Estudo citológico.....	36
4.5.1 Contagem total de células.....	36
4.5.2 Contagem diferencial das células.....	36
4.5.3 Análise descritiva.....	36
4.6 Documentação fotográfica.....	37

4.7 Estudo estatístico.....	37
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Estudo clínico dos animais.	42
5.2 Estudo estatístico descritivo dos sinais clínicos.....	45
5.3 Estudo citológico do lavado traqueobrônquico.....	48
6. DISCUSSÃO.....	62
6.1 da Metodologia.....	62
6.2 dos Resultados.....	65
7. CONCLUSÕES.....	77
8. BIBLIOGRAFIA.....	80
APÊNDICE.....	101
TRABALHO CIENTÍFICO.....	108

MARCONDES J. S. **Estudo clínico-citológico em ovinos sadios e portadores de afecções respiratórias de ocorrência natural, utilizando-se o lavado traqueobrônquico como auxílio diagnóstico.** Botucatu, 2007. 107p., Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os estudos das secreções traqueobrônquicas são amplamente utilizados nas pesquisas de condições patológicas pulmonares nas diversas espécies animais, inclusive no homem. Os objetivos desta pesquisa foram a viabilização da técnica de colheita de lavado traqueobrônquico na espécie ovina e o estudo da relação clínico-citológica do lavado de ovinos portadores de afecções respiratórias e clinicamente sadios. Foram utilizados neste estudo 19 ovinos sem sintomatologia respiratória e 23 portadores de enfermidade respiratória com sinais clínicos e envolvimento de vias aéreas, divididos nos respectivos grupos. Após o exame físico foi realizado o lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal. A colheita do lavado foi feita com a inoculação e aspiração de solução fisiológica estéril. As amostras foram processadas citologicamente através de citocentrifugação e coradas pelos métodos Giemsa, Shorr e Gram. Nos animais sadios notou-se predomínio de macrófagos, seguido por células epiteliais cilíndricas, neutrófilos e linfócitos. No grupo de animais doentes notou-se redução no número de macrófagos e aumento da frequência cardíaca. Embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, notou-se tendência ao aumento de neutrófilos nos animais doentes. A técnica estudada mostrou-se eficaz na obtenção de fluidos traqueobrônquicos, por ser de fácil realização por médicos veterinários no campo, pouco dispendiosa, e obter material representativo da região traqueobrônquica.

Palavras chave: ovinos, afecções respiratórias, lavado traqueobrônquico, citologia.

MARCONDES J. S. **Clinical and cytological study in healthy and ovine with natural lung disease, by using the tracheobronchial lavage as support diagnoses.** Botucatu, 2007. 107p., Masters Dissertation - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The studies of the tracheobronchial secretions are very useful in the research of the lung pathological conditions in different animal's species and in humans. The purposes of this research are to enable the collection technique of the tracheobronchial lavage in ovine and the study of the clinical cytology relationship of the lavage in ovines with respiratory disease and clinically healthy. In this study there were used 19 ovines without respiratory symptoms and 23 with respiratory disease with symptoms and airway involvement, separated in respective groups. After physical examination the tracheobronchial lavage was performed by nasotracheal via. The tracheobronchial lavage was performed by injection and aspiration of sterile saline. Cytology of the samples was proceeding by centrifugation and colored by Giemsa, Shorr and Gram methods. In the healthy animals was noted prevalence of macrophages, followed by cylindrical epithelial cells, neutrophils and lymphocytes. In the ill animals group there was reduction in the macrophages and higher heart rate. Despite there was no considerable statistic difference between the analyzed groups, a tendency in the increase of the neutrophils number in the ill group was noted. The evaluated technical showed itself to be efficient to obtain tracheobronchial fluid, considering its easy proceeding by veterinarians in the field, no expensive and obtaining representative volume of the samples from the tracheobronchial region.

Key words: ovine, respiratory disease, tracheobronchial lavage and cytology.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira registra expressivo crescimento. Atualmente cerca de 15 milhões de ovinos em todo o país, sendo que no estado de São Paulo estão cerca de 300 mil ovinos, segundo dados do IBGE (2006) e da Associação Paulista dos Criadores de Ovinos (ASPACO), com grande concentração na região de Botucatu e São Manuel.

Dessa forma, as atividades vêm crescendo nos últimos anos no Estado de São Paulo, tanto pelo aumento efetivo dos rebanhos quanto pelo incremento do número de propriedades rurais destinadas à atividade. O rebanho de caprinos e ovinos em 1996 era de 64,9 mil e 257,4 mil cabeças, respectivamente. Em 2005, passou a 82,1 mil cabeças de caprinos (aumento de 26,5%) e 324,7 mil cabeças de ovinos (aumento de 26,1%). Este fato também pode ser confirmado pelo investimento em reprodutores e matrizes de comprovado mérito genético (OJIMA et al., 2006).

Nos últimos anos, a ovinocultura no estado de São Paulo abandonou a condição periférica para constituir-se na principal exploração econômica de muitas propriedades rurais, e já desponta como atividade agropecuária importante no contexto econômico do Estado.

Junto com o crescimento populacional e a intensificação na produtividade, surgiram diversas doenças, principalmente naqueles animais mantidos em sistemas de confinamento. Nestes tipos de criação, o estresse ambiental relacionado à alta taxa de lotação predispõe ao aparecimento de doenças respiratórias. Essas alterações estão entre as principais causas de mortalidade nessa espécie, variando de 10 a 40% nos animais adultos (VIEIRA et al., 1993) e 17% nos jovens (ROOK et al., 1990).

Atualmente, as doenças respiratórias são consideradas sério problema de sanidade apresentando altos índices de morbidade e mortalidade, além das perdas econômicas representadas pela menor conversão alimentar, retardo no ganho de peso e gastos com diagnóstico e tratamento (AL-SULTAN et al. 1988; KIMBERLING, 1988; RAO et al., 1993; DIMRI et al., 1994; MARTIN, 1996). Segundo Martin (1996), a pasteurelose é a enfermidade respiratória que ocasiona maiores prejuízos à indústria ovina.

Dentre as enfermidades respiratórias mais comuns na espécie ovina, relata as de origem bacteriana como *Pasteurella haemolytica*, a pneumonia enzoótica causada pelo *Mycoplasma ovipneumoniae* e as viroses respiratórias, que tem como agentes o vírus da Parainfluenza tipo 3, Adenovírus, Vírus Sincicial Respiratório, Herpes vírus ovino e caprino e a Pneumonia Progressiva Ovina (PPO) causada por um lentivírus não oncogênico da família retroviridae, também, conhecido como maedi (PUGH, 2005).

Tendo em vista a importância desses problemas, faz-se necessário a obtenção de um grande número de informações semiológicas para melhor acurácia diagnóstica, especificamente visando a gravidade do processo para que medidas terapêuticas e profiláticas sejam instituídas prontamente. Com essa finalidade, as secreções traqueobrônquicas estão sendo cada vez mais pesquisadas e associadas ao exame clínico para auxílio diagnóstico, tanto citológico quanto microbiológico das vias aéreas.

Hunninghake et al. (1979), aludem que o lavado broncoalveolar pode ser usado no estudo dos mecanismos inflamatórios e imunes das estruturas alveolares do homem, pois células do sistema imune, células inflamatórias e proteínas relacionadas estão presentes em toda estrutura alveolar e representam o pulmão como um todo.

Nos animais, o estudo das secreções do trato respiratório inferior é utilizado há décadas, tanto na pesquisa, como Górin et al. (1979) avaliando a concentração de classes de imunoglobulinas em compartimentos pulmonares de ovinos, entre outros Corstvet et al., 1982; Saltini et al., 1984; Baughman, et al. 1986; McGorun et al., 1993; Collie et al., 1999; Mori et al., 2001, quanto na prática clínica para o auxílio diagnóstico (DERKSEN et al., 1985; FORGATY & BUCKLEY, 1991; PADRID et al., 1991; VAIL et al.1995; MANSMANN & KING, 1998; SWEEWNEY & BEECH, 1991; GONÇALVES et al. 2004).

Através da técnica de quantificação e análise dos tipos celulares recuperados em amostras do trato respiratório inferior é possível avaliar o grau da lesão das vias aéreas inferiores. Tais informações são usadas no estabelecimento do diagnóstico (GONÇALVES et al., 1990; BARROS et al., 1994; GONÇALVES, 1997), avaliação da intensidade de alveolites e avaliar a efetividade do tratamento (COUËTIL et al., 2001).

Além do diagnóstico pelo exame clínico, o estudo citológico é importante para a determinação etiológica das doenças respiratórias em diversas espécies animais (WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989; GONÇALVES, 1997; GONÇALVES et al., 2004). O aspirado traqueal é freqüentemente usado para auxílio no diagnóstico das alterações do trato respiratório de eqüinos (FORGARTY, 1990), e de bovinos (BARROS et al., 1994; GONÇALVES, 1987).

A lavagem broncoalveolar foi adaptada para uso em eqüinos por Viel (1983), demonstrando boa correlação entre a citologia e a histologia pulmonar nesses animais, sendo um dos métodos mais utilizados (WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989). Atualmente o seu amplo uso é justificado por oferecer diagnóstico rápido e resultados confiáveis. Além deste método de colheita, a sondagem nasotraqueal também é utilizada, com custo menor que a endoscopia e se presta ao estudo citológico do lavado traqueobrônquico em animais de produção (GONÇALVES, 1997).

Nos ovinos, a literatura é escassa (ROLA- LESZCZYNSKI et al., 1981) e não se tem conhecimento de citações nacionais quanto à citologia do aparelho respiratório, com o intuito da caracterização do processo ou como auxílio diagnóstico.

Estudos têm reportado que a citologia do sistema respiratório é extremamente importante na diferenciação entre processos infecciosos, alérgicos, parasitários e neoplásicos além de contribuir significativamente na escolha da terapia (BEECH, 1981).

A utilização da técnica de colheita do lavado traqueobrônquico em ovinos ainda não é explorada. No entanto, como nas outras espécies (GONÇALVES, 1997; FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004), deve ser útil para o diagnóstico e prognóstico de enfermidades do trato respiratório.

Devido à alta ocorrência dos problemas respiratórios nesses animais, faz-se necessário o estudo de um método auxiliar que complemente o diagnóstico clínico, como a citologia, que é, sobretudo um método de baixo custo, fácil aplicação e pouco traumática. A lavagem traqueobrônquica colhida por via nasotraqueal enquadra-se nesse perfil para a espécie ovina.

Considerando-se a importância dos prejuízos causados pelas doenças respiratórias em ovinos e a limitação de informações sobre a citologia de vias aéreas desta espécie no Brasil, o presente estudo procurou estabelecer uma metodologia adequada à espécie e correlacionar a sintomatologia clínica e os achados citológicos, através do lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal, em animais sadios e portadores de afecções respiratórias naturalmente acometidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As doenças respiratórias são um dos mais graves problemas de sanidade enfrentados na ovinocultura, tendo como etiologia bactérias, vírus, metazoários e neoplasias (AL-SULTAN et al., 1988; KIMBERLING, 1988; DUNBAR et al., 1990).

As enfermidades respiratórias causadas pela *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* e *Pasteurella multocida* são consideradas as mais importantes doenças respiratórias de origem bacteriana dos ruminantes domésticos, comuns em todas as partes do mundo. Os surtos freqüentemente levam a grandes perdas econômicas, decorrentes de alta mortalidade, taxa de crescimento reduzida, condenação das carcaças nos abatedouros, além dos custos com medicação e mão-de-obra associadas ao tratamento (GILMOUR et al., 1991a; VIANA, 2003).

Atualmente esta doença está ocupando lugar de destaque entre as doenças consideradas emergentes e com grande importância na exploração da pecuária mundial (FIGUEIREDO, 1997). Para uma avaliação paramétrica, a pasteurelose causada por *M. haemolytica* é responsável por 30% das mortes

de bovinos no mundo, com perdas econômicas acima de um bilhão de dólares, somente na América do Norte (GRIFFIN, 1997). Por outro lado, não estão disponíveis as estimativas mundiais sobre as perdas econômicas em ovinos (BROGDEN et al., 1998a), uma vez que muitos surtos não são relatados (MARTIN & AITKEN, 1991), especialmente no Brasil.

Outros agentes, como os vírus Parainfluenza-3 (PI-3) e adenovírus, são considerados os maiores causadores de doenças respiratórias virais em ovinos, sendo mais frequentemente isolado o PI-3 (MARTIN, 1996) que é considerado o agente mais importante para predisposição de pneumonia por *Pasteurella* (PUGH, 2005).

Nas pneumonias verminóticas, o *Dictyocaulus filaria* sabidamente provoca bronquite em ovinos e caprinos, sendo considerado o agente mais patogênico (KIMBERLING, 1988; MANSFIELD et al., 1993; BELKNAP 2005). Belknap (2005), refere o *Muellerius capillaris* como o mais comum e o menos patogênico e *Prostrostrongylus rufescens* com patogenicidade intermediária (MANSFIELD et al., 1993; BOULJIHAD et al., 1995).

Nos últimos anos, os estudos das doenças do trato respiratório de pequenos ruminantes progrediram consideravelmente. Sua etiologia está sendo intensivamente estudada, apesar de que no mundo todo, as publicações sobre ovinos sejam escassas (BROGDEN et al., 1998a).

Para que se possa diagnosticar o processo respiratório com mais acurácia é necessária a obtenção do maior número de dados semiológicos, e a utilização de alguns exames complementares.

2.1 EXAME CLÍNICO

O diagnóstico e o controle das doenças dos animais de produção são dependentes dos resultados do exame clínico dos animais na fazenda e do exame cuidadoso do ambiente e das técnicas de manejo. Isso significa que o médico veterinário deve obter uma história precisa e valiosa já na primeira visita a um animal ou grupo de animais, e conduzir o exame clínico de maneira a fazer um diagnóstico acertivo, de forma que o tratamento e as medidas de controle possam ser instituídos o mais rápido possível (RADOSTITS et al., 2002).

O primeiro passo e o mais importante na abordagem diagnóstica é o exame clínico, sendo que a anamnese é realizada ao longo desse processo, por meio do questionamento do proprietário ou do acompanhante do animal (GONÇALVES, 2004). Uma anamnese bem feita representa 50% do diagnóstico, (GONÇALVES, 2004). Deve ser associada à inspeção, palpação, percussão, auscultação e olfação, métodos semiológicos de diagnóstico que, quando realizados de maneira correta, tornam-se insubstituíveis por quaisquer exames complementares, chegando, o exame clínico, a ser encarado como arte por alguns autores (WILSON, 1992; REBHUN et al., 2000).

Uma anamnese adequadamente obtida deve revelar a ocorrência de problemas respiratórios e diferenciar o caso isolado dos coletivos e, nestas condições, estabelecer os índices de morbidade e de letalidade, e o nível de comprometimento do rebanho (RADOSTITS et al., 2002). Outros pontos importantes são as informações sobre o início do processo, o tempo de evolução e os fatores predisponentes (GARCIA et al., 1996; ANDREWS, 1992a; RIBBLE et al., 1995; RADOSTITS et al., 2002), entre eles, o tipo de habitação (BREEZE, 1985b) e de manejo do rebanho (BEECH, 1991a; PRINGLE, 1992; WILSON & LOFSTEDT, 2006). Informações relacionadas ao início do processo, o tipo e o tempo de evolução auxiliam a verificação da gravidade do caso (GONÇALVES & BARIONI, 2000).

A anamnese do sistema respiratório deve incluir questionamentos quanto à presença de corrimento nasal anormal, tosse, ambiente e tratamento, assim como, espirros, dispnéia e outros sinais respiratórios (GARCIA et al., 1996; GONÇALVES, 2004; WILSON & LOFSTEDT, 2006).

Devem ser levantados fatores estressantes recentes como transporte, cirurgia, manejo extenuante, desmama, participação em exposições (GARCIA et al., 1996; GONÇALVES & BARIONI, 2000; DIFFAY et al., 2005; WILSON & LOFSTEDT, 2006), vacinação, castração, descorna e medicação líquida por via oral são da mesma forma importantes (DIFFAY et al., 2005). Garcia et al., (1996), informam que deve ser pesquisado o estado geral do rebanho, verificando-se as condições de confinamento (lotação, umidade, mistura de animais de idades diferentes). Wilson & Lofstedt (2006), referem que deve-se avaliar o tipo de alojamento ou pastejo, particularmente com respeito ao

espaço aéreo do ambiente, ventilação, sanidade, densidade de ocupação, poeira, sombra e abrigos.

O exame semiológico direcionado deve completar o diagnóstico, confirmando a localização do processo (GONÇAVES & BARIONI, 2000). Em particular, no caso das broncopneumonias, os sinais clínicos devem estar relacionados às vias aéreas baixas ou posteriores (BREEZE, 1985a) e ao parênquima pulmonar.

Já na inspeção do rebanho, a presença de um animal isolado pode ser indício de anormalidade, tendo em vista que os ovinos apresentam instinto gregário muito forte (DIFFAY et al., 2005). A avaliação do animal à distância é fundamental para avaliar o sistema respiratório como parte do exame físico (GONÇALVES, 2004).

Segundo Feitosa (2004), a observação do animal permite ao clínico a obtenção de inúmeras informações úteis ao diagnóstico. As características respiratórias, como atividade respiratória (eupnéia ou dispnéia), ritmo respiratório, tipo respiratório (costoabdominal, predominantemente abdominal ou respiração do tipo costal), a frequência respiratória e a inspeção nasal devem ser avaliadas neste momento (GONÇALVES, 2004). O aumento da frequência respiratória, afastadas as possibilidades de excitação física ou psíquica (STÖBER, 1993), e aumento do esforço respiratório à medida que o animal se movimenta é forte indício de que há enfermidade respiratória com comprometimento das trocas gasosas (RADOSTITS et al., 2002).

A frequência respiratória normal em ovinos em geral varia de 12 a 20 movimentos por minuto (mpm) (RADOSTITS et al., 2002; WILSON & LOFSTEDT, 2006), podendo, segundo Gonçalves (2004), apresentar pequena variação entre ovinos adultos (20 a 30 mpm) e cordeiros (36 a 48 mpm). A temperatura varia de 39 a 40°C para ovinos jovens e 38,5 a 40°C para adultos e a frequência cardíaca para adultos é na faixa de 90 – 115 batimentos por minuto, (FEITOSA, 2004).

São indicativos de alterações do aparelho respiratório a observação de tosse e a resposta positiva ao reflexo de tosse (através do beliscamento ou atrito manual nos primeiros anéis traqueais, ou obliterando temporariamente o ar inalado), traduzindo a presença de irritação da laringe e traquéia (GONÇALVES, 2004), podendo ser uma das manifestações iniciais da doença

(PRINGLE, 1992). Wilson & Lofstedt (2006), definem a tosse como a expulsão súbita, forçada e ruidosa de ar pela glote para a eliminação de muco, partículas e outros materiais da árvore traqueobrônquica.

Segundo Gonçalves (2004), a tosse seca e constante indica alteração inflamatória nas vias aéreas anteriores como nas faringites, laringites e também nas traqueítes, já a tosse úmida ou produtiva está relacionada ao aumento de exsudato broncopulmonar, como nas broncopneumonias, devido à movimentação do líquido pelas vias aéreas através da respiração. O corrimento nasal se relaciona tanto à inflamação local da mucosa (BRYSON et al., 1979; BRYSON, 1985; BELKNAP, 1993; CRANDELL, 1993), quanto à secreção de origem brônquica e pulmonar (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; WILSON & LOFSTEDT, 2006).

O trato respiratório posterior avaliado através da auscultação e percussão, na espécie ovina, deve ser realizada ao longo dos espaços intercostais, delimitados, segundo Garcia et al., (1996), por bordos costais, sendo que o bordo caudal da projeção topográfica do pulmão é delimitado por uma linha que vai da parte dorsal do 11º espaço intercostal até a parte ventral do 5º espaço intercostal, correspondendo grosseiramente à parte torácica indicada pelo olécrano do membro. Desta forma, apenas um terço do gradil costal corresponde à área pulmonar.

Nesta espécie os ruídos respiratórios normais (laringotraqueal, traqueobrônquico, e broncobronquiolar) são mais audíveis em suas respectivas localizações anatômicas, pela proximidade da traquéia com a pele e pouca espessura da parede torácica, no caso dos ruídos traqueobrônquicos e broncobronquiolares, diferentemente dos bovinos. As enfermidades de vias aéreas anteriores quase sempre resultam em aumento do som laringotraqueal. Os ruídos respiratórios normais são mais intensos durante a fase inspiratória, pois nessa fase a respiração é ativa comparada com a expiração que é passiva. Ainda que as alterações auscultatórias sejam discretas, permitem a detecção precoce da doença, facilitando a escolha de outros métodos diagnósticos ou de terapia, em momento oportuno (WILKINS et al., 2006).

O aumento na produção de líquido intersticial inflamatório, decorrente dos processos pneumônicos, conduz melhor o som produzido na respiração ao ouvido do clínico e explica a auscultação de área aumentada do ruído traqueobrônquico e do ruído broncobronquiolar rude nos pulmões (BRAZ, 1981; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993; GONÇALVES, 2004; WILSON & LOFSTELD, 2006). Os ruídos traqueobrônquicos são auscultados sobre o local de produção e acúmulo de efusões: traquéia torácica, área hilar e entroncamento dos brônquios (WILKINS et al., 2006). A área de silêncio indica prejuízo funcional do órgão por obstrução de brônquios, bronquíolos e alvéolos, repletos de exsudato relacionado à inflamação ou a compressões por tumores ou grandes abscessos, que não permitem a passagem do ar naquela área afetada (BRAZ, 1981; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993; GONÇALVES, 2004). Para ser notada, há necessidade de proximidade desta área com a parede torácica (KOTLIKOFF & GILLESPIE, 1984; STÖBER, 1993). Wilkins et al., (2006) associam a ausência de ruídos pulmonares na região ventral à área de efusão pleural, e a ausência de ruídos em regiões dorsais ao pneumotórax.

Segundo Savage (1997) e Wilkins et al. (2006), recentemente foi adotada uma terminologia uniforme e simplificada para ruídos pulmonares anormais, melhorando significativamente a comunicação entre os clínicos de medicina humana e veterinária. Os ruídos anormais foram divididos em ruídos descontínuos (intensamente explosivo), chamado de crepitações; e ruídos contínuos (muitas vezes musical) chamados de sibilos, relacionados a estreitamentos das vias aéreas. Esses termos substituem os mais antigos estertores e roncos, respectivamente, embora o último seja aceito como equivalente a sibilos de baixo timbre (LEHRER, 1990).

A inflamação dos brônquios pode levar à formação de líquido que, dependendo da quantidade e da localização na árvore brônquica, produz sons diferentes à auscultação. Quando a quantidade de líquido, inflamatório ou não, é intensa nos brônquios de maior calibre, manifesta-se a crepitação grossa (GONÇALVES, 2004); a obstrução seqüencial de brônquios de menor calibre leva à inspiração interrompida ou entrecortada (KOTLIKOFF & GILLESPIE, 1984; GONÇALVES, 2004) e, a deposição de líquido em bronquíolos induz à crepitação fina (STÖBER, 1993). Gonçalves (2004) refere-se à crepitação fina

inspiratória como o descolamento das paredes das pequenas vias aéreas preenchidas por líquido ou muco em excesso.

Quando a quantidade de líquido for muito importante e localizada em área próxima à parede torácica, observa-se frêmito torácico à palpação. O acúmulo deste conteúdo líquido na região da traquéia origina o frêmito traqueal (BRAZ, 1981; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993).

A deposição de secreções nas vias aéreas determina modificação no fluxo de ar, provocando vibrações de tons mais graves, denominados roncocal (KOTLIKOFF & GILLESPIE, 1983 e 1984) ou mais agudos, os sibilos (BRAZ, 1981; KOTLIKOFF & GILLESPIE, 1983 e 1984; LEHRER, 1990; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993), que indicam modificações no calibre das vias aéreas, como no caso das bronquites ou bronquiólites (HINCHCLIFF & BYRNE, 1991; STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES, 2004; WILSON & LOFSTEDT, 2006).

Inflamações broncopulmonares mais graves podem se acompanhar de pleurite (RADOSTITS et al., 2002) e o atrito dos folhetos pleurais inflamados determinam o roce pleural à auscultação (ROUDEBUSH, 1982; KOTLIKOFF & GILLESPIE, 1984; CURTIS et al., 1986; LEHRER, 1990; HINCHCLIFF & BYRNE, 1991; STÖBER, 1993). Em processos necrosantes, como nas pneumonias gangrenosas, pode ser notado o odor expiratório pútrido (ANDREWS, 1992a; GONÇALVES & BARIONI, 2000; REBHUN et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002; WILSON & LOFSTEDT, 2006).

O diagnóstico clínico das afecções respiratórias baseia-se na presença de determinados sinais clínicos que, isolados e, principalmente, em associação, demonstram acometimento broncopulmonar e sua gravidade (GONÇALVES, et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002; PUGH, 2005; WILSON & LOFSTEDT, 2006). A associação de sinais respiratórios como corrimento nasal, tosse, a resposta positiva ao reflexo de tosse, presença de dispnéia, e ruídos respiratórios anormais à auscultação são indicativos de manifestação clínica de doença respiratória, merecendo atenção a ambos os segmentos, tanto das vias aéreas anteriores quanto das posteriores.

O corrimento nasal, segundo Diffay et al., (2005), apresenta-se de forma bilateral aquoso e claro sendo relativamente comum em ovinos estabulados em ambientes pouco ventilados, e em regiões onde há considerável oscilação de

temperatura durante o dia. Menos freqüentemente, pode apresentar-se de forma unilateral nos casos de *Oestrus ovis*, tumores nasais ou corpos estranhos. Já uma secreção nasal bilateral purulenta pode indicar infecção do trato respiratório anterior ou posterior.

Ovinos com pneumonia manifestam tosse intermitente, aumento da freqüência respiratória, e podem apresentar dispnéia. Ressalta-se ainda que as pneumonias são mais comuns em animais jovens do que em animais mais velhos (DIFFAY et al, 2005). O predomínio de sinais clínicos como secreção nasal seromucosa a mucopurulenta, estridor, fluxo de ar reduzido, espirros, sacudidas de cabeça, tumefação de seios, se relacionam principalmente a problemas com as vias aéreas anteriores; anorexia, tosse, taquipnéia, dispnéia, auscultação com aumento dos ruídos bronquiais e crepitações, são indícios clínicos de envolvimento pulmonar (BELKNAP, 2005).

Belknap (2005), descreve como afecções principais de vias aéreas anteriores o tumor nasal enzoótico, infestações por *Oestrus ovis*, sinusites de diversas etiologias, faringites ocasionadas por traumatismos com infecção bacteriana secundária, abscessos retrofaríngeos e laringite necrótica por *Fusobacterium necrophorum*. Relacionada às vias aéreas posteriores estão as pneumonias típicas, as atípicas por helmintos e por aspiração; as viroses respiratórias como Parainfluenza tipo 3, Adenovírus e Vírus Sincicial Respiratório Ovino, as pneumonias causadas por Micoplasmas, a adenomatose pulmonar ovina ou carcinoma pulmonar ovino e a pneumonia progressiva ovina ocasionada pelo Maedi-Visna Vírus (MARTIN, 1996; ARAÚJO et al., 2004).

Terra (2006), afirma que o exame clínico de forma completa deve ser realizado sempre, mesmo que a queixa principal seja facilmente identificável. Alguns casos clínicos necessitam de exames complementares para seu esclarecimento diagnóstico (GONÇALVES & BARIONI, 2000).

2.2 LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO

Os métodos que permitem a colheita de amostras de secreções de vias aéreas posteriores vêm merecendo destaque na prática clínica, pois permitem estudo dos constituintes microbiológicos, citológicos, imunológicos e bioquímicos destas amostras.

Dentre os exames, salienta-se o estudo das secreções brônquicas, que obtidas de diferentes formas, possibilita a obtenção de amostras de secreção das vias aéreas inferiores do homem (PECORA, 1959), cães e gatos (HAWKINS & DENICOLA, 1989; PADRID et al, 1991; LOTTI & NIEBAUER, 1992), ovinos (ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1981), bovinos (CORSTVET et al., 1982; GONÇALVES et al., 1990; BARROS et al., 1994; GONÇALVES, 1997) e em eqüinos (MANSMANN & KNIGHT, 1972; SEALS, 1980; BEECH, 1981; WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989; CRANE et al., 1989; SWEENEY et al., 1993; FREEMAN & ROSZEL, 1997; FERNANDES et al., 2000).

Historicamente, a literatura mostra o empenho de vários autores no intuito de viabilizarem a colheita de amostras do trato respiratório inferior. Inicialmente, foi utilizada no homem por Pecora (1959), que utilizou a aspiração traqueal, por via transtraqueal, para colheita de material de vias aéreas inferiores, para cultivo bacteriano. Mansmann & Knight (1972), adaptaram a técnica para uso em eqüinos, e Beech (1975) sugeriu que a citologia do material obtido por aspirado traqueal poderia ser utilizada na avaliação de eqüinos com doenças pulmonares. Desde então vem sendo utilizada rotineiramente na avaliação de cavalos com doenças respiratórias crônicas (WHITWELL & GREET, 1984; BURSH & JENSEN, 1987; COUËTIL et al., 2001).

Várias adaptações da técnica inicial foram desenvolvidas em bovinos, entre elas, a lavagem traqueobrônquica por traqueocentese, com a variante de que o líquido de colheita é injetado a partir da bifurcação traqueal (GONÇALVES, 1987; GONÇALVES et al., 1990; BARROS et al., 1994); a lavagem orotraqueal, com introdução do tubo de colheita por via oral e deposição do líquido na altura da bifurcação traqueal (LE JAN et al., 1980; CORSTVET et al., 1982); a lavagem broncoalveolar às cegas, com introdução

de tubo siliconizado no brônquio para inoculação do líquido (FOGARTY et al., 1983; KIMMAN et al., 1986; LAY et al., 1986; DYER et al., 1989; TAYLOR et al., 1989; SWEENEY & BEECH, 1991; MORI, 2000), e a lavagem broncoalveolar por endoscopia, com o endoscópio alojado no segmento bronquial, sendo o líquido de lavagem aí depositado (HUNNINGHAKE et al., 1979; MARKHAN & WILKIE, 1980; WILKIE & MARKHAN, 1981; FORMAN et al., 1982; PRINGLE et al., 1988; ALLEN et al., 1992 a e b).

O lavado broncoalveolar (BAL) por endoscopia é utilizado como procedimento diagnóstico, pela análise das amostras de secreções brônquicas, acesso à resposta celular nas vias aéreas baixas e às alterações morfológicas (KASTELLO et al., 1979; WILLCOX et al. 1988; SWEENEY & BEECH 1991; CLARK et al. 1995), sendo possível caracterizar e diferenciar o tipo de resposta inflamatória nas doenças pulmonares e na instituição de terapia apropriada (VIEL, 1997).

O BAL é considerado, por alguns autores, como um método seguro e uma ferramenta simples para obtenção de células das vias aéreas inferiores (LAVIOLETTE et al., 1988), por permitir estudos dos elementos bioquímicos, imunológicos e investigações microbiológicas e citopatológicas (FALK et al., 1972; REYNOLDS & NEWBALL, 1974; GÓRIN et al., 1979; HUNNINGHAKE 1979; WHITWELL & GREET, 1984; BURRELS & WILLIAMS, 1987; FORGATY 1990; SWEENWY & BEECH, 1991; PADRID et al, 1991; HOFFMAN et al., 1993; FERNANDES et al 2000). Segundo Sweeney & Beech (1991), pode ser realizados por duas técnicas, a depender da finalidade da amostra, equipamento disponível, e a necessidade de se conhecer exatamente o local da coleta. Os dois métodos básicos são: através de endoscópio flexível ou às cegas, com sonda siliconizada (BAL Cathether, Bivona, Inc., Gary, Indiana.) sem a visualização das estruturas.

A endoscopia permite a visualização dos brônquios principais, obtenção de biopsias da mucosa brônquica ou tecido transbronquial e aspiração de secreções e lavagem de segmentos do trato respiratório posterior, facilitando a colheita de amostras de porções terminais das vias aéreas mais distais e espaços alveolares (MARKHAN & WILKIE, 1980; WILKIE & MARKHAN, 1981; FORMAN et al., 1982; DERKSEN et al., 1985; REYNOLDS, 1987; PRINGLE et

al., 1988; PADRID et al., 1991; SWEENEY & BEECH 1991; ALLEN et al., 1992 a e b; CLARK et al., 1995; HEWSON & VIEL 2002).

É um método dispendioso, pois necessita de equipamentos especializados, nem sempre disponíveis na rotina clínica dos médicos veterinários que trabalham no campo (Gonçalves, 2004).

Em eqüinos, a intubação nasotraqueal às cegas foi empregada no estudo citológico do pulmão, utilizando-se tubo de PVC flexível como guia. No interior deste, introduziu-se um tubo de polipropileno adaptado a uma seringa, pelo qual foram injetadas e aspiradas seis alíquotas de 50 ml de solução fisiológica para colheita do lavado broncoalveolar. Estas amostras, obtidas de bronquíolos e de espaços aéreos terminais, refletem a população celular do epitélio das vias aéreas e do revestimento alveolar (CRISMAN et al., 1992; HOFFMAN & VIEL, 1997; FERNANDES et al., 2000; MORI et al., 2001).

Nos bovinos a intubação nasotraqueal foi utilizada por Gonçalves (1997), que introduziu um tubo guia siliconizado pela narina e o direcionou até a porção mais baixa da traquéia. Por dentro deste tubo guia foi introduzida uma sonda de polietileno onde se fez a infusão de solução fisiológica e aspiração do conteúdo. Esta técnica foi utilizada em bezerros para a realização de estudos citológicos, tendo em vista a possibilidade de contaminação microbiológica do material com secreções do trato respiratório anterior (GONÇALVES et al., 2004).

Nos ovinos, a colheita de material de vias aéreas inferiores tem sido pouco explorada no que diz respeito ao diagnóstico de problemas respiratórios. A principal utilização dessa espécie animal no estudo das secreções broncoalveolares visa o estudo das doenças respiratórias no homem (GÓRIN et al., 1979; ROLA-PLESCZYNSKI et al., 1981; BÉGIN et al., 1983; BOSSÉ et al., 1987; BURRELS & WILLIAMS 1987; MORNEX et al., 1994; BROGDEN et al., 1998b). A maior parte das colheitas foram realizadas em animais de abatedouros ou eutanasiados (MORNEX et al., 1994; BROGDEN et al., 1998b), embora alguns realizaram o experimento com endoscopia (BÉGIN, 1983,) ou por intubação endotraqueal (GÓRIN et al., 1979; BOSSÉ et al., 1987; BURRELS & WILLIAMS 1987).

Como a pneumonia progressiva dos ovinos se assemelha às pneumonias intersticiais por lentivírus no homem, é a doença mais estudada na espécie ovina (CORDIER et al, 1992; LUJÁN et al., 1993; BURRELLS & SUTHERLAND 1994; MORNEX et al., 1994; LEGASTELOIS et al., 1997).

Para o estudo dos processos respiratórios é necessário, às vezes, colheita repetida. Isto poderia influenciar a celularidade do lavado (CLARK et al., 1995). Para esta hipótese, Coliie et al. (1999), estudaram, em ovinos, os efeitos de múltiplos lavados broncoalveolares, em lobo apical direito e lobos selecionados aleatoriamente. Não detectaram alterações celulares significativas ao longo do estudo, exceto na porcentagem de neutrófilos que nas amostras do lobo que se repetiu a amostragem (apical direito), foi mais variável ao longo da pesquisa e maior, quando comparado com a porcentagem dessas células em lobos escolhidos aleatoriamente. Houve uma diminuição de linfócitos no segundo dia do estudo, no entanto, sem alterações estatisticamente significativas.

O estudo das secreções broncoalveolares nesses animais é realizado visando a utilização desta espécie como modelo experimental humano, desde Górin et al., (1979) que estudaram a concentração de classes de imunoglobulinas em subcompartimentos do pulmão de ovinos, Rola-Pleszczynski et al., (1981) e Bégin et al., (1983) que estudaram a patogênese das alveolites ou Bossé et al., (1987) que avaliaram as características celulares e bioquímicas do lavado broncoalveolar de ovinos desafiados com alérgenos e em fase crônica. Ainda, o lavado nesta espécie, foi utilizado para avaliação celular e imunológica comparada entre as técnicas de lavado broncoalveolar, lavado com tubo endotraqueal e lavado total de pulmões de ovinos mortos (BURRELLS & WILLIAMS, 1987).

Outras aplicações desta técnica permitiram estudos biomoleculares, para avaliação de marcadores de inflamação nas vias aéreas de ovinos desafiados com alérgenos (ABRAHAM et al., 1988), pesquisas na detecção de peptídeos aniônicos de antimicrobianos no fluido broncoalveolar e epitélio respiratório (BROGDEN et al., 1998b).

A utilização da técnica de colheita do lavado traqueobrônquico em ovinos, como auxílio diagnóstico, ainda não é explorada e padronizada. No entanto, como nas outras espécies (PADRID et al., 1991; VAIL et al., 1995;

GONÇALVES, 1997; FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004), deve ser útil para o diagnóstico e prognóstico de enfermidades do trato respiratório.

Independente da técnica utilizada e das controvérsias assinaladas, a citologia do lavado traqueobrônquico vem encontrando bastante aceitação no auxílio diagnóstico, não só pela confirmação etiológica e diferenciação prognóstica das broncopneumonias, como também pela relação com achados histopatológicos (LARSON & BUSCH, 1985). A grande vantagem do método é revelar as alterações nas populações celulares envolvidas com os mecanismos pulmonares de defesa, ativadas nos processos inflamatórios (GONÇALVES, 1997).

2.3 CÉLULAS DE DEFESA PULMONAR

Os agentes causadores da broncopneumonia, ao penetrarem no sistema respiratório, quebram as barreiras de defesa do pulmão e desenvolvem a doença. A própria divisão das vias aéreas é fator de proteção, pois além de provocar impacto das partículas agressoras na mucosa brônquica, pela disposição anatômica das vias condutoras de ar (BREEZE, 1985a; WEEKLEY & VEIT, 1995), propicia diminuição da velocidade do ar inalado, facilitando a deposição de tais partículas sobre o muco que recobre as células ciliadas (DIESEL et al., 1991). Estimula-se, então, o mecanismo de limpeza mucociliar e as partículas são eliminadas pelo movimento dos cílios, que direcionam o muco à faringe para que seja deglutido (BREEZE, 1985a; DIXON, 1992).

Conforme a agressão dos agentes patogênicos primários, ou mesmo das infecções bacterianas secundárias, o sistema mucociliar vai sofrendo alterações, culminando com a diminuição do número de células ciliadas (DROMMER et al., 1986).

Nas porções mais distais das vias aéreas e nos alvéolos, as células ciliadas diminuem em número ou estão ausentes, de tal maneira que na junção broncoalveolar e alvéolos, a defesa local é desenvolvida, principalmente, pelos macrófagos alveolares (LEID & POTTER, 1985; LIGGITT, 1985; LOPEZ et al., 1986; DYER et al., 1989; WEEKLEY & VEIT, 1995). São derivados dos monócitos circulantes (COTRAN et al., 1994; WEEKLEY & VEIT, 1995), apesar

de se acreditar que cerca de 70% mantenham-se nos alvéolos por divisão celular (MCGUIRE & BABIUK, 1982; LIGGITT, 1985). Nos lavados pulmonares, os macrófagos alveolares podem se apresentar com apenas um núcleo ou até multinucleados (WHITWELL & GREET, 1984; FREEMAN et al., 1985; SWEENEY et al., 1992a; GONÇALVES 1997; ZINKL, 2002; GONÇALVES et al., 2004), e em resposta à agressão, estas células de defesa podem se juntar, formando células multinucleadas que englobam o agente patogênico (COTRAN et al., 1994). Gonçalves et al., (2004) encontrou em lavado traqueobrônquico de bezerros sadios 61,7% de macrófagos binucleados, cerca de 15,8% de trinucleados e 22,5% de células gigantes.

Se o microrganismo conseguir ultrapassar essas defesas do pulmão, ocorre um processo inflamatório, que provoca algumas modificações no ambiente pulmonar. A inflamação, por si, estimula a descamação celular do epitélio traqueobrônquico (SWEENEY & BEECH, 1991), assim como a presença de histamina em pacientes com asma ocasionando perda de células ciliadas e encurtamento dos cílios (LAITINEN et al., 1985), culminando com a formação do exsudato inflamatório (LIGGITT, 1985; LEID & POTTER, 1985).

São liberados fatores quimiotáxicos, gerados por macrófagos alveolares, por complemento (LEID & POTTER, 1985; LIGGITT, 1985) ou por produtos do ácido araquidônico (LEDWOZYW et al., 1992), oriundos dos tecidos lesados ou do plasma (COTRAN et al., 1994). Estes fatores provocam alteração na permeabilidade dos vasos sanguíneos e atraem células sanguíneas, que irão participar da defesa do órgão. Os neutrófilos são as células que rapidamente respondem aos agentes quimiotáxicos, saindo da microcirculação e penetrando no pulmão (COHEN & ROSSI, 1983; REYNOLDS, 1983; WALKER et al., 1985; LEID & POTTER, 1985). Devido ao rápido e volumoso afluxo destas células ao pulmão e a liberação de mediadores inflamatórios, o acúmulo e ativação dos neutrófilos são fatores capazes de induzir graves lesões ao pulmão (SLOCOMBE et al., 1985; BREIDER et al., 1988; SLOCOMBE et al., 1990; LAPOINTE et al., 1993), pela liberação de produtos tóxicos no ambiente pulmonar (LEDWOZYW & STOLARCZYK, 1991a e b).

Os fatores debilitantes que interferem com o mecanismo normal de limpeza respiratória têm recebido atenção considerável em animais de laboratório e no homem (RADOSTITS et al., 2002). Alguns estudos em grandes

animais mostram que microrganismos como o vírus *Parainfluenza-3* (BRYSON et al., 1983; SLAUSON et al., 1987; BROWN & ANANABA, 1988), o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (FORMAN et al., 1982; BROWN & ANANABA, 1988), o vírus sincicial respiratório bovino e ovino (CASTLEMAN et al., 1985), o vírus da influenza e da rinopneumonite eqüinas (WILLOUGHBY et al., 1992) e a *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (RICHARDS & RENSHAW, 1989; SLOCOMBE et al., 1990), podem reduzir os mecanismos de proteção pulmonar. São descritas destruição dos cílios das células epiteliais cilíndricas ciliadas, com alteração do mecanismo de limpeza mucociliar (BRYSON et al., 1983; CASTLEMAN et al., 1985; WILLOUGHBY et al., 1992; SCOTT, 1994), e redução no número (SLAUSON et al., 1987) e na função de macrófagos (BROWN & ANANABA, 1988) e neutrófilos (MARKHAN & WILKIE, 1980; WALKER et al., 1985; RICHARDS & RENSHAW, 1989; SLOCOMBE et al., 1990).

A redução do número de macrófagos, células primárias da defesa pulmonar, é proporcional à intensidade do processo de agressão ao órgão (ROSZEL et al., 1986; DERKSEN et al., 1989). Bossé et al., (1987) não relataram essa diminuição, no entanto, relataram aumento na celularidade, principalmente no número de neutrófilos e eosinófilos em ovinos desafiados cronicamente com alérgenos oriundos de *Ascaris suum*.

A exposição à fibra de asbestos em ovinos desafiados com altas doses, demonstrou, na biopsia pulmonar, um aumento moderado na celularidade, com presença de alterações patológicas e o infiltrado inflamatório foi predominantemente de macrófagos alveolares, de forma focal e desigualmente distribuídos na amostra. A interface entre o tecido normal e patológico geralmente não era muito bem demarcado. Na citologia do lavado broncoalveolar não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, no entanto, foram notadas alterações nessas amostras anteriormente à instalação de alterações funcionais e morfológicas na histopatologia (Bégin et al., 1983).

2.4 ESTUDO CITOLÓGICO DO LAVADO

A análise citológica do líquido obtido pelo lavado traqueobrônquico é extremamente valiosa na diferenciação dos processos infecciosos, alérgicos, parasitários e neoplásicos. O diagnóstico citológico é realizado pela contagem global e pelos tipos celulares (BEECH, 1981; WHITWELL & GREET, 1984; STÖBER, 1993).

A traquéia e os brônquios são revestidos por células epiteliais pseudo-estratificadas ciliadas, comumente observadas no fluido da traquéia mas não em amostras de fluido broncoalveolar (FERNANDES et al., 2000; BURKHARD et al., 2003). São células alongadas, com núcleo arredondado proeminente e citoplasma basofílico, com cílios na superfície apical, já o epitélio cubóide encontra-se revestindo bronquíolos (BURKHARD et al., 2003).

Segundo Sweeney & Smith (1993) existe variação muito grande do número total de células do lavado traqueobrônquico ou broncoalveolar em equinos, de tal modo que este dado seria de pouco valor para interpretação do caso clínico. Em contrapartida, Sweeney & Beech (1991) relataram aumento de 500 a 5000 células por mililitro no lavado traqueobrônquico de cavalos com doenças respiratórias. Este aumento foi atribuído ao fato de que os animais com problemas em vias aéreas teriam intensa descamação das células que revestem o epitélio e maior afluxo das células de defesa. Apesar disto, os resultados apresentados na literatura mostram grandes variações, talvez porque as técnicas de colheita sejam diferentes (SWEENEY et al., 1992b).

Em cavalos sadios, a lavagem traqueal por via transtraqueal é caracterizada, principalmente, por células epiteliais cilíndricas, ciliadas e não-ciliadas, e macrófagos alveolares. Neutrófilos e linfócitos também podem ser encontrados em pequena quantidade (MANSMANN & KNIGHT, 1972). Na lavagem broncoalveolar a constituição celular difere de modo significativo da transtraqueal, pois os macrófagos representam a maioria das células (BURKHARD ET AL., 2003) e, relativamente, são observadas poucas células epiteliais cilíndricas ciliadas (MAIR et al., 1987; DERKSEN et al., 1989). Gonçalves (1997) e Gonçalves et al., (2004), observaram através do lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal em bezerros clinicamente sadios,

predomínio de macrófagos 77,2%, seguido por 14,9% de células epiteliais, 6,0% de neutrófilos, 1,8% de linfócitos e ausência de eosinófilos.

Os tipos de células predominantes no lavado traqueobrônquico em eqüinos clinicamente sadios são os: macrófagos alveolares (81,52%), seguidos por neutrófilos (8,92%), linfócitos (2,91%), eosinófilos (0,76%), mastócitos (0,15%) e células produtoras de muco e epiteliais cilíndricas 0,23% e 5,51% respectivamente (FERNANDES et al. 2000). A proporção de cada uma delas varia de acordo com a região do trato respiratório analisado, da presença ou não de uma alteração pulmonar, bem como do agente etiológico (BEECH, 1975; CRANE et al., 1989; STÖBER, 1993, SWEENEY & SMITH, 1993; SWEENEY et al., 1993). Fernandes et al., (2000), realizou estudo comparativo dos exames citológicos a partir de amostras de lavado traqueobrônquico (LTB) e broncoalveolar (LBA) com tubo siliconizado e concluíram que não houve diferença nas características morfológicas dos tipos celulares entre as técnicas utilizadas, entretanto concluíram que nas amostras de lavado broncoalveolar, às cegas, o número de macrófagos foi menor e observaram aumento de linfócitos, comparando com o lavado traqueobrônquico por via transtraqueal.

Em eqüinos portadores de Obstrução Recorrente de Vias Aéreas (ORVA) ocorre um aumento dos neutrófilos, mas sem alteração da sua morfologia, pela constante liberação dos mediadores inflamatórios (WHITWELL & GREET, 1984; MAIR et al., 1987; GRANDGUILLOT et al., 1991; DIXON, 1995). Já nas pneumonias verminóticas ocorre um grande aumento na porcentagem de eosinófilos (WHITWELL & GREET, 1984; MAIR et al., 1987).

Os resultados são ainda mais controversos quando, além da técnica empregada na colheita das amostras, são comparados animais sadios e portadores de doenças respiratórias de etiologias variadas. Na ORVA em eqüinos, o lavado broncoalveolar colhido por endoscopia se caracteriza, principalmente, por diminuição da população de macrófagos e linfócitos e aumento significativo da porcentagem de neutrófilos (DERKSEN et al., 1985; NAYLOR et al., 1992; LAPOINTE et al., 1993). Em bovinos portadores de problemas respiratórios em geral, o lavado por endoscopia evidencia diminuição significativa de macrófagos com elevação importante de neutrófilos (FORMAN et al., 1982; ALLEN et al., 1992a e b) e, na mesma espécie, utilizando o lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal, Gonçalves et al.

(2001), evidenciaram diminuição do número de macrófagos e células epiteliais e aumento de neutrófilos e linfócitos em bovinos com broncopneumonia moderada.

Em ovinos, Burrels & Williams (1987), detectaram predomínio de macrófagos, seguido por linfócitos e eosinófilos em lavados broncoalveolares por endoscopia e em lavado total de pulmão de ovinos mortos, sem alterações significativas entre as técnicas na contagem diferencial. No entanto, notaram aumento significativo no número total de células nas amostras obtidas por lavado total. A contagem diferencial não foi realizada nas amostras obtidas por entubação endotraqueal.

Da mesma forma, outros autores (ABRAHAM et al., 1988) realizaram lavado broncoalveolar por endoscopia em animais desafiados com alérgenos de *Ascaris suum*. Encontraram predomínio de macrófagos, linfócitos, células epiteliais, neutrófilos, e eosinófilos anteriormente ao desafio com o alérgeno. Notaram aumento significativo de eosinófilos em animais que apresentaram respostas como broncoconstrição aguda e obstrução bronquial tardia quando comparado com o grupo que apresentou somente broncoconstrição imediata, após oito horas de inoculados. Não notaram diferença nas contagens totais de células por mililitro e na porcentagem de neutrófilos entre esses grupos, atribuindo a eosinofilia à respostas alérgicas pulmonares nessa espécie.

Collie et al. (1999), não encontraram diferenças significativas no número de células totais e na contagem diferencial quando o lavado broncoalveolar foi realizado em colheitas de um mesmo lobo pulmonar ou em colheitas realizadas em lobos pulmonares selecionados aleatoriamente. No entanto, notaram número maior e mais variável, ao longo do estudo, de neutrófilos, em amostras obtidas repetidamente em lobo apical direito quando comparado com os lobos amostrados aleatoriamente.

Durante a análise citológica devem ser observadas, além das contagens totais e diferenciais, as alterações morfológicas celulares, a presença de vacuolizações citoplasmáticas, de bactérias, fungos e muco. O aumento significativo de um tipo celular ou a presença de determinadas alterações morfológicas pode ser indicativo do agente causador da doença respiratória (WHITWHEEL & GREET, 1984), e a contagem diferencial apresenta maior valor diagnóstico do que a contagem total de células (ZINKL, 2002).

Os macrófagos estão presentes nas estruturas alveolares e tornam-se reativos juntamente com a presença de outras células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos em cavalos com doenças em vias aéreas posteriores. As hemácias usualmente estão presentes, porém freqüentemente estão associadas a traumatismos mínimos devido a técnica utilizada (ZINKL, 2002).

Em relação à coloração para a confecção das lâminas, Fernandes et al. (2000) utilizaram a coloração preconizada por Rosenfeld (1947), que permitiu a caracterização e diferenciação dos diversos tipos celulares e estruturas presentes nos lavados. Gonçalves (1997), utilizou Shorr e Giemsa para identificar as células e ver suas características morfológicas, e coloração especial como o Gram para definir a etiologia bacteriana em lavados traqueobrônquicos de bezerros. A coloração de Shorr acentua detalhes nucleares, sendo valiosa na detecção de alterações morfológicas (MEYER, 2003). E tem sido bastante utilizada nas preparações de material do trato respiratório inferior de eqüinos (ZINKL, 2002).

O método de colheita por sondagem nasotraqueal, com tubo auxiliar introduzido próximo à bifurcação da traquéia, além da vantagem de poder ser usado no campo, tem se mostrado eficiente na amostragem celular do lavado traqueobrônquico de bezerros (GONÇALVES et al., 2004).

Destacada a importância da citologia através da sondagem nasotraqueal, por ser um método eficiente e aplicável na rotina para coleta de amostras de vias aéreas inferiores em bezerros por Gonçalves et al. (2004), e a possibilidade do direcionamento etiológico das enfermidades respiratórias através destes achados, é importante o conhecimento citológico das vias aéreas na espécie ovina.

3. OBJETIVOS

Considerando-se a importância das doenças respiratórias nos ovinos e a necessidade de um método diagnóstico complementar de baixo custo e de aplicabilidade prática, são objetivos deste trabalho:

1. Avaliar clinicamente o sistema respiratório de ovinos;
2. Viabilizar a técnica de lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal para colheita de secreções de vias aéreas posteriores;
3. Determinar a proporção celular do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios e com enfermidades respiratórias, comparando-os entre si;
4. Correlacionar os achados clínicos com os achados citológicos entre animais sadios e portadores de afecções respiratórias;
5. Avaliar comparativamente, de forma descritiva, as metodologias de coloração Shorr, Wright-Giemsa e Gram na citologia dos ovinos sadios e doentes;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E AMOSTRAS

Foram incluídos neste estudo 42 ovinos, independentemente de raça, sexo e estação do ano, com idade entre um e quatro anos, selecionados aleatoriamente em fazendas da região de Botucatu-SP e de animais encaminhados ao serviço de Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu.

Através do lavado traqueobrônquico colheu-se amostras de vias aéreas posteriores para exame citológico de animais clinicamente sadios e portadores de afecções do sistema respiratório. As amostras foram processadas no Laboratório de Citopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - campus de Botucatu – SP.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram submetidos a exame clínico geral e físico do aparelho respiratório através da inspeção, palpação, e auscultação para detectar sinais clínicos que caracterizassem afecções respiratórias (Gonçalves, 2004). A presença ou ausência dos critérios apresentados (Tabela 1), na maioria das vezes em associação, estabeleceu ou não o diagnóstico de doença respiratória e diferenciou os animais sadios dos doentes (RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES, 2004; WILSON & LOFSTEDT, 2006) Os dados clínicos obtidos no exame foram anotados em fichas individuais (Apêndice - Quadro A).

As variáveis quantitativas como a frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) e a temperatura corporal (T°C) foram avaliados respectivamente em batimentos por minuto (bpm), movimentos respiratórios por minuto (mpm) e graus centígrados (°C). Definiram-se como valores normais para temperatura corporal entre 38,5 a 40°C, para frequência cardíaca de 90 a 115 bpm e para a frequência respiratória de 20 a 30 mpm (FEITOSA, 2004).

Desta maneira, os animais foram arranjados em dois grupos experimentais:

GS: ovinos clinicamente sadios (n=19).

GD: ovinos com alterações no sistema respiratório (n=23).

Para isso, avaliaram-se os critérios clínicos descritos na forma de esquema (Figura 1).

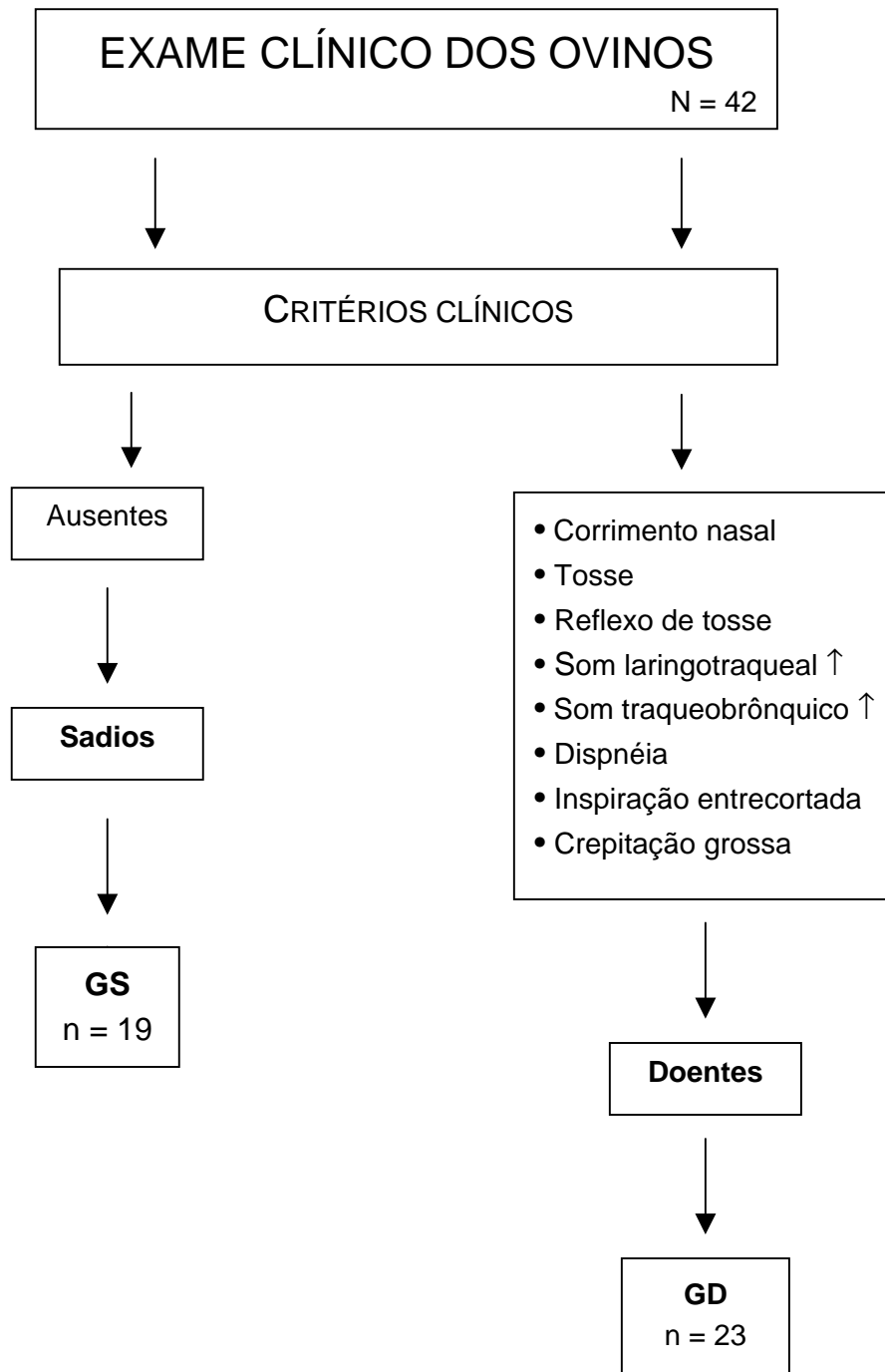


FIGURA 1. Delineamento da constituição dos grupos experimentais.

Definidos os grupos experimentais, foram realizados os estudos estatísticos do exame citológico do lavado traqueobrônquico dos ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD).

Foi realizada análise estatística entre os grupos GS e GD, onde se comparou os parâmetros: parâmetros vitais, contagem total de células nucleadas e hemácias, contagem diferencial e descrição das características morfológicas celulares dos respectivos grupos.

4.3 COLHEITA DO LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO

4.3.1 SONDAGEM NASOTRAQUEAL

Para o procedimento de lavagem traqueobrônquica em ovinos por via nasotraqueal, utilizou-se sonda siliconizada e sonda de polietileno acoplada à agulha hipodérmica sem bisel, solução fisiológica estéril e seringa de plástico com capacidade de 60ml (Figura 2).

Os animais foram submetidos à contenção física em estação, com a cabeça e pescoço estendido e alinhado com a coluna vertebral (Figura 3). Antes da sondagem de cada animal, realizou-se assepsia da área externa das narinas com álcool iodado a 2%.

Após a contenção e assepsia, foi introduzida, por via nasotraqueal, uma sonda guia siliconizada de 65cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro previamente esterilizada e embalada individualmente. Na extremidade desta sonda foi passada lidocaína gel com intuito de lubrificação e redução do desconforto. Após adentrar o vestíbulo nasal, a passagem pelo meato nasal médio e a constatação de que a sonda estava na orofaringe, foi feito um movimento de rotação (180°) com a sonda para direcionar a sua extremidade dorsalmente. Com isso ocorreu o toque da sonda na epiglote e seu direcionamento para a laringe e traquéia. O desconforto, meneios de cabeça, saída de ar pela extremidade da sonda guia, seguida ou não de tosse, foram os sinais indicativos da localização na via aérea. Aguardou-se, a seguir, o momento da inspiração para que a sonda fosse empurrada, sem resistência pela traquéia até a região da carina.

Com a sonda instalada e fixada manualmente (Figura 4), um auxiliar introduziu pela sonda guia uma sonda de polietileno com 85cm de comprimento e 0,3cm de diâmetro, adaptada à uma agulha calibre 30 sem bisel. Foi introduzida até a saída de sua ponta, aproximadamente cinco centímetros, além da extremidade final da sonda guia, produzindo tosse no animal. As sondas eram marcadas individualmente, de tal maneira a saber o quanto fora introduzido.

O conjunto sonda guia siliconizada e sonda de polietileno acoplada à agulha foi previamente esterilizado em óxido de etileno¹. Imediatamente antes da introdução, este conjunto foi lavado com 20 ml de solução salina isotônica estéril comercial, para auxiliar o deslizamento da sonda de polietileno.

Após a sondagem nasotraqueal, as amostras foram colhidas por método de lavagem traqueobrônquica (GONÇALVES et al., 2000). Por meio de uma seringa estéril com capacidade de 60ml, adaptada ao conjunto, foram injetados e imediatamente aspirados de 30 a 50ml de solução salina isotônica comercial estéril e apirogênica, de acordo com o tamanho do animal. Aspirações sucessivas foram realizadas à medida que a sonda foi progressivamente retirada. Após a obtenção de uma amostra, aparentemente, adequada em volume ou aspecto (turvação), o conjunto de sondas foi completamente removido.

O líquido do lavado traqueobrônquico obtido foi acondicionado em tubo de ensaio de polietileno, armazenado em caixa isotérmica com gelo e enviado ao Laboratório de Citopatologia do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP, no tempo máximo de duas horas, para processamento e realização de estudos citológicos.

¹ Oximed Tecnologia em Esterilização Ltda. São José do Rio Preto – SP.

4.4 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

O líquido do lavado traqueobrônquico obtido dos animais clinicamente sadios e portadores de afecção respiratória foi incluído nas seguintes etapas de processamento:

4.4.1 CITOCENTRIFUGAÇÃO

A impressão celular de 6 mm de diâmetro em lâminas histológicas de vidro com extremidade fosca, foi obtida por meio de citocentrifugação² de 200 microlitros do lavado traqueobrônquico a 89g por seis minutos.

4.4.2 FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DO MATERIAL NAS LÂMINAS

Para coloração pelo método de Shorr (OLIVEIRA et al., 2000), as células foram fixadas com solução de álcool etílico a 95%, imediatamente após a citocentrifugação. Para a coloração por Giemsa as lâminas foram secas ao ar ambiente e fixadas com metanol e para o Gram foram secas em estufa a 60°C por 10 minutos (KOSS, 1992).

Depois de fixadas, as lâminas foram coradas pelos métodos propostos e padronizados pelo Laboratório de Citopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP. As colorações de Giemsa e Shorr foram utilizadas para identificar as células, avaliar suas características morfológicas e realizar as contagens diferenciais. As lâminas foram montadas com lamínulas e resina para melhor conservação do material e análises futuras. A técnica de Gram foi empregada na tentativa de se definir a etiologia bacteriana do processo pulmonar.

² Revan Centrifuga Ciclo Cito

4.5 ESTUDO CITOLÓGICO

4.5.1 CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS

Para a contagem total de células, o lavado traqueobrônquico foi acondicionado em tubo de ensaio de polietileno, e homogeneizado em agitador de tubos¹, por 10 segundos. A contagem do número total celular foi realizado em câmara de Neubauer, sem a utilização de corantes. Foram utilizados os nove quadrados da câmara, em analogia com a técnica descrita para contagem de leucócitos. O número total de células encontrado foi multiplicado por 1,1 (fator de correção), fornecendo o número total de células por microlitro de lavado, segundo Coles (1984). Multiplicou-se o valor encontrado por 10^3 para obtenção do valor em células/ml.

4.5.2 CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS

Analisaram-se, para cada animal, número e porcentagem de células epiteliais cilíndricas (CEC), macrófagos (M), neutrófilos (N), linfócitos (L) e eosinófilos (E). Foram contadas, na medida do possível, 400 células em microscópio óptico comum, em aumento de 400 vezes. Nas lâminas que apresentaram muitos aglomerados celulares, a contagem diferencial foi feita, preferencialmente, na periferia.

4.5.3 ANÁLISE DESCRITIVA

Foram anotadas alterações como presença de muco, de partículas estranhas, de neutrófilos degenerados, fagocitose de partículas e ou bactérias, eritro e leucofagocitose, vacuolização dos macrófagos, macrófagos bi e tri-nucleados e número de aglomerados celulares nas amostras.

¹ PHOENIX - Mod. AT 56

4.6 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Foram documentadas, por ilustrações fotográficas, a realização da técnica do lavado traqueobrônquico na espécie ovina e as principais características do estudo citológico do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios e dos portadores de afecções respiratórias. As lâminas foram fotografadas com uma câmera digital Leica DFC acoplada a um microscópio Leica DMLD e procedeu-se a digitalização dos campos e avaliação pelo programa de análises de imagem (Qwin v3.0 Leica).

4.7 ESTUDO ESTATÍSTICO

Para a análise dos resultados citológicos e de parâmetros vitais, utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (ZAR, 1984) com o cálculo da estatística e seus respectivos *p value*. As análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS v.12. Nos casos em que $p < 0,05$, a diferença foi considerada significativa e foram efetuados contrastes entre as medianas dos grupos comparados GS e GD.



FIGURA 2. Material utilizado para realização do lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal em ovinos.



FIGURA 3. Contenção e passagem do tubo guia por via nasotraqueal.



FIGURA 4. Passagem da sonda de polietileno através da sonda guia siliconizada. Observar a fixação da extremidade da sonda guia e contenção da cabeça do animal.



FIGURA 5. Momento da realização da infusão e aspiração da solução injetada para obtenção da amostra.

5. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados nos quadros numerados de 2 e 3, nas tabelas de 2 a 5 e nas figuras de 6 a 16.

O estudo clínico das freqüências dos sinais clínicos dos ovinos sadios e portadores de afecções respiratórias, apresentados na forma de escores para os respectivos sinais, estão nos quadros 2 e 3 e o estudo citológico, representado nas Tabelas 4 e 5 e nas Figuras 6 e 7.

Na tabela 6 estão apresentados os resultados estatísticos, com base no teste da mediana e teste não paramétrico de Mann-Whitney, para as variáveis estudadas.

Nas figuras 8 a 16 estão ilustrados os achados citológicos e alterações na celularidade das amostras de ambos os grupos, GS e GD.

5.1 ESTUDO CLÍNICO DOS ANIMAIS

No grupo sadio (GS), a média da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), frequência respiratória (mpm) e frequência cardíaca (bpm) foram respectivamente de $39,0 \pm 1$, $33,37 \pm 5$ e $88,74 \pm 11$ (Tabela 2), apresentando-se os valores da temperatura e frequência cardíaca, dentro da faixa de normalidade, com discreto aumento da frequência respiratória em três movimentos por minuto acima dos valores considerados normais. A variação do valor da frequência respiratória foi de dois a 16 mpm acima do valor considerado normal (20-30 mpm), apresentado por 52,6% dos animais (10/19). Apesar da média da frequência cardíaca apresentar-se dentro dos padrões normais (90-115 bpm), três animais (15,8%) apresentaram cinco, oito e 28 bpm acima do normal, ou seja, uma média de 13,7 bpm, acima da faixa de normalidade (Tabela 3).

No grupo doente (GD), os valores médios de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), frequência respiratória (mpm) e frequência cardíaca (bpm) foram de $38,8 \pm 0,70$, $36,4 \pm 7,43$ e $96,96 \pm 16,24$, respectivamente (Tabela 2). A variação da frequência respiratória, acima do normal, foi de dois a 22 mpm, apresentada por 15/22 (68,2%) animais deste grupo. A frequência cardíaca aumentada esteve presente em um animal dos 22 deste grupo (Tabela 3), estando em 5bpm acima da normalidade.

Os sinais clínicos, com suas respectivas frequências e porcentagens encontradas nos ovinos sadios (GS n=19) e portadores de afecções respiratórias (GD n=23) estão apresentados na Tabela 3. Nos animais sadios não foram encontrados sinais clínicos característicos de doença respiratória. No entanto, neste grupo foi constatado aumento de frequência respiratória em 10 dos 19 animais (52,6%) e aumento da frequência cardíaca em 15,8%.

A porcentagem dos sinais clínicos presentes nos animais doentes (Tabela 3), caracterizou e os diferenciou em grupo de animais com afecções do sistema respiratório (GD). Corrimento nasal e frequência respiratória aumentada foram os sinais clínicos mais observados, presentes em 65,2% dos animais doentes, segue o ruído traqueobrônquico aumentado e crepitação grossa em 56,5% dos animais, ruído laringotraqueal aumentado em 47,8% e reflexo de tosse em 39,1%. Em proporção intermediária notou-se inspiração entrecortada e tosse

em 26,1% dos animais. Os sinais menos freqüentes, presentes em 4,3%, foram dispnéia mista, aumento da freqüência cardíaca e temperatura.

TABELA 2 Média (m), mediana (md) e desvios-padrão (s) de parâmetros vitais: temperatura (T°), freqüência respiratória (FR) e freqüência cardíaca (FC) dos animais do grupo de animais sadios (GS) e animais com enfermidade respiratória (GD).

	T°			FR			FC		
	m	md	s	M	md	s	m	md	s
GS	39,00	39	1	33,37	32	5	88,74	88	11
GD	38,79	38,8	0,70	36,43	36,00	7,43	96,96	100,00	16,24

TABELA 3. Número (n) e porcentagem (%) dos achados clínicos presentes nos animais sadios (GS, n=19) e animais com afecções respiratórias, caracterizando-os em grupo doente (GD, n=23).

Sinais Clínicos	GS		GD	
	n	%	n	%
Tosse	0	0	6	26,1
Corrimento nasal	0	0	15	65,2
Dispneia mista	0	0	1	4,3
Frêmito traqueal	0	0	0	0
Frêmito torácico	0	0	0	0
Reflexo de tosse	0	0	9	39,1
Ruído laringotraqueal aumentado	0	0	11	47,8
Ruído traqueobrônquico aumentado	0	0	13	56,5
Ruído broncobronquiolar rude	0	0	0	0
Área de silêncio	0	0	0	0
Inspiração entrecortada	0	0	6	26,1
Crepitação grossa	0	0	13	56,5
Crepitação fina	0	0	0	0
Roncos e sibilos	0	0	0	0
Roce pleural	0	0	0	0
Odor expiratório pútrido	0	0	0	0
Temperatura aumentada	0	0	1	4,5
Frequência respiratória aumentada	10	52,6	15	65,2
Frequência cardíaca aumentada	3	15,8	1	4,5
Total de animais	19		23	

5.2. ESTUDO ESTATÍSTICO DESCRITIVO DOS SINAIS CLÍNICOS

Nos Quadros 2 e 3, estão discriminados os escores pontuados em cada animal, a partir dos respectivos sinais clínicos, ausentes (0) e presentes (1), em ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD).

O grupo sadio (Quadro 2) apresentou escore total de 13, devido à presença de 10/13 animais com aumento de frequência respiratória e 3/13 com aumento da frequência cardíaca.

O grupo com problema em vias aéreas (GD) apresentou escore total de 91 (Quadro 4) sendo que as maiores pontuações foram alcançadas pelo corrimento nasal e aumento da frequência respiratória (15), seguidos pelo aumento de ruído traqueobrônquico e crepitação grossa (13), ruído laringotraqueal aumentado (11), reflexo de tosse positivo (9), presença de tosse e inspiração entrecortada (6) e com menor frequência foram notadas a dispnéia mista, aumento de temperatura e frequência cardíaca com um ponto cada (Quadro 3).

Os sinais referentes a frêmito traqueal, frêmito torácico, ruído broncobronquiolar aumentado, área de silêncio, crepitação fina, roncos e sibilos, roce pleural e odor expiratório pútrido, não foram encontrados nos animais acometidos por afecções do sistema respiratório.

Dos 23 animais avaliados, um apresentou escore oito, dois com escore sete, um com escore seis, dois com cinco e quatro animais com pontuação quatro. Nesses animais a associação como: CG, RTB, IE, RLTr ↑, associados entre si ou não, em um mesmo animal, evidenciaram envolvimento pulmonar nesses animais. Houve dois animais com escore cinco e um com escore quatro, no entanto os sinais encontrados eram relacionados à vias aéreas anteriores (Quadro 3). Os demais animais apresentaram escore entre um e dois.

5.3 ESTUDO CITOLÓGICO DO LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO

Na Tabela 4 e na Figura 6 está a contagem do número total de células nucleadas e hemácias do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD). O número médio total de células nucleadas encontradas nos grupos GS e GD foi de $64.650 \pm 49.674,3$ e $184.215,2 \pm 476.122,8$ em células por mililitro, respectivamente. O grupo sadio apresentou média de $24.657,9 \pm 49.167,2$ hemácias e o GD $47.437,0 \pm 153.963,4$ hemácias por mililitro de lavado.

Verificou-se, no grupo GD, aumento tanto do número de células nucleadas quanto no número de hemácias em relação ao grupo GS.

TABELA 4. Número total de células nucleadas (CN) e hemácias (He) do lavado traqueobrônquico: média (*m*), desvios-padrão (*s*), e mediana (*md*) em ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD).

Grupo de animais	Tipo celular	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>md</i>
GS	CN	64.650,00	49.674,3	57.750,0
	He	24.657,9	49.167,2	3.850,0
GD	CN	184.215,2	47.6122,8	71.500,00
	He	47.437,0	153.963,4	3.300,00

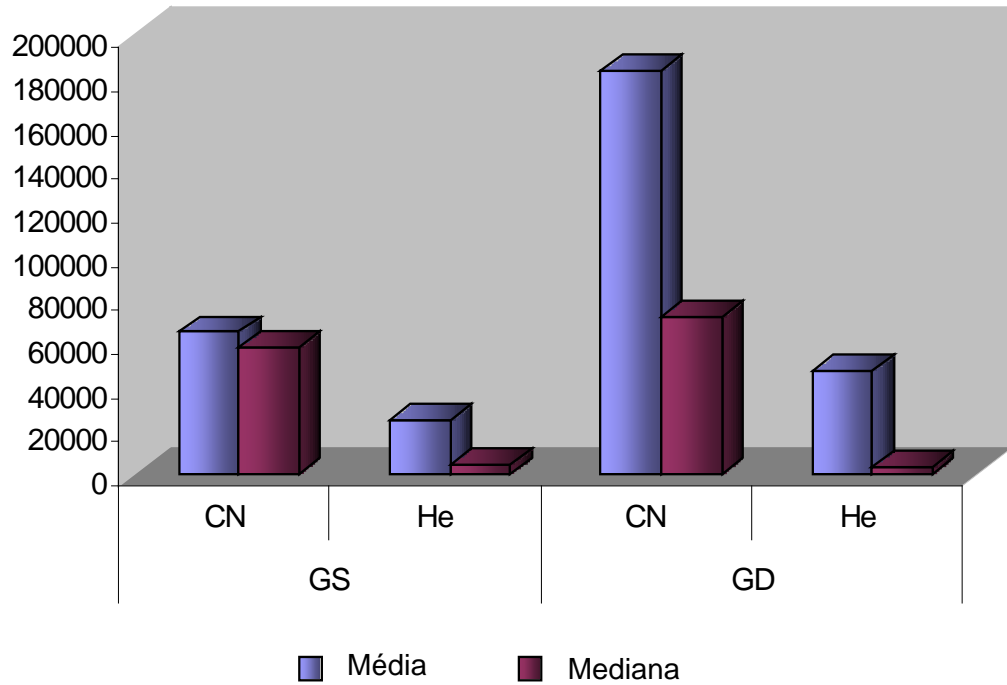


FIGURA 6. Número total de células nucleadas (CN) e hemácias (He) do lavado traqueobrônquico de ovinos dos grupos sadio (GS) e com enfermidade do sistema respiratório (GD).

Na Tabela 5, apresenta-se o percentual das células do lavado traqueobrônquico nos dois grupos estudados. A porcentagem de macrófagos foi a predominante, seguida por neutrófilos e células epiteliais cilíndricas em ambos os grupos. Em menores proporções vêm os linfócitos e eosinófilos. No grupo doente houve uma diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de macrófagos, diminuindo de 62,74% no sadio (GS) para 34,26% no grupo de animais doentes (GD). Porém, na porcentagem de neutrófilos, observa-se uma tendência visual ao aumento dessas células, sendo maior no GD (34,26%) contra os 20,04% desta célula no grupo sadio, sem alteração estatística significativa (Tabela 6). As porcentagens de linfócitos e eosinófilos foram maiores no GD do que no grupo de animais sadios, com valores de 1,67 e 1,58 e 1,44 e 0,77 respectivamente (Figura 7).

TABELA 5. Média (*m*), desvios-padrão (*s*) e mediana (*md*) da porcentagem de macrófagos (M), células epiteliais cilíndricas (CE), neutrófilos (N), linfócitos (L) e eosinófilos (E) do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD).

Grupo de animais		M (%)	CEC (%)	N (%)	L (%)	E (%)
GS	<i>m</i>	62,74	15,01	20,04	1,44	0,77
	<i>s</i>	20,04	9,88	20,26	1,27	1,80
	<i>md</i>	67,564 ^a	12,06 ^a	12,75 ^a	1,00 ^a	0 ^a
GD	<i>m</i>	43,57	18,93	34,26	1,67	1,58
	<i>s</i>	27,07	20,81	31,10	1,95	3,85
	<i>md</i>	41,90 ^b	8,78 ^a	20,20 ^a	1,22 ^a	0,73 ^a

Teste de Mann-Whitney. Correção de Yates ao nível de significância $\alpha=0,05$

Medianas seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Mann-Whitney.

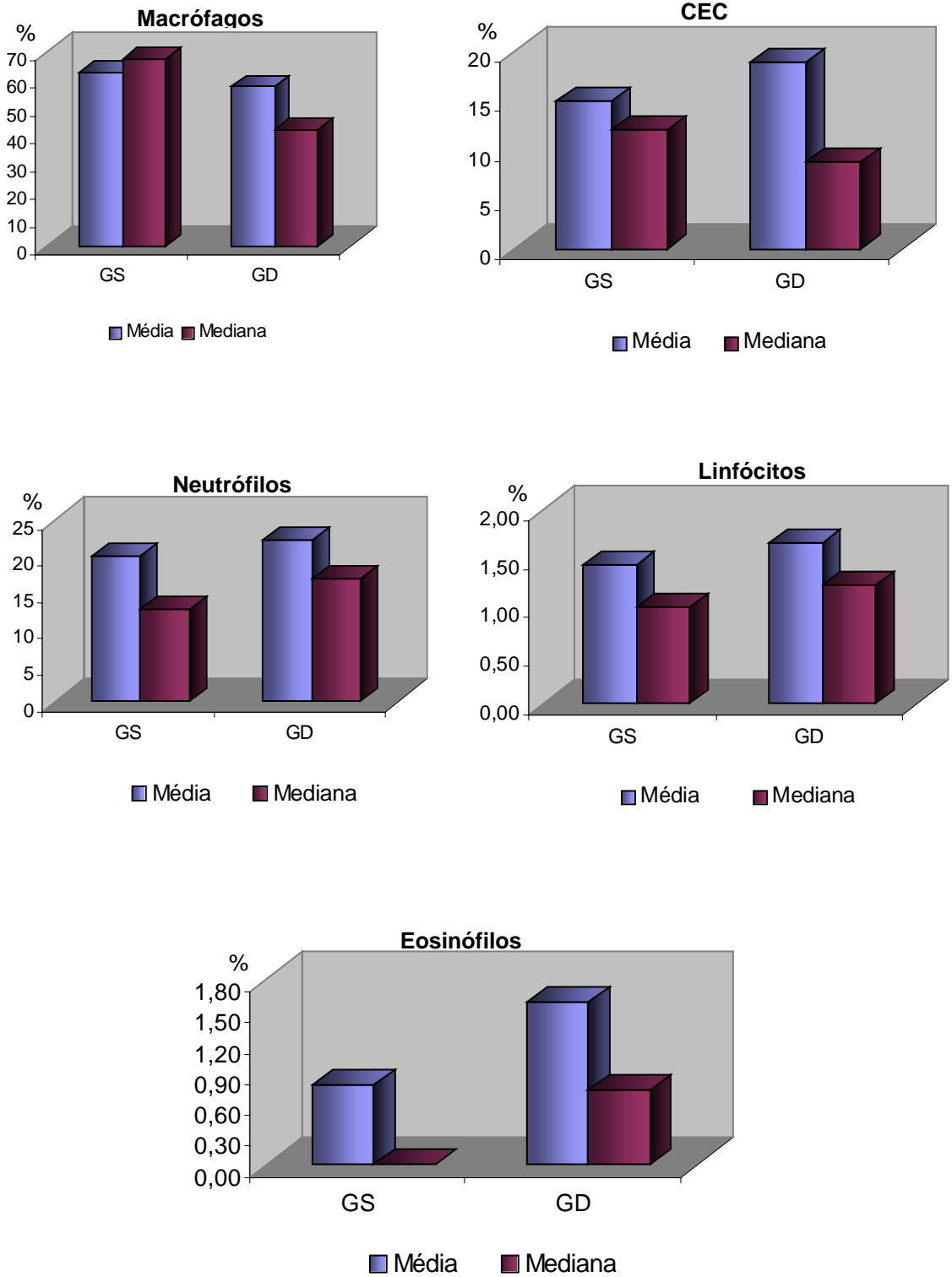


FIGURA 7. Contagem diferencial em porcentagem das células do lavado traqueobrônquico em ovinos clinicamente saudáveis (GS) e portadores de afecções respiratórias (GD), apresentada por células.

TABELA 6. Mediana (*md*) e Intervalo interquartilico (Iq) e *p* valores da comparação entre os grupos sadio e doente com relação às características observadas.

Variáveis	Sadio		Doente		<i>p</i> ⁽¹⁾	<i>p</i> ⁽²⁾
	<i>md</i>	Iq	<i>md</i>	Iq		
Macrófagos	67,53	(25,04)	41,89	(50,26)	0,215	0,031
CEC	12,06	(12,00)	8,78	(37,92)	0,215	0,503
Neutrófilos	12,75	(12,95)	20,19	(58,55)	0,535	0,300
Linfócitos	1,00	(2,05)	1,21	(2,25)	1,000	0,939
Eosinófilos	0,00	(1,00)	0,73	(2,00)	0,535	0,180
Células nucleadas	57750	(62700)	71500	(117150)	0,535	0,202
Hemácias	3850	(27500)	3300	(7150)	1,000	0,909
FC	88,00	(20,00)	100,00	(18,00)	0,054	0,032
FR	32,00	(8,00)	36,00	(8,0)	0,186	0,081
T	39,00	(0,8)	38,80	(1,3)	0,535	0,368

⁽¹⁾ teste da mediana. Correção de continuidade de Yates ao nível de significância $\alpha=0,05$

⁽²⁾ teste de Mann-Whitney. Correção de Yates ao nível de significância $\alpha=0,05$

Com os testes efetuados pela mediana, notou-se significativa diminuição dos macrófagos e aumento na frequência cardíaca, no grupo de animais com enfermidade respiratória. Analisando os valores do intervalo interquartilico, verifica-se que as variáveis do grupo doente apresentam maior variabilidade entre animais.

As principais alterações celulares observadas nos animais doentes foram presença de muco, neutrófilos degenerados, macrófagos binucleados, aglomerados de células cilíndricas, presença de bactérias livres e fagocitadas e fagocitose de partículas estranhas.

As Figuras de 8 a 16 ilustram as principais características citológicas e os achados citológicos encontrados no lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente saudáveis e portadores de afecções respiratórias.

Na Figura 8A mostra uma visão panorâmica das células do lavado traqueobrônquico de ovino clinicamente saudável. O predomínio de macrófagos é evidente, podendo-se observar também algumas células epiteliais cilíndricas, ciliadas em sua grande maioria. Na Figura 8B, observa-se o predomínio de neutrófilos no lavado traqueobrônquico de ovino com envolvimento de via aérea posterior, com menor número de macrófagos e ausência de células epiteliais cilíndricas.

A Figura 9A destaca células epiteliais cilíndricas ciliadas, em detalhe. Na Figura 9B observam-se algumas destas células que perderam seus cílios e presença de linfócitos.

Na figura 10A estão apresentados aglomerados de células epiteliais cilíndricas ciliadas, que podem apresentar-se de forma isolada ou aos pares, Figura 10B.

A Figura 11A, ilustra neutrófilos íntegros de animais saudáveis e; na figura 11B estão ilustrados neutrófilos degenerados, presença de muco (matriz eosinofílica), encontrado em animal com enfermidade respiratória.

A Figura 12 ilustra macrófagos com citoplasma abundante e vacuolizado, notar presença de linfócitos.

Na figura 13 estão ilustrados macrófagos binucleados, e na Figura 14 estão apresentados macrófagos com citoplasma vacuolizados e presença de fagocitose de bactérias.

A figura 15 demonstra a presença de células epitelial escamosa de bactérias comensais em sua superfície, demonstrando contaminação desta amostra com células de vias aéreas anteriores.

A figura 16 refere-se a presença de eosinófilos em animal com enfermidade respiratória.

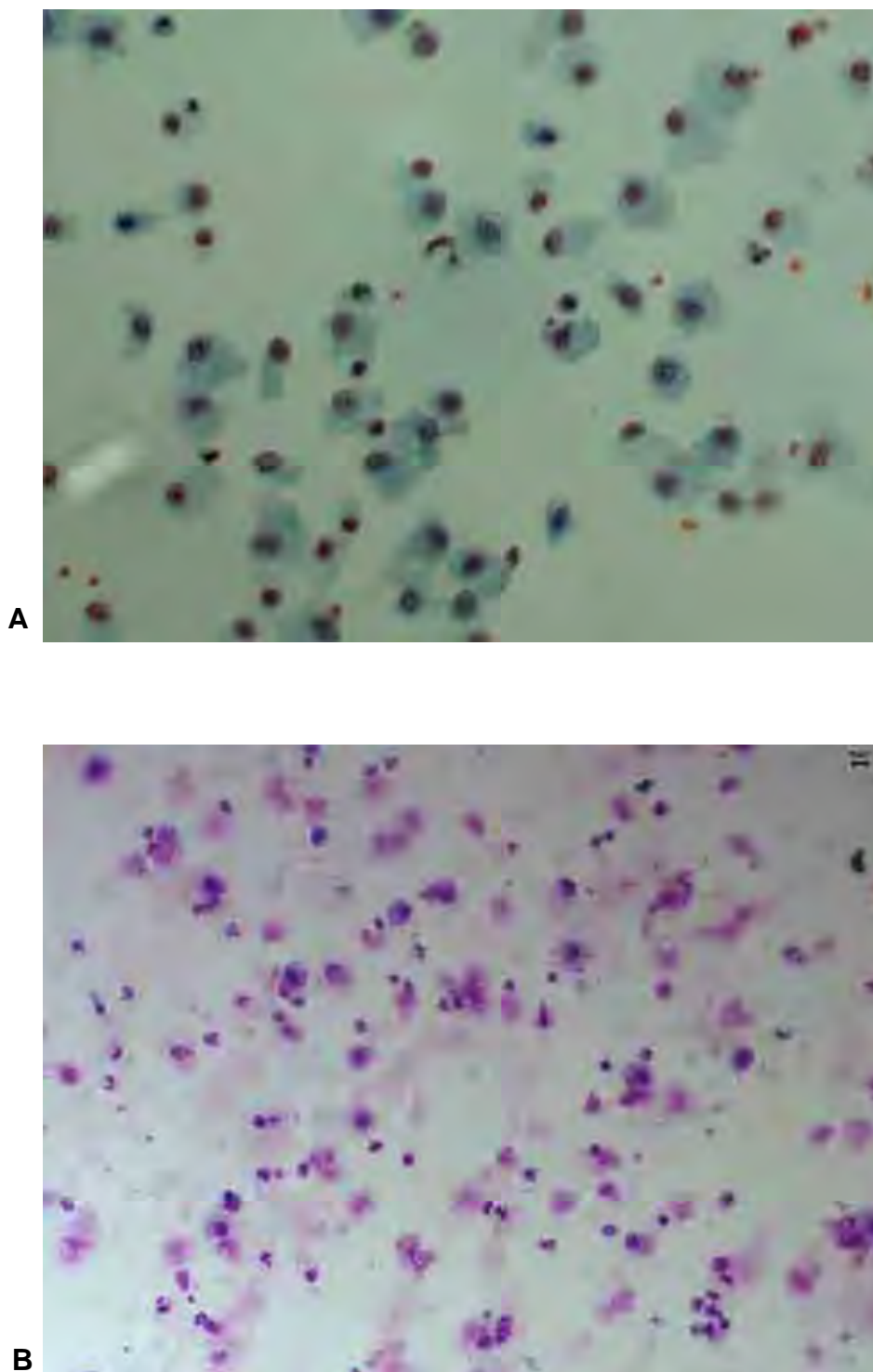


FIGURA 8. Visão panorâmica de células do lavado traqueobrônquico de ovinos saudáveis, com predomínio de macrófagos (A) - Shorr (500x), e de portadores de afecções respiratórias, com predomínio de neutrófilos (B) - Giemsa (500x).

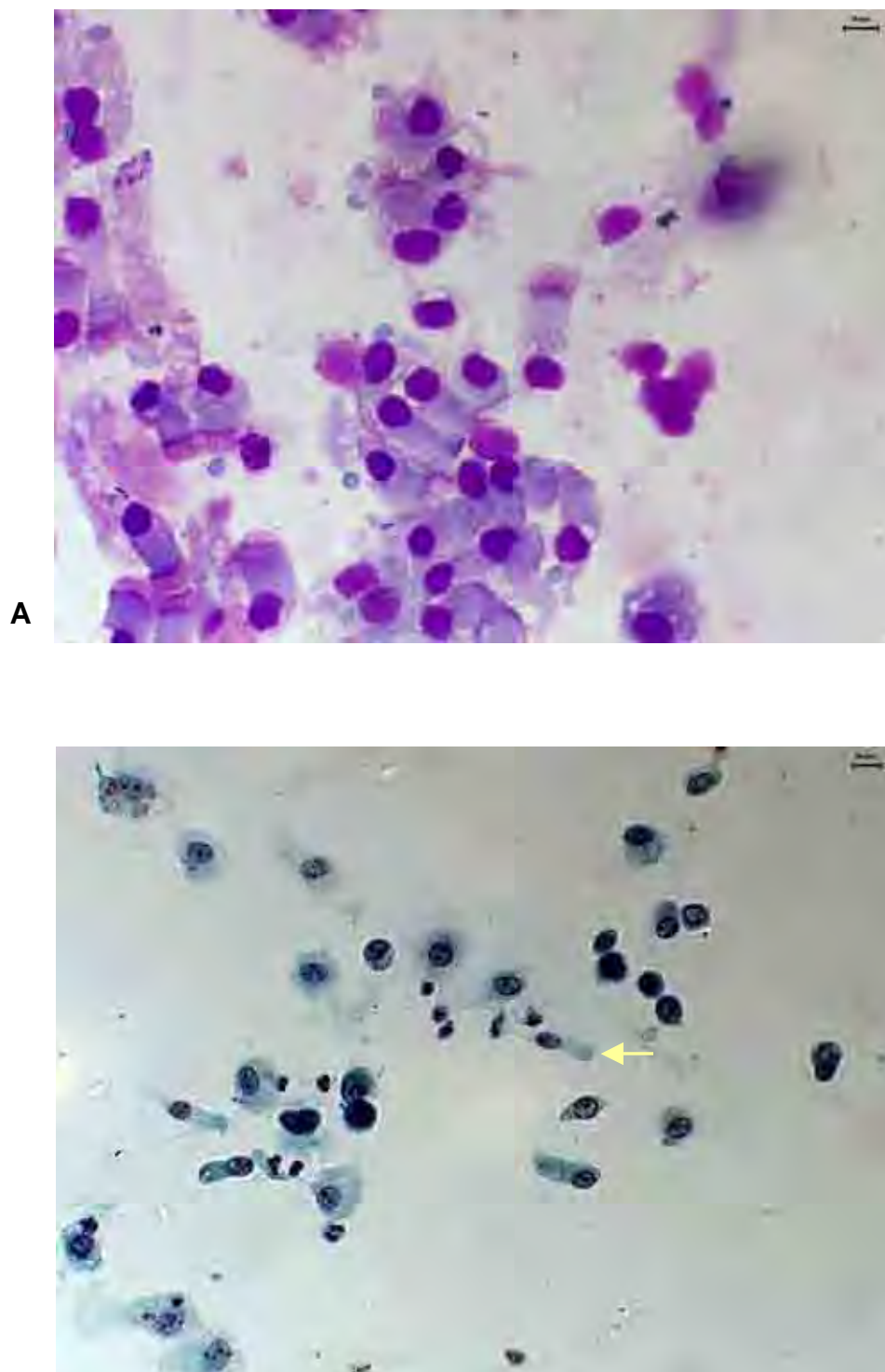


FIGURA 9. Apresentação das células epiteliais cilíndricas ciliadas em ovinos sadios (A) - Giemsa (500x), e nos portadores de afecções respiratórias, com predomínio destas células desprovidas de cílios (→) (B) - Shorr (500x).

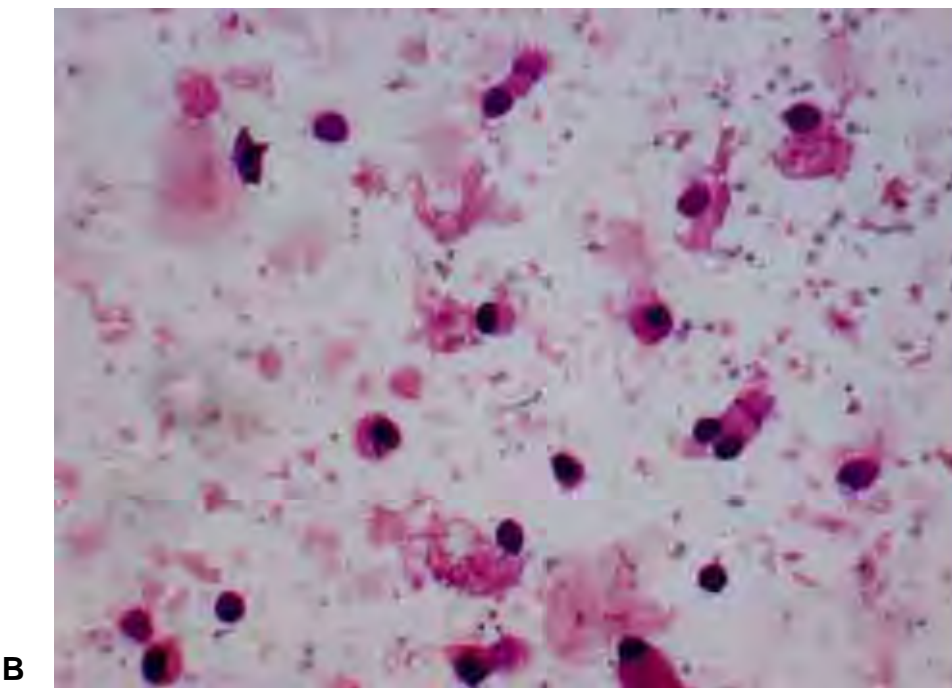
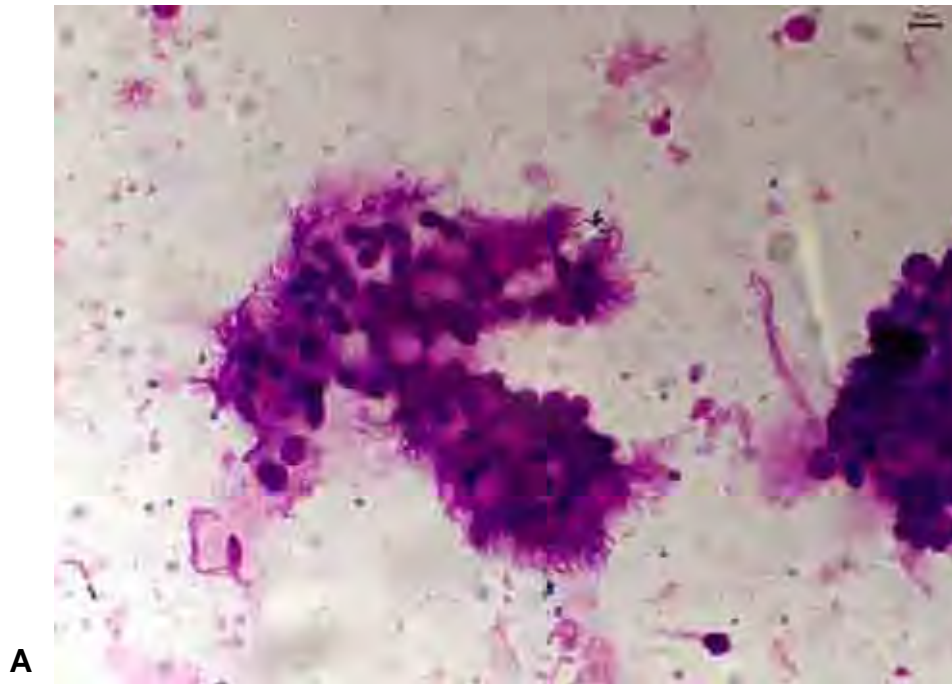
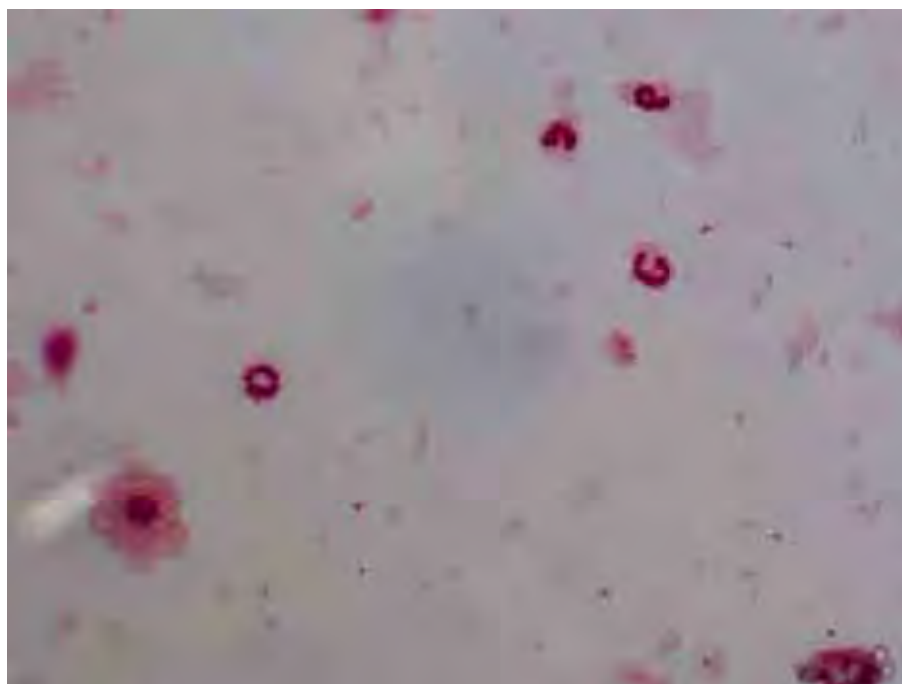
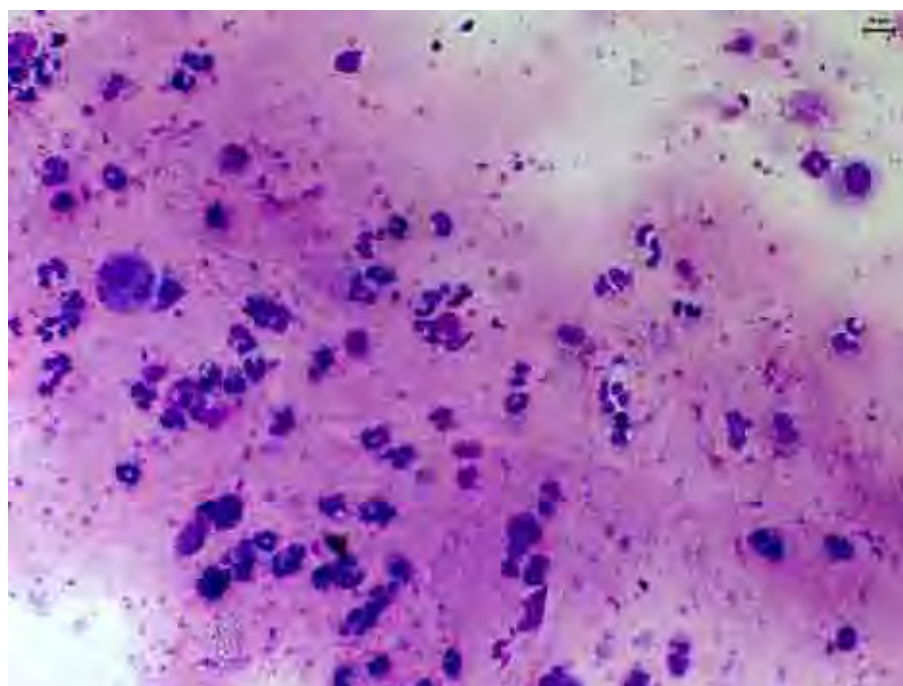


FIGURA 10. Aglomerados de células epiteliais cilíndricas ciliadas (A) e presença de células epiteliais cilíndricas ciliadas isoladas ou aos pares (B) – Giemsa (200x).



A



B

FIGURA 11. Neutrófilos íntegros em animal sadio (A) - Giemsa (400x) e neutrófilos com aspecto degenerado, entremeados em matriz eosinofílica (muco) em amostra de animal com broncopneumonia (B) - Giemsa (400x).

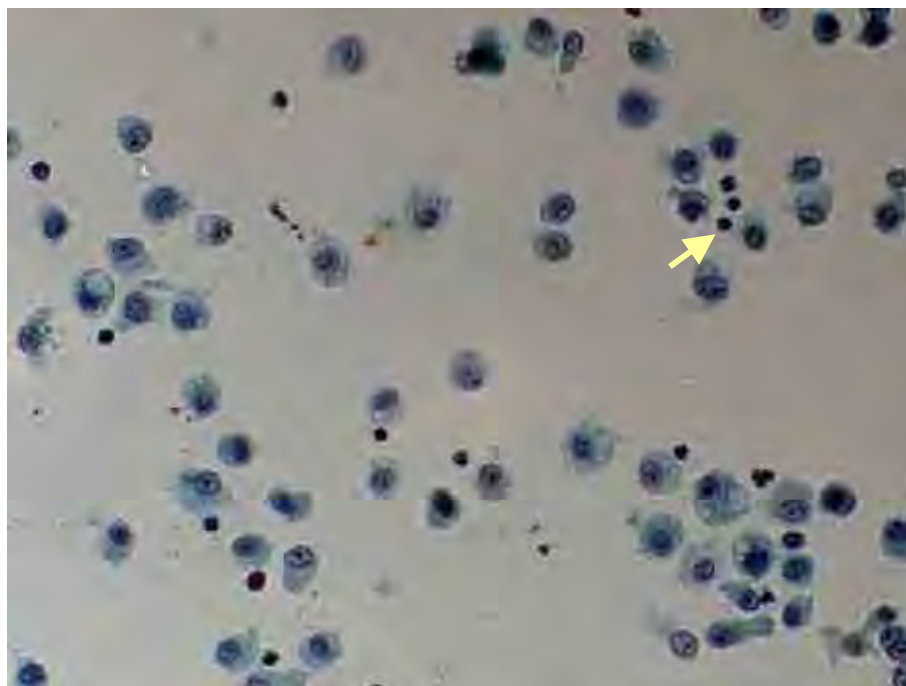


FIGURA 12. Predomínio de macrófagos com citoplasma abundante e vacuolizados, nota-se presença de linfócitos (→) – Shorr (400x).

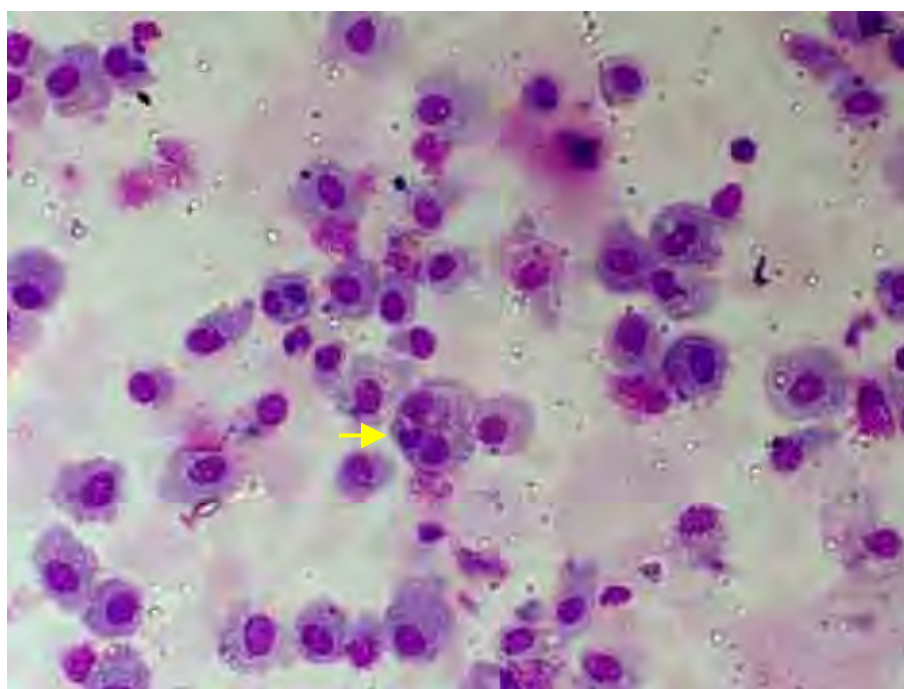


FIGURA 13. Presença de macrófagos binucleados em ovino com broncopneumonia, notar presença de muco e fagocitose de leucócito (→) - Giemsa (500x).

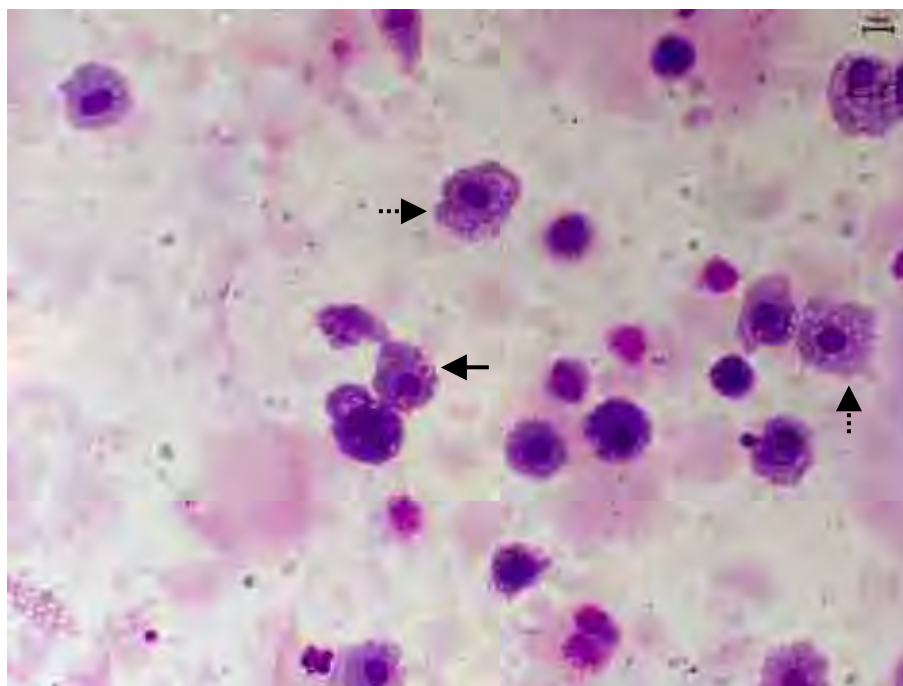


FIGURA 14. Presença de macrófagos com citoplasma vacuolizados (...▶) e ao centro macrófago fagocitando bactérias (→), presentes em amostra de ovinos com broncopneumonia – Giemsa (500x).

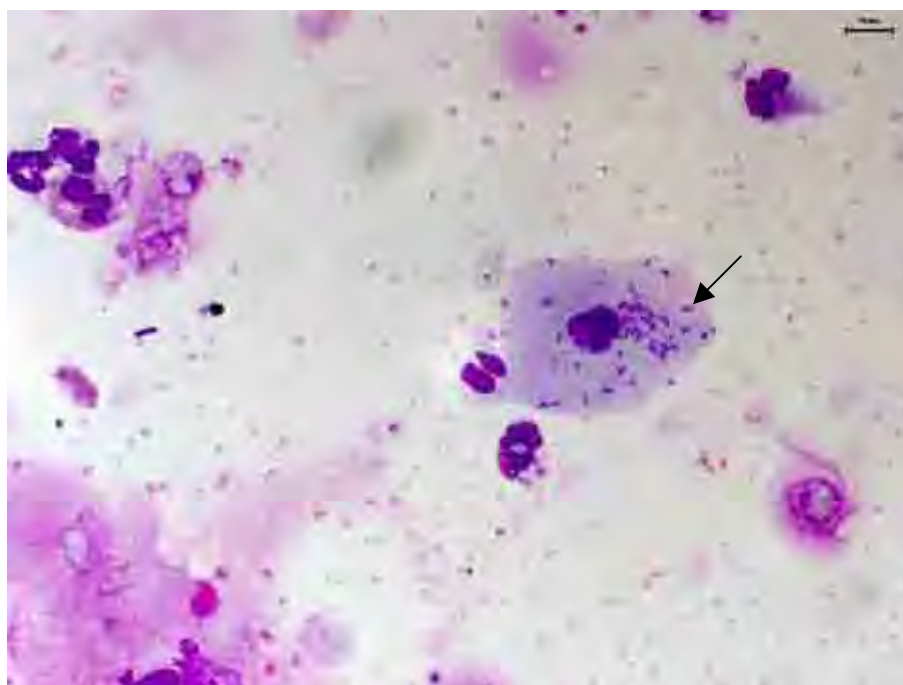


FIGURA 15. Presença de célula epitelial escamosa com presença de bactérias em sua superfície, demonstrando contaminação desta amostra – Giemsa (640x).

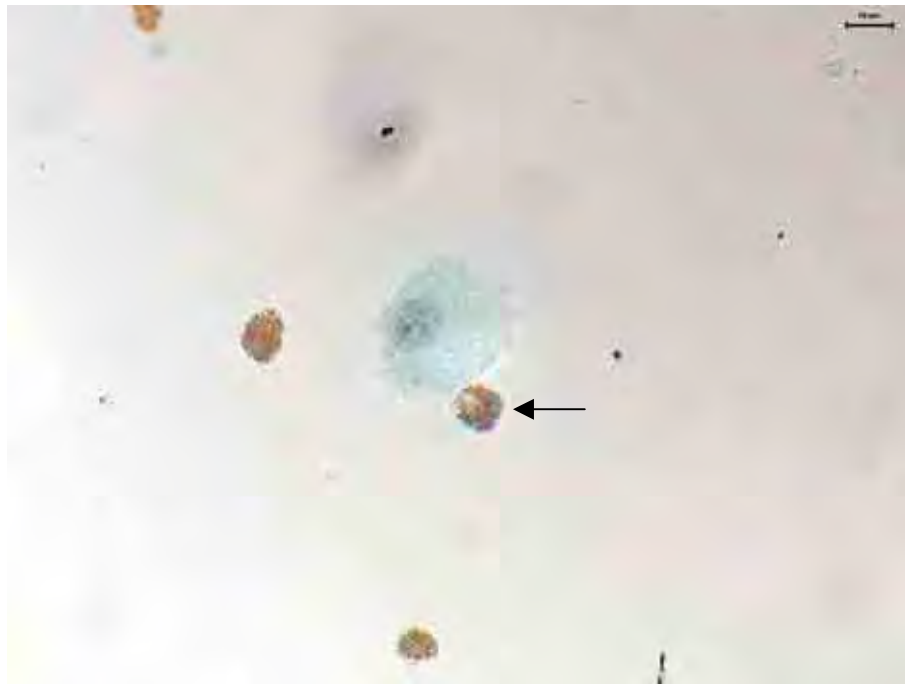


FIGURA 16. Presença de eosinófilos em animal com enfermidade respiratória – Shorr (540x).

Quadro 2. Sinais clínicos ausentes (0) e presentes (1) em ovinos clinicamente sadios (n=19).

Sinais Clínicos *	Número do Animal																			Total
	11	13	20	21	22	23	24	25	29	30	35	36	37	39	49	50	51	52	53	
To	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FTr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RTosse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RLTr ↑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RTB ↑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RBBr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T° ↑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FR ↑	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	10
FC ↑	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Total	1	0	1	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	13

* Ver lista de abreviaturas

Quadro 3. Sinais clínicos ausentes (0) e presentes (1) em ovinos portadores afecções respiratórias (n=23).

Sinais Clínicos *	Número do Animal																							Total	
	08	09	10	12	14	15	16	17	18	27	31	32	34	38	40	41	43	44	45	46	47	48	54		
To	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	6
CN	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	15	
DM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
FTr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
RTosse	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	9
RLTr ↑	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	11
RTB ↑	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	13
RBBr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	6
CG	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	13
CF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T° ↑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
FR ↑	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	15
FC ↑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	4	3	4	1	2	2	5	5	2	5	8	4	2	6	3	5	3	4	4	2	3	4	7	7	91

* Ver lista de abreviaturas

6. DISCUSSÃO

6.1 da Metodologia

No Brasil, a literatura em relação a métodos diagnósticos de processos respiratórios em ovinos é escassa. Pesquisas têm dado ênfase para agentes específicos como o Vírus da Maedi-Visna que, devido sua estreita relação na patogenia das pneumonias intersticiais humanas, causada pelo vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS), são mais estudados (CORDIER et al., 1992; LUJÁN et al., 1993; BURRELLS & SUTHERLAND, 1994; MORNEX et al., 1994; BROGDEN et al., 1998b;). Viana (2003) realizou estudos para a determinação da distribuição da *Mannheimia haemolytica* e da *Pasteurella multocida* na nasofaringe e orofaringe de ovinos sadios da região de Botucatu, detectando que a *M. haemolytica* foi a bactéria mais prevalente (47%), seguida pela associação de *M. haemolytica* e de *P. multocida* (27%) e pela *P. multocida* (11%), demonstrando a presença desses agentes oportunistas em animais sadios, predispondo-os a infecções bacterianas secundárias.

Os dados citológicos foram analisados a partir da orientação de literatura que relacionaram a histopatologia à citologia do lavado traqueobrônquico (LARSON & BUSCH, 1985) e o caracterizaram como método adequado para a representação da lesão pulmonar (BURRELS & WILLIAMS, 1987; GONÇALVES et al., 2004; ROSZEL et al., 1986; DERKSEN et al., 1989).

Os sinais clínicos para o diagnóstico das doenças respiratórias foram avaliados segundo os critérios de Stöber (1993) e Gonçalves (1997). A análise dos escores encontrados permitiu a associação dos sinais clínicos para a diferenciação dos grupos de ovinos clinicamente sadios e portadores de afecções respiratórias e a verificação de animais com predomínio de sinais de vias aéreas anteriores.

Com este método de colheita, adaptado de Gonçalves (1997), obteve-se, em estudo piloto com sete animais, lavados ricos em macrófagos alveolares, sem contaminação e prejuízos aos animais. Uma amostra de lavado, representativa das regiões pulmonares mais profundas, é aquela constituída por grande quantidade de macrófagos alveolares e pouca contaminação por células do trato respiratório anterior (ZINKL, 1992). O tubo guia foi utilizado neste trabalho para evitar a contaminação por células da orofaringe e da traquéia, o que pode ocorrer nos lavados bucotraqueais e nasotraqueais (LE JAN et al., 1980; CORSTVET et al., 1982; GONÇALVES 1997; GONÇALVES et al 2004).

Como há a necessidade de que o lavado represente o máximo possível do pulmão como um todo, o líquido foi depositado na bifurcação traqueal, evitando-se a limitação provocada pela lavagem broncoalveolar às cegas, realizada com a introdução do tubo guia no brônquio (FOGARTY et al., 1983; KIMMAN et al., 1986; LAY et al., 1986; DYER et al., 1989; TAYLOR et al., 1989; SWEENEY & BEECH 1991; MORI, 2000) ou por endoscopia (MARKHAN & WILKIE, 1980; WILKIE & MARKHAN, 1981; FORMAN et al., 1982; PRINGLE et al., 1988; ALLEN et al., 1992 a e b). A introdução deste tubo contribuiu, também, para desencadear o reflexo de tosse, favorecendo a colheita de células das regiões mais profundas (ROSZEL et al., 1986; GONÇALVES, 1997). A endoscopia, apesar de facilitar a colheita do lavado e a observação das vias aéreas e permitir uma colheita direcionada, ainda é um método caro e de difícil manuseio, o que dificulta sua aplicação a campo.

Outros métodos propostos, nos quais se faz a punção traqueal para a introdução do tubo coletor (MANSMANN & KNIGHT, 1972; BEECH, 1975 e 1981; SEALS, 1980; FREEMAN et al., 1985; LARSON & BUSCH, 1985; GONÇALVES, 1987; GONÇALVES et al., 1990; SWEENEY et al., 1992a; BARROS et al., 1994), não foram utilizados, pois são métodos invasivos, podendo provocar complicações como celulite local, condrite e pneumomediastino (WHITWELL & GREET, 1984; HOFFMAN et al., 1993), hemorragia e hemoptise (WHITWELL & GREET, 1984; HOFFMAN et al., 1993), contaminando o líquido de lavagem com células sanguíneas (ROSZEL et al., 1986). Além disto, estes métodos, usados principalmente para cultura microbiológica (GONÇALVES et al., 1990; ESPINASSE et al., 1991; BARROS et al., 1994), causam repulsa nos criadores pelo manuseio dos ovinos clinicamente sadios, apesar de não provocar problemas mais graves nos animais.

Nos ovinos a literatura citada, em relação aos estudos das secreções pulmonares, é relacionada à pesquisas biomoleculares, avaliações fenotípicas de células linfocíticas, marcadores moleculares, citocinas e interleucinas inflamatórias nas pneumonias intersticiais por Maedi-Visna vírus (ABRAHAM et al., 1988; CORDIER et al., 1992; LUJÁN et al., 1993; BURRELLS & SUTHERLAND 1994; LUJÁN et al., 1995; LEGASTELOIS et al., 1997; BROGDEN et al., 1998b) e os estudos citológicos visam esta espécie como modelo experimental humano (GÓRIN et al., 1979; BOSSÉ et al., 1987; BURRELS, 1985; BURRELS & WILLIAMS 1987; CORDIER et al., 1992; COLLIE et al., 1999), visando amostras broncoalveolares. Esse estudo teve a finalidade de avaliar características citológicas encontradas em lavados traqueobrônquicos de animais sadios e com envolvimento de vias aéreas detectados em prévio exame clínico.

As considerações relacionadas à técnica bem como a falta de informações nesta espécie, qualificam a lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal, com tubo guia até a bifurcação traqueal, como método opcional de colheita para estudo citológico de problemas respiratórios em ovinos. Principalmente por ter a vantagem do uso pelos profissionais a campo, por ser mais acessível economicamente que a endoscopia, e menos invasiva, de tal maneira a não causar repulsa aos proprietários de ovinos.

6.2 dos Resultados

Os animais clinicamente sadios não apresentaram sinais clínicos compatíveis com doença respiratória (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES 2004; WILSON & LOFSTEDT, 2006). A frequência cardíaca aumentada, observada em três ovinos deste grupo (Quadro 2), poderia indicar alterações cardiocirculatórias ou excitação psíquica (STÖBER, 1993). O fato deste sinal aparecer isolado em um animal e nos outros dois associados apenas ao aumento de frequência respiratória, sem qualquer outro sinal clínico, reforça a hipótese de excitação psíquica e confirma a higidez do grupo de animais clinicamente sadios. Os ovinos sadios tornam-se agitados e excitados quando separados do grupo, o que leva a aumento fisiológico das frequências aferidas.

O grupo de ovinos com afecções respiratórias caracterizou-se pela maior ocorrência de sinais clínicos que, principalmente em associação, demonstravam comprometimento broncopulmonar (Quadro 3) - (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES 2004 ; WILSON & LOFSTEDT, 2006), com 91 associações de sinais clínicos.

A broncopneumonia pode se apresentar com intensidade variável no ovino (BELKNAP, 2005; WILSON & LOFSTEDT, 2006) e vários critérios são utilizados para a diferenciação do processo, entre eles a sintomatologia clínica (GONÇALVES, 1997) utilizada na espécie bovina. Neste trabalho, optou-se pela análise da frequência dos sinais clínicos no momento do exame para determinar o envolvimento de vias aéreas ou não (Quadro 2 e 3), e para a diferenciação dos grupos em sadio (GS) e doente (GD).

Os sinais clínicos como corrimento nasal e frequência respiratória aumentada (15/23), aumento de ruído traqueobrônquico e crepitação grossa (13/23), aumento de ruído laringotraqueal (11/23), reflexo de tosse positivo (9/23) e presença de tosse e inspiração entrecortada (6/23) (Quadro 3) foram determinantes para a diferenciação do grupo de animais com envolvimento de vias aéreas (GD), corroborando com dados de Stöber (1993) e Gonçalves (1997) para o diagnóstico de afecções pulmonares.

Em relação ao corrimento nasal (BRYSON et al., 1979; BRYSON, 1985; BELKNAP, 1993; CRANDELL, 1993; DIFFAY et al., 2005 WILSON &

LOFSTEDT, 2006), presente em 65,2% dos animais do grupo GD, uni ou bilateral e com aspecto seroso a mucoso. Houve evidência de conteúdo nasal purulento e bilateral em dois animais mais gravemente acometidos, o que reforça a hipótese de provável origem brônquica nesses animais (Quadro 3), (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES 2004; DIFFAY et al., 2005; WILSON & LOFSTEDT, 2006). No entanto, vale ressaltar que o hábito de pastejo dos ovinos e a alimentação pulverulenta que recebem predispõem ao insulto da mucosa respiratória anterior podendo ocasionar rinite, faringite e laringotraqueíte, conforme encontrados em 4/23 animais, sem outra sintomatologia de vias aéreas posteriores. Esses animais eram mantidos em sistema de confinamento, recebendo ração pulverulenta.

A temperatura aumentada, observada em um animal com envolvimento de vias aéreas posteriores (Quadro 3), foi de apenas 0,2°C acima do valor normal (Tabela 8 - Apêndice), e não apresentava associação com o aumento da frequência cardíaca nem respiratória, portanto, não relacionado com a “síndrome febre” (RADOSTITS et al., 2002). Este sinal clínico, possivelmente, deve-se à variação nictameral (FEITOSA, 2004) devido ao horário que foi realizado o exame clínico e a ausência de outros sinais que caracterizam a febre, como prostração, taquipnéia, taquicardia (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002). Nossos achados revelaram que tanto o GS quanto o GD apresentaram temperatura corpórea dentro da faixa de normalidade para a espécie, com média de $39,0 \pm 0,54$ e $38,79 \pm 0,7$ °C respectivamente.

A frequência respiratória aumentada é um dos mecanismos fisiológicos de compensação pulmonar na tentativa de manutenção das trocas gasosas (RADOSTITS et al., 2002; WILSON & LOFSTEDT, 2006). Foi notada em 10/19 animais do grupo sadio e em 15/23 do grupo doente. Devido à utilização de animais de propriedade, teoricamente todos sadios, este aumento da frequência respiratória em animais do grupo sadio está relacionada a alterações psíquicas (STÖBER, 1993) e estresse da contenção no momento do exame físico, uma vez que, mesmo separados dos demais animais do lote para aferição da frequência respiratória à distância (GONÇALVES, 2004), esses animais permaneciam agitados. Os quimiorreceptores pulmonares que influenciam o ciclo respiratório incluem os receptores irritativos nas vias respiratórias, que são estimulados por poeira e histamina (WILSON &

LOFSTEDT, 2006), fato observado no manejo dos animais em relação à alimentação e cama pulverulentas presente nas instalações. Houve significativo aumento da frequência cardíaca em animais do grupo doente, devido à taquicardia apresentada por animais com enfermidade respiratória (STÖBER, 1993).

Quanto mais grave o processo, menor a eficiência das trocas gasosas e maior a necessidade de utilização dos mecanismos de compensação pulmonar (BEECH, 1991a; HINCHCLIFF & BYRNE, 1991; ANDREWS, 1992a; PRINGLE, 1992; WILSON, 1992; RADOSTITS et al., 2002). O número de animais doentes com frequência respiratória aumentada foi maior no grupo de animais com afecções respiratórias (68,2%) contra os 52,6% dos animais sadios, mostrando que é um sinal importante no diagnóstico de afecções respiratórias (STÖBER, 1993, GARCIA et al., 1996; GONÇALVES, 2004). No entanto, deve ser avaliada com critérios na espécie ovina, devido sua fácil alteração pela simples contenção manual e manejo dos animais.

A dispnéia mista foi detectada em apenas um animal (Quadro 3), e associada à inspiração entrecortada que denota presença de líquido com obstrução seqüencial de brônquios, e o aumento de som laringotraqueal e ruído traqueobrônquico com área de auscultação aumentada, é característica de broncopneumonia grave (GONÇALVES et al., 2001) e demonstrou a gravidade do caso neste animal, relacionada à presença de exsudato nos brônquios e bronquíolos determinando a dificuldade de entrada e saída do ar alveolar (STÖBER, 1993; GONÇALVES 2004).

O ruído traqueobrônquico aumentado, tanto em região ventral como dorsal, relaciona-se com a quantidade de líquido inflamatório no interstício pulmonar (BRAZ, 1981; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993) e com a gravidade do processo. Observou-se que no grupo com enfermidade respiratória houve associação desse sinal com crepitação grossa em 10 animais. Dois animais apresentaram a crepitação grossa associada com a inspiração entrecortada, sem aumento de ruído traqueobrônquico. Um animal não apresentou crepitação grossa, nem os demais sinais de envolvimento de vias posteriores, no entanto, apresentava aumento da área auscultada (Quadro 3). A crepitação grossa é outro sinal que está relacionado ao aumento de líquido inflamatório em vias aéreas (BRAZ, 1981; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993; SAVAGE,

1997; GONÇALVES 2004) e a sua presença foi determinante para confecção do grupo GD, mostrando a importância da associação dos sinais clínicos para distinguir a gravidade e a localização do processo respiratório (GONÇALVES, 2001).

A inspiração entrecortada (IE) foi diagnosticada em 6/23 animais do grupo com envolvimento pulmonar, apresentando-se associada a outros sinais de vias aéreas posteriores, principalmente com a crepitação grossa em cinco dos seis animais com IE. Segundo Pringle, (1992); Stöber, (1993) e Gonçalves (2004) denotam presença de líquido, com obstrução seqüencial de brônquios, evidenciando comprometimento bronquial. As reações inflamatórias levam à saída de líquido de dentro do parênquima para o lúmen brônquico ou à alteração das secreções brônquicas para a defesa do órgão (LEID & POTTER, 1985; LIGGITT, 1985; SWEENEY & BEECH, 1991), mesmo em processos iniciais, o que explica a presença da inspiração entrecortada apenas no grupo de animais doentes.

Corroborando com dados de Gonçalves (1997), a crepitação grossa foi o sinal presente em 56,5% dos animais do grupo com envolvimento pulmonar (GD) (Quadro 3) Indicando grande quantidade de líquido nos brônquios (LEHRER, 1990; HINCHCLIFF & BYRNE, 1991; STÖBER, 1993). Portanto, este ruído respiratório anormal reflete bronquite e sua intensidade, associa-se com a gravidade do quadro clínico e a localização do processo (GONÇALVES & BARIONI, 2000), sendo fundamental no diagnóstico diferencial dos processos respiratórios anteriores e posteriores (STÖBER, 1993; GARCIA et al.,1996; SAVAGE, 1997; GONÇALVES, 2004).

Casos mais graves de broncopneumonia foram encontrados em apenas dois animais, pois a maioria dos animais utilizados eram provenientes de fazendas da região de Botucatu, e os problemas foram detectados no momento do exame do rebanho, identificando na inspeção animais com tosse, corrimento nasal e espirros. Esses animais foram separados e submetidos a exame clínico para constatação de alterações respiratórias. Um desses dois animais, apresentou sete associações dos critérios clínicos utilizados (Quadro 3), sendo que o ruído traqueobrônquico aumentado, com área de auscultação aumentada e a crepitação grossa nesse animal eram intensas, denotando grande quantidade de secreção em brônquios. Isso, culminou com a alta celularidade

na contagem total e grande desvio na contagem diferencial predominando os neutrófilos neste animal, conforme literatura de animais com comprometimento pulmonar em bovinos (GONÇALVES, 1997), e em eqüinos (DERKSEN et al.,1985).

Os animais do grupo com enfermidade broncopulmonar, apresentando sinais como ruído traqueobrônquico aumentado, inspiração entrecortada e crepitação grossa, associados ou não entre si, apresentaram predomínio de neutrófilos seguido por macrófagos, concordando com a literatura de bovinos com broncopneumonia (Gonçalves, 1997).

Alguns sinais clínicos, também sensíveis no diagnóstico de processos parenquimatosos e bronquiais, não foram observados nos animais doentes (Quadro 3). Frêmitos traqueal e torácico, que são sinais palpatórios, não foram diagnosticados nos ovinos doentes, embora dependam da proximidade da área acometida com a parede torácica, da extensão do processo e da quantidade de líquido presente (BRAZ, 1981; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993). Crepitação fina, auscultada em edema pulmonar e durante as fases iniciais ou de resolução das pneumonias (STÖBER, 1993), não foi evidenciada no grupo de animais doentes (Quadro 3). Este fato pode ser atribuído à fase inicial ou intermediária da evolução do processo em que os animais foram examinados ou, segundo Gonçalves, (1997), à dificuldade de auscultação quando este sinal está associado a outros de maior intensidade.

Desta maneira, sinais como frêmito traqueal, frêmito torácico, ruído broncobronquiolar aumentado, área de silêncio, crepitação fina, roncosp e sibilos, roce pleural e odor expiratório pútrido não foram observados nos animais utilizados neste estudo. A percussão torácica não foi utilizada como método diagnóstico devido à dificuldade de sua realização em vista do comportamento irrequieto dos animais.

A análise descritiva das médias, mostra um valor maior para o número total de células e número de hemácias do lavado traqueobrônquico entre os ovinos clinicamente sadios e os portadores de afecções pulmonares. Os animais sadios apresentaram 64.650,0 células nucleadas por mililitro e os animais com afecções respiratórias (GD) apresentaram 184.215,2 células por mililitro, perfazendo um total de 119.565,2 células a mais neste grupo. Isso mostra tendência visual ao aumento das células nucleadas em animais com

inflamação de vias aéreas, quando comparados ao grupo de animais sadios. Isso foi demonstrado por Gonçalves (1997), confirmando a descamação celular do epitélio traqueobrônquico e migração celular, decorrente do processo inflamatório (SWEENEY & BEECH, 1991).

Houve aumento no número de hemácias no grupo doente em relação ao grupo de animais sadios. A média encontrada foi de 24.657,9 no grupo GS e 47.437,0 no GD; embora este aumento não tenha sido estatisticamente diferente, pode-se atribuir este fato à fragilidade capilar em vias aéreas inflamadas.

A observação individual da celularidade do lavado traqueobrônquico revelou, nos animais clinicamente sadios, grande variação no número total de células, atingindo um máximo de 165.000 células por mililitro (Tabela 9 – Apêndice). No grupo de animais doentes, portadores de afecções respiratórias, esta variação foi ainda mais intensa, variando de 6×10^3 a 2.350×10^3 e dentre os animais com afecção respiratória, aproximadamente 50% dos casos exibiram número total de células abaixo dos valores do grupo sadio (Tabela 9 e 10 - Apêndice). Isto talvez se deva ao fato de que, embora a descamação seja proporcional à presença de doença broncopulmonar, existem variações individuais, relacionadas à agressão dos diferentes agentes infecciosos sobre as células e à evolução do processo inflamatório, que determinam migração das células de defesa para o local da infecção.

É preciso cautela para usar este número como índice absoluto no diagnóstico e diferenciação dos processos inflamatórios pulmonares, tendo em vista que, no grupo de animais doentes foram encontrados animais com valor tão baixo quanto 6.000 cel/ml e outro com 2.350×10^3 cel/ml (Tabela 10 - Apêndice). Este animal foi marcante no exame físico por apresentar tosse, corrimento nasal, reflexo de tosse positivo, ruído laringotraqueal aumentado, crepitação grossa intensa em região traqueobrônquica dorsal e ventral, bilateral, e área de ruído traqueobrônquico aumentado totalizando sete associações de sinais clínicos.

Em relação à contagem diferencial, houve diferença estatística na porcentagem de macrófagos, que reduziu em animais com problemas broncopulmonares.

A contagem diferencial que deveria contornar as dificuldades de se utilizar o número total de células do lavado traqueobrônquico em animais sadios e portadores de afecções respiratórias, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as células estudadas: células epiteliais cilíndricas, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. No entanto, o lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios caracterizou-se por predomínio de macrófagos, acima de 60% do total de células, seguindo-se por cerca de 15% de células epiteliais cilíndricas, 20% de neutrófilos, 1,4% de linfócitos e 0,77% de eosinófilos (Tabela 5), de acordo com o predomínio da população celular descrita na literatura (GONÇALVES et al., 2004), diferindo apenas na população de eosinófilos, pois tais autores não encontraram essas células em bezerros sadios. No entanto, coincide com o predomínio da população de células encontradas em ovinos (BOSSÉ et al., 1987).

Corroborando com os dados da literatura, a porcentagem de macrófagos reduziu-se nos animais do grupo doente quando comparada aos animais do grupo sadio; a tendência dessa diminuição no grupo de animais doentes foi estatisticamente significativa, e houve aumento visível no número de neutrófilos nesse grupo (GONÇALVES, 1997). Esta diferença pode estar associada ao fato do número de neutrófilos aumentar no lavado em casos de inflamação brônquica (VIEL, 1997; COUËTIL et al., 2001) ou dependendo da região pulmonar amostrada (SWEENEY et al., 1992b). A diminuição do número de macrófagos traduz agressão ao pulmão, proporcional à intensidade do processo (ROSZEL et al., 1986; DERKSEN et al., 1989).

Em animais clinicamente sadios os macrófagos alveolares caracterizam o lavado traqueobrônquico, já nos animais doentes, ocorre substituição destas células por outras, envolvidas com mecanismos secundários de defesa pulmonar (COHEN & ROSSI, 1983; REYNOLDS, 1983; WALKER et al., 1985; LEID & POTTER, 1985). Toda agressão leva à liberação de substâncias quimiotáticas, que provocam migração de células inflamatórias no local da lesão (LIGGITT, 1985; LEID & POTTER, 1985; COTRAN et al., 1994; LEDWOZYW et al., 1992). Este processo ocorre também no pulmão, havendo migração principalmente de neutrófilos, que atuam na destruição de partículas contaminantes (COHEN & ROSSI, 1983; REYNOLDS, 1983; WALKER et al., 1985; LEID & POTTER, 1985), desenvolvendo sua ação fagocitária e lítica

(COTRAN et al., 1994). São as primeiras células da inflamação aguda (ZINKL, 1992) e representam a celularidade característica do lavado traqueobrônquico nos processos inflamatórios.

Considerando-se que, nos casos patológicos, os agentes infecciosos podem diminuir o número de macrófagos no lavado (SLAUSON et al., 1987), e que a reação inflamatória local no pulmão estimula a migração quimiotática de neutrófilos (HAKICH & LATIMER 1989), pode-se inferir que nos ovinos deste estudo, que apresentaram problemas respiratórios mais sérios, houve predomínio da população de neutrófilos, com considerável queda de macrófagos.

A resposta à inflamação local do pulmão, caracterizada pela migração de neutrófilos, foi também evidenciada pela formação de aglomerados destes tipos celulares (BEECH, 1975), encontrados em animais mais gravemente acometidos e ausentes em animais sadios.

A contagem diferencial de linfócitos no lavado traqueobrônquico de eqüinos é controversa, na dependência da técnica de colheita utilizada. Por via endoscópica, em animais clinicamente sadios, representaram cerca de 30 a 50% da população total de células do lavado (NAYLOR et al., 1992; SWEENEY et al., 1992a e b; MCGORUM et al., 1993), e em ovinos sadios cerca de 20,9% (BURRELLS & WILLIAMS 1987). Já Collie et al., (1999) encontraram proporções mais baixas de linfócitos em BAL de ovinos, cerca de 3%. Na lavagem traqueobrônquica por traqueocentese (LARSON & BUSCH, 1985; SWEENEY et al., 1992a e b) e em outras técnicas, endoscópicas ou às cegas (DERKSEN et al., 1989; SWEENEY et al., 1989; ROSSIER et al., 1991), a quantidade de linfócitos diminuiu exageradamente, tanto na presença como na ausência de doença respiratória.

Em bezerros, a situação não é muito diferente. Wilkie & Markhan (1981), em amostra colhida por via endoscópica, observaram 28% de linfócitos no lavado traqueobrônquico de animais clinicamente sadios. Outros autores, utilizando a via endoscópica ou obtendo amostra por lavagem às cegas, encontraram número bastante reduzido de linfócitos, independente do diagnóstico de problemas respiratórios (KIMMAN et al., 1986; LAY et al., 1986; PRINGLE et al., 1988; ALLEN et al., 1992a). Gonçalves (1997) estudando a população das células em lavado traqueobrônquico de bezerros sadios e

portadores de broncopneumonia encontrou cerca de 1,83% de linfócitos em animais sadios e 3,98% em animais com broncopneumonia grave. No presente trabalho, não houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos, porém, nossos dados concordam com a literatura descrita onde foram encontrados cerca de 1,44 e 1,58% em animais sadios e portadores de afecções respiratórias, respectivamente, mostrando menor freqüência destas células, e sem alterações significativas entre os grupos.

Em relação aos eosinófilos, a maioria dos trabalhos confirma sua ausência ou pequena proporção no lavado traqueobrônquico de eqüinos e bovinos, clinicamente sadios ou portadores de doenças respiratórias (LAY et al., 1986; DERKSEN et al., 1989; NAYLOR et al., 1992; LAPOINTE et al., 1993; MCGORUM et al., 1993 a e b). Em geral, o encontro destas células se relaciona à etiologia do processo, ou seja, reações a vermes e fungos (DEEGEN et al., 1982; WHITWELL & GREET, 1984; LESTER, 1993). O encontro destas células nos animais estudados pode estar relacionado à verminose, devido a suscetibilidade desta espécie às helmintoses. A média encontrada em animais sadios maior do que em doentes, está relacionada a um animal com aumento marcante de eosinófilos no lavado (Tabela 11 – Apêndice). Embora o exame do sistema respiratório não tenha evidenciado alterações broncopulmonares nesses animais, talvez se realizado, o exame coproparasitológico poderia evidenciar verminose, já que esta espécie é altamente susceptível aos endoparasitas.

Os animais doentes do grupo estudado estavam em fases variadas de inflamação, apresentando-se em diferentes tempos de evolução do processo clínico, bem como localização, tendo em vista que alguns animais apresentavam apenas sinais de vias aéreas anteriores (4/23). Este fato sugere a necessidade de estudos quanto à função das células de defesa pulmonar na espécie ovina. Tendo em vista que, no exame geral do rebanho, houve um número acentuado de animais com sinais das vias aéreas anteriores, no entanto, apresentavam-se clinicamente sadios e não foram incluídos neste estudo.

Outras alterações encontradas em três animais mais gravemente acometidos, provavelmente de etiologia bacteriana, condizem com a literatura (RAKICH & LATIMER 1989), no que diz respeito ao aumento de neutrófilos,

poucos macrófagos, presença de muco, e bactérias. Também foram encontrados, nos lavados desses animais, macrófagos fagocitando bactérias, neutrófilos degenerados, bactérias livres na lâmina (cocos Gram negativos), e presença de partículas estranhas, provavelmente pólen, fagocitadas ou não.

A tentativa de estabelecimento do diagnóstico etiológico neste trabalho, por meio da coloração de Gram não teve sucesso, visto que foram encontradas bactérias coradas tanto em animais sadios quanto em doentes, principalmente na forma de cocos e menos freqüentemente, de estreptococos.

Em relação às colorações utilizadas, o método de Shorr foi mais elucidativo na diferenciação celular e visualização de núcleos, apresentando lâminas mais limpas, sem muitos artefatos e sem excesso de corante, permitindo boa visualização e diferenciação das células. Nesta coloração foram mais facilmente distinguíveis os linfócitos e eosinófilos. O Giemsa, também utilizado na diferenciação celular, em alguns casos apresentava as células muito escuras dificultando a diferenciação, no entanto, permitiu a visualização de bactérias livres e fagocitadas, do aspecto dos neutrófilos e muco, que não eram notados na outra coloração de um mesmo animal.

É interessante que se investigue tendência ao aumento das proporções celulares em ovinos portadores de broncopneumonia. O quadro clínico tem evolução contínua, não é estanque e está diretamente relacionado à intensidade do processo inflamatório, no momento da colheita do lavado traqueobrônquico, explicando a variação individual das avaliações citológicas dos animais doentes. Há necessidade do aprimoramento de técnicas diagnósticas nessa espécie, tendo em vista sua importância no contexto pecuário nacional, o grande número de animais criados, a taxa de sobrevivência aumentada de matrizes e reprodutores e o valor econômico desses animais com genética melhorada.

Com relação à metodologia utilizada para obtenção das amostras de via aéreas posteriores, o lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal mostrou-se eficiente na obtenção de amostras de vias distais, com representatividade celular da região broncopulmonar. É de fácil realização, podendo utilizar material de baixo custo e fácil manuseio. No entanto, requer treinamento e habilidade para passagem da sonda em menor tempo possível sem muito desconforto ao animal.

O resultado do estudo clínico e citológico deste trabalho, contribui com a atividade clínica, no sentido de reforçar a importância do diagnóstico das afecções respiratórias na espécie ovina, ressaltando a importância da avaliação clínica complementada com dados de exames auxiliares específicos para as vias aéreas, devendo-se tomar atenção às variações individuais e metodologia de colheita das amostras. A interpretação desses dados na rotina clínica pode direcionar o clínico quanto ao diagnóstico e terapia adequada.

7. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, pôde-se concluir que:

1. A presença ou a associação de sinais clínicos confirmou o diagnóstico e caracterizou a localização do processo respiratório.

2. Os sinais clínicos mais freqüentes em animais com processos respiratórios foram corrimento nasal, ruído traqueobrônquico aumentado, crepitação grossa, ruído laringotraqueal e reflexo de tosse.

3. O ruído traqueobrônquico aumentado e a presença de crepitação grossa estiveram presentes e associados em animais com broncopneumonia.

4. A freqüência respiratória aumentada é um dado importante no exame físico de ovinos com problemas respiratórios, no entanto, deve ser dada atenção ao conjunto de dados obtidos devido a fácil alteração deste parâmetro nesta espécie.

5. O resultado clínico baseado na pontuação para a presença de sinais foi maior em animais com enfermidades respiratórias, sendo progressivo o aumento dos escores para esses animais.

6. A técnica de lavado traqueobrônquico presta-se como metodologia para obtenção de amostras broncopulmonares para avaliação citológica na espécie ovina, sendo acessível e de fácil realização.

7. Há grande variação na contagem total de células nucleadas em animais com enfermidade respiratória, embora não seja um dado confiável para confirmação diagnóstica, quando avaliado individualmente.

8. Houve diminuição significativa na porcentagem de macrófagos e aumento da freqüência cardíaca nos animais com enfermidades respiratórias.

9. Animais com sinais de ruído traqueobrônquico aumentado, inspiração entrecortada e crepitação grossa, caracterizando envolvimento broncopulmonar, tiveram predomínio de neutrófilos e diminuição na população de macrófagos.

8. BIBLIOGRAFIA*

ABRAHAM, W.M.; SIELCZAK, M.W.; WANNER, A.; PERRUCHOUD, A.P.; BLINDER, L.; STEVENSON, J.S.; AHMED, A.; YERGER L.D. Cellular markers of inflammation in the airways of allergic sheep with and without allergen-induced late responses. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.138, n.6, p.1565-1571, dez. 1988.

AL-SULTAN, I.I.; AL-SADI, H.I.; YOUKANNA, S. O.; Pneumonia in Sheep and Goats in Iraq: A Pathological study. **Indian J. of Anim. Sciences**, v.58, n.9, p.1007-1010, 1988.

ALLEN, J.W., VIEL, L., BATEMAN, K.G., ROSENDAL, S. Changes in the bacterial flora of upper and lower respiratory tracts and bronchoalveolar lavage differential cell counts in feedlot calves treated for respiratory diseases. **Can. J. Vet. Res.**, v.56, p.177-83, 1992b.

ALLEN, J.W., VIEL, L., BATEMAN, K.G., ROSENDAL, S., SHEWEN, P. Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. **Can. J. Vet. Res.**, v.56, p.122-6, 1992a.

ANDREWS, A.H. Calf respiratory disease. In: ANDREWS, A.H., BLOWEY, R.W., BOYD, R.G., EDDY, R.G. (Eds). **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. Oxford: Blackwell, 1992a. Cap. 15, p.202-12.

ARAÚJO, S.A.C.; DANTAS, T.V.M.; SILVA J.B.A.; RIBEIRO, A.L.; RICARTE, A.R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Identificação do maedi-visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. **Arq. Inst. Biol.** v.71, n.4, p.431-436, 2004.

BARROS, M.S.R.M.; CASTRO, R.S.; TABOSA, J.H.C.; BRITO, M.F.; AMARAL, B. Colheita do fluido brônquio-alveolar de bezerros através da traqueocentese transcutânea. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 6, n.1, p.41-49, mai. 1994.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996.468p.

BAUGHMAN, R.; STROHOFER, S. KIM, C.K. Variation of differential cell counts of bronchoalveolar lavage fluid. **Pathol. Lab. Med.** v.110, p. 341-343, 1986.

BEECH, J. Cytology of Tracheobronchial Aspiretes in Horses. **Vet. Pathol.**, 12, p.157-164, 1975.

BEECH, J. Examination of the respiratory tract. In: _____. **Equine respiratory disorders**. Malven: Lea & Febiger, 1991a. Cap. 2, p.27-40.

BEECH, J. Technique of traqueobronchial aspiration in horse. **Equine Vet. Journal**, v.13, n.2, p.136 –137, 1981.

BÉGIN, R.; ROLA-PLESZYNSKI, M.; MASSÉ, S.; LEMAIRE, I.; SIRIOIS, P.; BOCTOR, M.; NADEAU, D.; DRAPEAU, G.; BUREAU, M. A. Asbestos – induced lung injury in the sheep model: the initial alveolitis. **Environmental Research**, v.30, p.195-210, 1983.

BELKNAP, E. B. Enfermidades do sistema respiratório. In: PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 119-43, 2005.

BELKNAP, E.B. Recognizing the clinical signs of BRSV infection. **Vet. Med.**, v.88, p.886-887, 1993.

BLACK, H.; DONACHIE, W.; DUGANZICH, D. An Outbreak of *Pasteurella multocida* pneumonia in lambs during a field trial of a vaccine against *Pasteurella haemolytica*. **New Zealand Veterinary Journal**, 45 : 2, p.58-62. 1997.

BOSSÉ, J.; BOILEAU, R.; BÉGIN, R.; GEOFFROY, M.; MARTEL, M.; DESMARAIS, Y. Chronic allergic airway disease in sheep model: functional an lung-lavage features. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.79, n.2, p.339-344, fev. 1987.

BOULJIHAD, M.; BERRAG, B.; LEIPOLD, H.W. Gross and Light- microscopic Features of Ovine Pulmonary Hydatidosis and Verminous Pneumonias in Marocco. **J. Vet. Med. B.**, v.42, n.9, p.513-521, 1995.

BRAZ, M.P. **Semiologia médica animal**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. 644p.

BREEZE, R. Structure, function, and metabolism in the lung. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p.219-35, 1985a.

BREEZE, R. Parasitic Bronchitis and Pneumonia. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p.277-87, 1985b.

BREIDER, M.A., WALKER, R.D., HOPKINS, F.M., SCHULTZ, T.W., BOWERSOCK, T.L. Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. **Can. J. Vet. Res.**, v.52, p.205-9, 1988.

BROGDEN, K. A.; LEHMKUHL, H. D.; CUTLIP, R.C. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. **Vet. Res.**, Paris, v. 29, p. 233-254, 1998a.

BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.; HUTTNER, K.M. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infection and Immunity*. v.66, n.12, dez. 1998b.

BROWN, T.T., ANANABA, G. Effect of respiratory infections caused by bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus on bovine alveolar macrophage functions. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, p.1447-51, 1988.

BRYSON, D.G. Calf pneumonia. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p. 237-57, 1985.

BRYSON, D.G., McFERRAN, J.B., BALL, H.J., NEILL, S.D. Observations on outbreaks of respiratory disease in calves associated with parainfluenza type 3 virus and syncytial virus infection. **Vet. Rec.**, v.104, p.45-9, 1979.

BRYSON, D.G., McNULTY, M.S., McCracken, R.M., CUSH, P.F. Ultrastructural features of experimental parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. **J. Comp. Pathol.**, v.93, p.397-414, 1983.

BURKHARD, M.; VALENCIANO, A.; BARGER, A. Sistema respiratório. In; RASKIM, R.E.; MEYER, D.J. Atlas de citologia de cães e gatos. Roca: São Paulo, 2003, p. 113-156.

BURRELLS, C. Cellular and humoral elements of the lower respiratory tract of sheep. Immunological examination of cells and fluid obtained by bronchoalveolar lavage of normal lungs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.10, n.2-3, p.225-43, nov. 1985.

BURRELLS, C.; SUTHERLAND, A,D, Phenotypic analysis of lymphocytes obtained by bronchoalveolar lavage of normal sheep. **Vet Immunol Immunopathol.** v.40, n.1, jan. 1994.

BURRELLS, C., WILLIAMS J. T. Bronchoalveolar lavage of the live anaesthetised sheep. **Res Vet Sci.** v.42. n.1, p.109-112, jan. 1987.

BURSCH, G.E., JENSEN, B. The use of cytology in the diagnosis of equine respiratory infections. **Equine Pract.**,v.9, p.7-10, 1987.

CASTLEMAN, W.L., LAY, J.C., DUBOVI, E.J., SLAUSON, D.O. Experimental bovine respiratory syncicial virus infection in conventional calves: light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavaged lung cells. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.547-54, 1985.

CLARK, C.K.; LESTER, G.D.; VETRO, T.; RICE, B. Bronvhoalveolar lavage horse: effect of exercise and repeated sampling on cytology. **Aust. Vet. J.** v.72, n.7, jul. 1995.

COHEN, A.B., ROSSI, M. Neutrophils in normal lungs. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v.127, p.83-9, 1983.

COLES E. H. **Patologia Clínica Veterinária.** 3ed. Macule: São Paulo, p.390-426, 1984.

COLLIE, D. D. S.; BAKER, A.; MAUCLINE, S.; PORTEOUS, D.; McLACHLAN G. Ovine bronchoalveolar lavage cellularity: reproducibility and the effect of multiple repeated lavage. **Res. Vet. Sci.** v. 67, n. 2, p.137-40, 1999.

- CORDIER, G. GUIGUEN, F.; CADORÉ J.L.; COZON, G.; JACQUIER. M.F.; MORNEX J.F. Characterization of the lymphocytic alveolitis in visna-maedi virus-induced interstitial lung disease of sheep. **Clin. Exp. Immunol.** v.90, p. 18-24, 1992.
- CORSTVET, R.E.; RUMMAGE, J.A.; HOMER, J.T. Recovery of pulmonary alveolar macrophages from nonanesthetized calves. **Am. J. Vet. Res.**, 43:12, p.2253-2254. 1982.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Inflammation and repair. In: _____. **Pathologic basis of disease.** 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. Cap. 3, p.51-92.
- COUËTIL L. L.; ROSENTHAL F. S.; DeNICOLA D. B.; CHILCOAT C. D. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n. 4, p.538-46, 2001.
- CRANDELL, R.A. Viral diseases of cattle. In: HOWARD, J.L. **Current veterinary therapy 3: food animal practice.** 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p.417-9.
- CRANE, S.A.; ZIEMER, E.L.; SWEENEY, C.R. Cytologic and bacteriologic evolution of tracheobronchial aspirates from clinically normal foals. **Am. J. Vet. Res.**, 50:12, p.2042-2048. 1989.
- CRISMAN, M.V., HODGSON, D.R., BAYLY, W.M., LIGGITT, H.D. Effects of transport on constituents of bronchoalveolar lavage fluid from horses. **Cornell Vet.**, v.82, p.233-46, 1992.
- CURTIS, R.A., VIEL, L., McGUIRK,S.M., RADOSTITS, O.M., HARRIS, F.W. Lung sounds in cattle, horses, sheep, and goats. **Can. Vet. J.**, v.27, p.170-2, 1986.
- DANIELE, R.P.; ELIAS, J.A.; EPSTEIN, P.E.; ROSSMAN, M.D. Bronchoalveolar lavage: role in the patogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease. **Ann. Intern. Med.** v.102, n. 93, p.93-108, 1985.

DEEGEN, E., MÜLLER, P., PETZOLD, K. Bronchoscopy and cytological examination of bronchial secretions of horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Poumon-Coeur**, v.38, p.311-6, 1982.

DERKSEN, F.J., SCOTT, J.S., MILLER, D.C., SLOCOMBE, R.F., ROBINSON, N.E. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.132, p.1066-70, 1985.

DERKSEN, F.J.; BROWN, C.M.; SONEA, I.; DARIEN, B.J.; ROBINSON, N.E. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. **Equine Vet. Journal**, 21:1, p.23-26. 1989.

DIESEL, D.A., LEBEL, J.L., TUCKER, A. Pulmonary particle deposition and airway mucociliary clearance in cold-exposed calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.1665-71, 1991.

DIFFAY, B.C.; MCKENZIE, D.; WOLF, C.; PUGH, D.G. Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca p. 1-19, 2005.

DIMRI, U.; LONKAR, P.S.; SRIVASTAVA, C.P.; BHAGWAN, P.S.K. An Outbreak of Pneumonia Due to *Pasteurella multocida* in Sheep. **Indian Vet. J.**, 71 : 12, p.1163-1167. 1994.

DIXON, P.M. Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. **Vet. Rec.**, v.131, p.229-35, 1992.

DIXON, P. Collection of tracheal respiratory secretions in the horse. **In Practice**, v.2, p.66-69. 1995.

DROMMER, W., KAUP, F.J., IREGUI, C., DEEGEN, E. Lung function and pulmonary diseases in the horse (1986) apud DIXON, P.M. Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. **Vet. Rec.**, v.131, p.229-35, 1992.

DUNBAR, M.R.; WARD, A.C.S.; POWER, G. Isolation of *Pasteurella haemolytica* from Tonsillar biopsies of Rocky Mountain Bighorn Sheep. **Journal of Wildlife Diseases**, v.26, n.2, p.210-213, 1990.

DYER, R.M., ERNEY, S., SPENCER, P., BENSON, C.E. Oxidative metabolism of the bovine alveolar macrophage. **Am. J. Vet. Res.**, v.50, p.448-454, 1989.

ESPINASSE, J., ALZIEU, J.P., PAPAGEORGIOU, C., BEGUIN, J.C., VAN GOOL, F. Use of transtracheal aspiration to identify pathogens in pneumonic calves. **Vet. Rec.**, v.129, p.339, 1991.

FALK, G. A.; OKINAKA, J. A.; SISKIND, W. Immunoglobulins in the bronchial washings of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.105, p.14-21, 1972.

FEITOSA, F. L. **Semiologia Veterinária a arte do diagnóstico**. Roca: São Paulo, 2004, p.807.

FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arq. Bras. Med. Vet.** v. 52, n. 6, 2000.

FIGUEIREDO, J. B. Pasteureloses (*Pasteurellosis*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 21, n. 3, p. 40-48, 1997.

FORGARTY, V. A broncoalveolar lavage technique for routine diagnostic purposes. **Equine Vet. Education**, 2:2, p.102-104. 1990.

FORGARTY, U.; BUCKLEY, T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. **Equine Vet. Journal**, v.23, n.6, p. 434-437, 1991.

FORGARTY, U., QUINN, P.J., HANNAN, J. Bronchopulmonary lavage in the calf - a new technique. **Ir. Vet. J.**, v.37, p.35-8, 1983.

FORMAN, A.J., BABIUK, L.A., BALDWIN, F., FRIEND, S.C.E. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection of calves on cell populations recovered by lung lavage. **Am. J. Vet. Res.**, v.43, p.1174-9, 1982.

FREEMANN, K.P.; ROSZEL, J.F. Equine Cytology Patterns in Respiratory Conditions of Probable or Known Infectious Origin. **Continuing Education**, 19:3, p.378-383. 1997.

GARCIA, M.; LIBERA, A.M.M.P.D. BARROS FILHO, I.R. **Manual de semiologia e Clínica dos Ruminantes**. São Paulo: Varela, 1996. 247p.

GILMOUR, N. J. L.; ANGUS, K. W.; GILMOUR, J. S. Pasteurellosis In. MARTIN, W. B.; AITKEN, I. D. **Diseases of Sheep**. 2ed 1991a. p.133-139.

GILMOUR, N.J.L.; GILMOUR, J.S. Diagnosis of Pasteurellosis in Sheep. In: BODEN, E. **Sheep and Goat Practice**. 1991. p.122-32.

GONÇALVES, R.C. **Estudo da flora bacteriana traqueobrônquica em bezerros clinicamente sadios e portadores de pneumonia, na região de Botucatu – SP**. 1987. 43f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista -Botucatu.

GONÇALVES, R.C. **Estudo Clínico e citológico em Bezerros clinicamente Sadios e Portadores de Broncopneumonia Moderada e Grave. - O lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico**. 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista -Botucatu.

GONÇALVES, R.C.; KUCHEMUCK, M.R.G.; ALMEIDA, C.T. Lavagem Traqueobrônquica por Traqueocentese em Bovinos. **Vet. e Zoot.** v.2, p.17-25. 1990.

GONÇALVES, R.C., KUCHEMUCK, M.R.G.; CURI, P.R, CHIACCHIO, S.B.; ALMEIDA, C.T.; BORGES, A.S. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros/Clinical differentiation of bronchopneumonia severity in calves. **Ciência Rural** (UFSM), ;v.31, n.2, p.263–269, 2001.

GONÇALVES, R.C. Semiologia do Sistema Respiratório. In: FEITOSA F. L. **Semiologia Veterinária**, 2004, p.313 - 331.

GONÇALVES R.C.; BARIONI G. Exame clínico do aparelho respiratório de bezerros. **Rev. Educ. Contin.** CRMV-SP v. 3, n.1, p. 4-13, 2000.

GONÇALVES, R.C., MATTOS, M.C.F.I., KUCHEMUCK, M.R.G. *et al.* Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.3, p.307-311, jun. 2004.

GÓRIN, A.B.; STEWART, P.; GOULD, J. Concentrations of immunoglobulin classes in subcompartments of the sheep lung. **Res. Vet. Sci.** v.26, p.126-28, 1979.

GRANDGUILLOT, L.; FAIRBROTHER, J.M.; VRINS, D. Use of a Protected Catheter Brush for Culture of Lower Respiratory Tract in Horses with Small Airway Disease. **Can. J. Vet. Res.**, 55, p.50-55. 1991.

GRIFFIN, D. Economic impact associated with respiratory diseases in beef cattle. **Vet. Clin. North. Am.: Food Anim. Proct.** Philadelphia: sounders. 1997. p. 367-377.

HANCOCK, R.D.; FALLAVENA, L.C.B.; RIBEIRO, L.A.O. Pneumonic pasteurellosis due to *P. multocida* in flock of lambs in Brazil. **Veterinary Record**, 128, p.154-155. 1991.

HAWKINS, E.C.; DENICOLA, D.B. Colletion of bronchoalveolar lavage fluid in cats, using an endotracheal tube. **Am. J. Vet. Res.**, 50, p.855-858. 1989.

HEWSON, J.; VIEL, L. Sampling microbiology and cytology of the respiratory tract. In: LEKEUX, P. **Equine respiratory diseases**. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), jun. 2002.

HINCHCLIFF, K.W., BYRNE, B. Clinical examination of the respiratory system. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.7, p.1-26, 1991.

HOFFMAN, A.M., VIEL, L. Techniques for sampling the respiratory tract of horses. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.13, p.463-475, 1997.

HOFFMAN, A.M., LAURENT, V., STAEMPFLI, H.R., MUCKLE, C.A., YAGER, J.A. Sensitivity and specificity of bronchoalveolar lavage and protected catheter brush methods for isolating bacteria from foal with experimentally induced pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae*. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.1803-7, 1993.

HUNNINGUAGE, G.M.; GADEK, J.E.; KAWANAMI, O.; FERRANS, V.J.; CRYSTAL, R.G. Inflammatory and imune processes in the human lung in health and disease: evolution by bronchoalveolar lavage. **Am. J. Path.**, 97, p.149-198, 1979.

IBGE Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2004/default.shtm>.

Acesso em. 16 set. 2006.

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

KASTELLO, M.D.; EMMERT, A.D.; DENSON R.F.; KISHIMOTO, R.A. Recovery of alveolar macrophages from Rhesus and Cynomolgus macaques by lung lavage. **Am. J. Vet. Res.** v.40, n.2, p. 271-273, fev. 1979.

KIMMAN, T.G., ZIMMER, G.M., STRAVER, P.J., LEEUW, P.W. Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.143-147, 1986.

KIMBERLING, C.V. **Jensen and Swift's Diseases of Sheep**. 3^o ed., 1988, p.94.

KOSS, L.G. **Diagnostic cytology and its histopathologic bases**. 4. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. 2V.

KOTLIKOFF, M.I., GILLESPIE, J.R. Lung sounds in veterinary medicine: Part I. Terminology and mechanisms of sound production. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.5, p.634-44, 1983.

KOTLIKOFF, M.I., GILLESPIE, J.R. Lung sounds in veterinary medicine: Part II. Deriving clinical information from lung sounds. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.6, p.462-7, 1984.

LAITINEN, L.A.; HEINO, M.; LAITINEN, A.; KAVA, T.; HAAHTELA, T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.** v.131, p.599-606, 1985.

LAPOINTE, J.M., LAVOIE, J.P., VRINS, A.A. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.1310-6, 1993.

LARSON, V.G; BUSCH, R.H Equine tracheobronchial lavage: Comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. **Am. J. Vet. Res.** v.46, n.1, 1985.

LAVIOLETTE, M.; CARREAU, M.; COULOMBE, R. Bronchoalveolar lavage cell differential on microscope glass cover. A simple and accurate technique, **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.138, p.451-457, 1988.

LAY, J.C., SLAUSON, D.O., CASTLEMAN, W.L. Volume-controlled bronchopulmonary lavage of normal and pneumonic calves. **Vet. Pathol.**, v.23, p.673-680, 1986.

LEDWOZYW, A., RUCINSKI, T., STOLARCZYK, H., SIWEK, A. The involvement of polymorphonuclear leukocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves VII. Granulocyte activation by arachidonic acid. **Acta Vet. Hung.**, v.40, p.279-84, 1992.

LEDWOZYW, A., STOLARCZYK, H. The involvement of polymorphonuclear leukocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves I. Activated granulocyte induced lipid peroxidation in red blood cells. **Acta Vet. Hung.**, v.39, p.175-85, 1991a.

LEDWOZYW, A., STOLARCZYK, H. The involvement of polymorphonuclear leukocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves II. Granulocyte-induced changes in erythrocyte membrane phospholipid topology. **Acta Vet. Hung.**, v.39, p.187-95, 1991b.

LEHRER, S. Entendendo os sons pulmonares. Roca, São Paulo. 1990, p.147.

LEID, R.W., POTTER, K.A. Inflammation and mediators of lung injury. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p.377-400, 1985.

LE JAN, C., EL AZHARY, M.A.S.Y., GALLINA, M. Characterization of cells from the respiratory tract of calves. **Ann. Rech. Vet.**, v.11, p.301-6, 1980.

LEGASTELOIS, I.; COTTIN, V.; MORNEX, J.F.; CORDIER G. Alveolar macrophages from sheep naturally infected by visna-maedi virus contribute to IL-8 production in the lung. **Vet. Immun. Immunopath.** v.59, p.131-139, abr, 1997.

LESTER, G. Case presentation. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.15, p.737-41, 1993.

LIGGITT, H.D. Defense mechanisms in the bovine lung. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p.347-66, 1985.

LINKS, I. J.; SEARSON, J. E.; GODWIN, J.; GLASTONBURY, J. R.; PHILBEY, A. P.; MATTHEWS, L. M. *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* infections in ruminants and pigs in Southern New South Wales. In: **International workshop**, 1992, Bali. Proceedings. Camberra: **ACIAR**, 1993. n. 43, p. 108-111.

LOPEZ, A., MAXIE, G., RUHNKE, L., SAVAN, M., THOMSON, R.G. Cellular inflammatory response in the lungs of calves exposed to bovine viral diarrhoea virus, *Mycoplasma bovis*, and *Pasteurella haemolytica*. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.1283-6, 1986.

LOTTI, U.; NIEBAUER, G.W. Tracheobronchial Foreign Bodies of Plant Origin in 153 Hunting Dogs. **Continuing Education Article**. n.2, 14:7, p.900-904. 1992.

LUJÁN, L.; BEGARA, I.; COLLIE, D. D. S.; WATT, N. J. Phenotypic analysis of cells in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of maedi visna-infected sheep. **Clin Exp. Immunol.** v.91, p.272-276, 1993.

LUJÁN, L.; BEGARA, I.; COLLIE, D. D. S.; WATT, N. J. CD8⁺ lymphocytes in bronchoalveolar lavage and blood: in vivo indicators of lung pathology caused by maedi-visna virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.49, p.89-100, mar.1995.

MAIR, T.S.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. **Equine Vet. Journal**, 19:5, p.458-462. 1987.

MALAVOLTA, L. Ovelhas ganham espaço em São Paulo. **Agrofolha**, cad 6, pág. 1. 16/01/96.

MANSFIELD, L.S.; GAMBLE, H.R., BAKER, J.S., LICHTENFELS, J.R. Lungworm infection in sheep flock in Maryland. **JAVMA**, v.202, n.4, 601-606. 1993.

MANSMANN, R.A.; KING, C. How to perform bronchoalveolar lavage in practice. **AAEP Proceedings**, v.44, p.186-188, 1998.

MANSMANN, R.A.; KNIGHT, H.D. Transtracheal Aspiration in the Horse. **JAVMA**, 160:11, 171-179, 1972.

MARKHAN, R.J.F., WILKIE, B.N. Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages: cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.41, p.18-22, 1980.

MARTIN,W.B. Respiratory Infeccions of sheep. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**19:3, p.171-179, 1996.

MARTIN, W.B.; AITKEN, I.D. **Diseases of sheep**. 2.ed. London: Blockewell Scientific Publications, 1991, 418p.

McGORUM, B.C., DIXON, P.M., HALLIWELL, R.E.W., IRVING, P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvest from different segments of the equine lungs. **Res. Vet. Sci.**, v.55, p.57-9, 1993.

McGORUM, B.C., DIXON, P.M., HALLIWELL, R.E.W., IRVING, P. Evaluation of urea and albumen as endogenous markers of dilution of equine bronchoalveolar lavage fluid. **Res. Vet. Sci.**, v.55, p.52-6, 1993b.

McGUIRE, R.L., BABIUK, L.A. *In vitro* culture characteristics of bovine alveolar macrophages. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v.31, p.251-60, 1982.

MEYER D.J. Obtenção de manuseio das amostras para exame Citológico. In: RASKIN R.E. & MEYER D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003, p.01-14.

MORI, E. **Avaliação da função dos macrófagos alveolares após infecção experimental em cavalos (*Equus caballus* – Linnaeus, 1758) por herpesvírus eqüino tipo 1 (HVE-1)**. 2000. 98f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORI, E.; MORI, C.M.C.; FERNANDES, W.R. Avaliação da função de macrófagos alveolares em cavalos clinicamente sadios. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.53, n.2, 2001.

MORNEX, J.F.; LENA, P.; LOIRE, R.; COZON, G.; GREELAND, T.; GUIGEN, F.; JACQUIER, M.F.; CORDIER, G. Lentivirus-induced interstitial disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. **Vet. Res.** v.25, p. 478-488, 1994.

NAYLOR, J.M., CLARK, E.G., CLAYTON, H.M. Chronic obstructive pulmonary disease: usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. **Can. Vet. J.**, v.33, p.591-8, 1992.

OJIMA A.L.R.O.; BEZERRA L.M.C.; OLIVEIRA A.L.R.O. Caprinos e Ovinos em São Paulo atraem Argentinos. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, Instituto de Economia Agrícola IEA, v.1, n.1, jan/2006. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=4462>. Acesso em: 16/12/2006.

OLIVEIRA, M.L.C.S.; MOTA, A.R.C.; VIERO, R.M. Citotecnologia: Manual de normas técnicas. Botucatu: Laboratório de Citologia, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, 2000, 24p.

PADRID, P. A.; FELDMAN, B. F.; FUNK, K.; SAMITZ, E. M.; REIL, D.; CROSS, C. E. Cytologic, microbiologic, and biochemical analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained from 24 healthy cats. **Am J Vet Res.**;v.52, n.8, p.1300-1307, aug. 1991.

PECORA, D.V. A method of securing uncontaminated tracheal secretions for bacterial examination. **J. Thoracic Surg.**, v.37, p.653-654, 1959.

PORTER, J.F.; CONNOR, K.; KRUEGER, N.; HODGSON, J.C.; DONACHIE, W. Predisposition of Specific Pathogen-free Lambs to *Pasteurella haemolytica* Pneumonia by *Bordetella parapertussis* Infection. **J. Comp. Path.**, 112 - 4, p.381-389. 1995.

PRINGLE, J.K. Assessment of ruminant respiratory system. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.8, p.233-41, 1992.

PRINGLE, J.K., VIEL, L., SHEWEN, P.E., WILLOUGHBY, R.A., MARTIN, S.W., VALLI, V.E.O. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. **Can. J. Vet. Res.**, v.52, p.239-48, 1988.

PUGH, D. G. Clínica de Ovinos e Caprinos. São Paulo: Roca, 2005 p. 513.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. London: W. B. Saunders, 2002. 1873p.

RAKICH, P.M.; LATIMER, K.S. Cytology of the respiratory tract. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** v.19, n.5, p.823-850, set. 1989.

RAO, T.M.; CHARYULU, E.K.; PRASAD, R.D.D.; SRINIVASULU, D. & MUNIRATHNAM, D. Some Observations on Incidence and Mortality of Pneumonia in Sheep. **Indian J. Anim. Hlth.** 32 : 1, p.77-78. 1993.

REBHUN, W.C., GUARD, C., RICHARDS, C.M. O Exame Clínico. In: **Doenças do gado leiteiro**. Roca:São Paulo, 2000. p 1-12.

REYNOLDS, H.Y. Bronchoalveolar lavage. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.135, p.20-263, 1987.

REYNOLDS, H.Y. Lung inflammation: role of endogenous chemotactic factors in attracting polymorphonuclear granulocytes. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.127, p.816-24, 1983.

REYNOLDS, H.Y.; NEWBALL, H.H. Analyses of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. **J. Lab. Clin. Med.** v.84, p. 559-573, 1974.

RIBBLE, C.S., MEEK, A.H., JANSEN, E.D., GUICHON, P.T., JIM, G.K. Effect of time of year weather, and pattern of auction market sales on fatal fibrinous pneumonia (shipping fever) in calves in a large feedlot in Alberta (1985-1988). **Can. J. Vet. Res.**, v.59, p.167-72, 1995.

RICHARDS, A.B., RENSHAW, H.W. Functional and metabolic activity of bovine pulmonary lavage cells phagocytically stimulated with pathogenic isolates of *Pasteurella haemolytica*. **Am. J. Vet. Res.**, v.50, p.329-34, 1989.

ROLA - PLESZCZYNSKI, M.; SIROIS, P.; BÉGIN, R. Cellular and Humoral Components of Bronchoalveolar Lavage In: The Sheep. **Lung**. 159, p.91-99. 1981.

ROOK, J.S.; SCHOLMAN, G.; WING-PROCTOR, S.; SHEA, M. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. **The Vet. Clin. of North Am. Food Anim. Practice**, 6:3, p.531-562. 1990.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v.20, p.329-335, 1947.

ROSSIER, Y., SWEENEY, C.R., ZIEMER, E.L. Bronchoalveolar lavage fluid cytologic findings in horses with pneumonia or pleuropneumonia. **J.A.V.M.A.**, v.198, p.1001-4, 1991.

ROSZEL, J.F., FREEMAN, K.P., SLUSHER, S.H. Equine pulmonary cytology. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 31., 1986. Toronto. **Proceedings...Toronto: American Association of Equine Practitioners**, 1986. p.171-81.

ROUDEBUSH, P. Lung sounds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.181, p.122-6, 1982.

SALTINI, C.; HANCE, A. J.; FERRANS, V. J.; BASSET, F.; BITTERMAN, P. B.; CRYSTAL, R. G. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. **Am. Rev. Respir. Dis.** v. 130, p. 447-52, 1984.

SAVAGE, C.J. Evaluation of the equine respiratory system using physical examination and endoscopy. **Vet. Clin. North Am. Equi. Pract.** v.13, n.3, dez. 1997.

SCOTT, P.R. Field study of undifferentiated respiratory disease in housed beef calves. **Vet. Rec.**, v.134, p.325-7, 1994.

SEALS, W. Tracheal wash as a way to diagnose equine respiratory infection. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, v.75, p.1983-4, 1980.

SLAUSON, D.O., LAY, J.C., CASTLEMAN, W.L., NEILSEN, N.R. Alveolar macrophage phagocytic kinetics following pulmonary parainfluenza-3 virus infection. **J. Leucocyte Biol.**, v.41, p.412-20, 1987.

SLOCOMBE, R., MALARK, J., INGESOLL, R., DERKSEN, F.J., ROBINSON, N.E. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurelosis in calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.2253-8, 1985.

SLOCOMBE, R., MULKS, M., KILLINGSWORTH, C.R., DERKSEN, F.J., ROBINSON, N.E. Effect of *Pasteurella haemolytica* — derived endotoxin on pulmonary structure and function in calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, p.433-8, 1990.

STÖBER, M. Aparelho Respiratório. In. ROSENBERGER **Exame Clínico dos Bovinos**, 3^o ed, 1993. p.139-165.

SWEENEY, C.R., BEECH, J. Bronchoalveolar lavage In: BEECH, J. **Equine respiratory disorders**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991. Cap. 4, p.55-61.

SWEENEY, C.R., HUMBER, K.A., ROBY, K.A.W. Cytologic findings of tracheobronchial aspirates from 66 Thoroughbred racehorses. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.1172-5, 1992a.

SWEENEY, C.R.; HUMBER, K.A.; ROBY, K.A. Tracheal washes in Health Thoroughbred Racehorses: Cytology Findings. **Equine Practice**, 15: 5, p.9-12. 1993.

SWEENEY, C.R., ROSSIER, Y., ZIEMER, E.L., LINDBORG, S. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.1376-9, 1992b.

SWEENEY, C.R.; SMITH, J.A. Moléstias do Sistema Respiratório. In. SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**, Vol.1, 1993. p501-517.

SWEENEY, C.R., SWEENEY-III, R.W., BENSON, C.E. Comparison of bacteria isolated from specimens obtained by use of endoscopic guarded tracheal swabbing and percutaneous tracheal aspiration in horses. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.195, p.1225-9, 1989.

TAYLOR, G., THOMAS, L.H., STOTT, E.J. Effect of vaccination on cell populations in lung washes from calves after infection with respiratory syncytial virus. **Res. Vet. Sci.**, v.47, p.231-5, 1989.

TERRA L. R. Histórico, Exame Físico e Registro dos Ruminantes. In: SMITH B. 3.ed. **Medicina Interna de Grandes Animais**. Manole:Barueri-SP, 2006, p. 3-14.

TYLER, R.D.; COWELL,R.L.; BALDWIN, C.J.; MORTON, R.J. Introduction In.: COWELL, R.L. & TYLER, R.D. **Diagnostic cytology of the dog and cat**, Califórnia: American veterinary publications, 1989. p.1-19.

VAIL, D. M.; MAHLER, P. A.; SOERGEL, S. A. Differential cell analysis and phenotypic subtyping of Lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid from clinically normal dogs. **Am. J. Vet. Res.** v. 56, n. 3, p. 282-85, 1995.

VIANA L. **Pesquisa de *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* e *Pasteurella multocida* em ovinos clinicamente sadios e portadores de afecções respiratórias na região de Botucatu–SP**. 2003. 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VIEL, L. **Structural functional correlations of the lung in horses with small airway disease** - Phd Dissertation. University of Guelph, Ontario, Canada, 1983.

VIEL, L. Small airway disease as a vanguard for chronic obstructive pulmonary disease. **Vet. Clin. North Am. Equi. Pract.** v.13, n.3, dez. 1997.

VIERA, F.J.B.; TRIGO T.,F.J.; MEZA, L.J.; ROMERO, F.A.; PÉREZ, G.T.; GÜEMES, F.S. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. **Vet. Méx.**, 27: 2, p.107-112. 1993.

WALKER, R.D., HOPKINS, F.M., SCHULTZ, T.W., McCRACKEN, M.D. Changes in leukocytes populations in pulmonary lavage fluids after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.2429-33, 1985.

WEEKLEY, L.B., VEIT, H.P. Potential morphologic and physiologic factors that may predispose the bovine lung to respiratory disease. **Compend. Contin. Educ.**, v.17, p.974-80, 1995.

WILKIE, B.N., MARKHAN, R.J.F. Bronchoalveolar washings cells and immunoglobulins of clinically normal calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.42, p.241-3, 1981.

WILKINS P.A.; BAKER J.C.; AMES T.R. Doenças do Sistema Respiratório. In: SMITH B. **Medicina Interna de Grandes Animais**. Manole, Barueri-SP: 3ed. p. 479-91, 2006.

WILCOX, M.; KERVITSKY, A.; WATTERS, L.C.; KING JR., T.E. Quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. Comparison os cytocentrifuge preparations with the filter method. **Am. Rev. Respir. Dis.** v.138, p.74-80, 1988.

WILLOUGHBY, R., ECKER, G., McKEE, S., RIDDOLLS, L., VERNAILLEN, C., DUBOVI, E., LEIN, D., MAHONY, J.B., CHERNESKY, M., NAGY, E., STAEMPFLI, H. The effects of Equine Rhinovirus, Influenza Virus and Herpesvirus infection on tracheal clearance rate in horses. **Can. J. Vet. Res.**, v.56, p.115-21, 1992.

WILSON, J.H. The art of physical diagnosis. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.8, p.169-76, 1992.

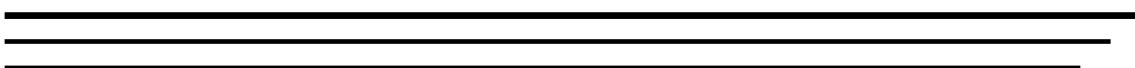
WILSON, W.D.; LOFSTEDT, J. Alterações na Função Respiratória. In: SMITH B. **Medicina Interna de Grandes Animais**. Manole, Barueri-SP: 3ed. p. 3-14, 2006.

WHITWELL, K.E.; GREET, T.R.C. Collection and evolution of traqueobronchial washes in the horse. **Equine Veterinary Journal**, 16:6, p.499-508. 1984.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall,, 1984. 450p.

ZINKL J. G. Lowe Respiratory Tract. In. COWELL R. L.; TYLER R. D. **Diagnostic Cytology and Hematology of the horse**. Missouri: Mosby. 2 ed. 2002 p. 73-86.

APÊNDICE



APÊNDICE

QUADRO 01. Plano de exame clínico.

EXAME CLÍNICO				
Identificação:				
Espécie:	raça:	sexo:	idade:	Estado Nutricional:
Proprietário:				
Endereço:			Telefone:	
Parâmetros vitais:	FC: bpm	FR: mpm	MR: / 5'	Temp: °C
Atitude:	Mucosas:			
Inspeção:				
Muflo:	normal	ressecado		
Narinas:	Secreção	ausente	presente	cor
	NDN			aspecto
				odor
				unilateral
				bilateral
	Ar expirado	normal unilateral	diminuído bilateral	ausente
Traquéia:	NDN	crepitação		som laringotraqueal aumentado
	Reflexo da Tosse:	negativo	positivo	tosse seca
				tosse produtiva
Pulmão:	Tipo respiratório:	eupnéia	dispnéia	inspiratória
				expiratória
				mista
	Postura:	normal	ortopneica	
	Auscultação:	Crepitação fina	ausente presente	lado direito
				lado esquerdo
		Crepitação grossa	ausente presente	porção:
				lado direito
				lado esquerdo
				porção:
		Ronco	ausente	presente
		Sibilo	ausente presente	lado direito
				lado esquerdo
				porção:
		Som traqueobrônquico	NDN aumentado	lado direito
				lado esquerdo
				porção:
		Som bronquiobronquiolar	NDN aumentado	lado direito
				lado esquerdo
				porção:
		Propagação cardíaca	NDN aumentado	lado direito
				lado esquerdo
				porção:
	Percussão:	claro	maciço	
	Área de silêncio:			
	Roce Pleural:			
Linfonodos				
Observações:				

TABELA 7. Valores individuais dos parâmetros vitais dos animais do grupo sadio (GS – n= 19).

Animais	FC bpm	FR mpm	T °C
11	100	36	38,5
13	104	36	39,5
20	80	40	39,3
21	100	32	39,3
22	96	36	39
23	100	36	40,4
24	96	32	39,5
25	88	32	38,7
29	100	40	39,5
30	78	36	39
35	74	28	38,9
36	88	28	38,2
37	80	42	38,4
39	70	24	38,2
49	76	32	39,2
50	80	28	39,1
51	84	28	39
52	96	36	38,8
53	96	32	38,5
Média	88,7	33	39,00
Mediana	88,0	32	39,00
Desvio-padrão	10,7	5	0,54

TABELA 8. Valores individuais dos parâmetros vitais dos animais do grupo com afecções respiratórias (GD – n= 23).

Animais	FC bpm	FR mpm	T °C
8	112	40	39,5
9	92	36	39
10	100	32	39,2
12	104	36	38,8
14	104	36	38,8
15	88	48	39,1
16	116	52	38,5
17	88	32	39,6
18	100	40	39,5
27	104	44	39,6
31	70	24	40,2
32	106	24	38,4
34	90	30	38,1
38	100	44	39,6
40	88	36	38,5
41	104	36	38,7
43	60	36	38,2
44	120	36	37,8
45	76	40	37,5
46	72	20	38
47	120	40	38,3
48	116	40	38
54	100	36	39,2
Média	96,96	36,43	38,79
Mediana	100,00	36,00	38,8
Desvio-padrão	16,24	7,43	0,70

TABELA 9. Contagem total de células nucleadas e hemácias do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios (GS – n=19).

Animais	Células nucleadas / ml	Hemácias / ml
11	19800	1100
13	25850	1100
20	165000	202400
21	88550	9900
22	149050	28600
23	58500	5500
24	33000	3850
25	152350	41250
29	51700	1100
30	57750	9350
35	45650	2200
36	9900	1100
37	27500	0
39	4400	0
49	81400	81950
50	58850	11000
51	74250	1000
52	10450	0
53	114400	67100
Média	64650,0	24657,9
Mediana	57750,00	3850,00
Desvio-padrão	49674,3	49167,2

TABELA 10. Contagem total de células nucleadas e hemácias do lavado traqueobrônquico de ovinos portadores de afecções respiratórias (GD – n=23).

Animais	Células nucleadas / ml	Hemácias / ml
8	82900	6750
9	39600	709500
10	86900	44500
12	41250	1100
14	130350	2750
15	32450	9350
16	52250	8250
17	12100	2750
18	39500	3850
27	64300	8250
31	156650	3300
32	128600	6600
34	163350	2200
38	177100	0
40	13750	0
41	49500	1100
43	34650	1100
44	166000	1100
45	71500	7700
46	232650	259600
47	105600	3300
48	2350000	8000
54	6000	0
Média	184215,2	47437,0
Mediana	71500,0	3300,0
Desvio-padrão	476122,8	153963,4

TABELA 11. Contagem diferencial de células provenientes de lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios (GS – n=19).

Animais	Macrófagos %	CEC %	Neutrófilos %	Linfócitos %	Eosinófilos %
11	35,26	1,32	63,16	0,26	0,00
13	85,00	9,50	5,00	0,00	0,50
20	77,50	7,75	12,75	1,50	0,50
21	75,58	13,25	6,49	3,90	0,78
22	80,56	3,94	13,19	1,39	0,93
23	77,00	10,56	11,50	0,94	0,00
24	67,54	13,51	18,25	0,71	0,00
25	68,21	12,06	17,40	2,32	0,00
29	39,50	16,50	33,75	2,75	7,50
30	84,75	9,50	3,50	2,00	0,25
35	61,35	8,48	26,93	3,24	0,00
36	52,46	21,31	22,95	0,00	3,28
37	75,00	13,35	11,17	0,00	0,49
39	87,37	11,58	1,05	0,00	0,00
49	53,25	20,75	22,25	3,75	0,00
50	55,70	33,33	10,13	0,84	0,00
51	54,88	33,17	10,00	1,95	0,00
52	9,75	8,75	80,75	0,75	0,00
53	51,50	36,50	10,50	1,00	0,50
Média	62,74	15,01	20,04	1,44	0,77
Mediana	67,54	12,06	12,75	1,00	0,00
Desvio-padrão	20,04	9,88	20,26	1,27	1,80

TABELA 12. Contagem diferencial de células provenientes de lavado traqueobrônquico de ovinos portadores de afecções respiratórias (GD – n=23).

Animais	Macrófagos %	CEC %	Neutrófilos %	Linfócitos %	Eosinófilos %
8	19,00	26,50	52,00	1,50	1,00
9	55,19	41,85	2,59	0,37	0,00
10	83,10	5,24	9,29	0,48	1,90
12	69,51	23,90	4,15	1,71	0,73
14	82,97	5,60	9,00	1,22	1,22
15	69,27	8,78	18,54	3,17	0,24
16	65,84	9,98	20,20	1,75	2,24
17	27,14	70,95	1,43	0,00	0,48
18	35,14	50,45	13,06	0,45	0,90
27	66,13	6,73	25,06	0,23	1,86
31	81,00	9,74	9,03	0,24	0,00
32	46,26	44,49	8,37	0,88	0,00
34	22,62	2,14	75,24	0,00	0,00
38	14,00	3,75	80,75	1,50	0,00
40	57,43	41,58	0,99	0,00	0,00
41	9,03	52,26	28,27	7,60	2,85
43	79,14	2,16	17,03	0,00	1,68
44	25,61	4,15	67,56	1,71	0,98
45	13,46	2,24	81,73	2,56	0,00
46	20,98	1,22	74,15	3,66	0,00
47	13,66	3,66	57,80	6,10	18,78
48	3,75	1,00	94,50	0,75	0,00
54	41,90	16,96	37,16	2,49	1,50
Média	43,57	18,93	34,26	1,67	1,58
Mediana	41,90	8,78	20,20	1,22	0,73
Desvio-padrão	27,07	20,81	31,10	1,95	3,85

Trabalho científico enviado para publicação na Revista Ciência Animal Brasileira

METODOLOGIA DE COLHEITA DE CÉLULAS DO TRATO RESPIRATÓRIO EM OVINOS SADIOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAVAGEM TRAQUEOBRÔNQUICA POR VIA NASOTRAQUEAL.

Julio Simões Marcondes²; Roberto Calderon Gonçalves¹

1. Prof^o Ass. Dr. da área de Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Botucatu – Universidade Estadual Paulista. Departamento de Clínica Veterinária. Cep: 18618-000 – Botucatu, SP. Brasil. email: calderon@fmvz.unesp.br

2. Pós graduando da Área de Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Botucatu – Universidade Estadual Paulista. Departamento de Clínica Veterinária. Cep: 18618-000 – Botucatu, SP. Brasil. email: marcondesjs@yahoo.com

Resumo

Avaliou-se a técnica de colheita de células do trato respiratório em ovinos, por sondagem nasotraqueal e caracterizou-se a população celular em 19 ovinos clinicamente saudáveis. Os animais foram contidos em estação, com cabeça e pescoço estendidos e alinhados com a coluna vertebral. Após a contenção foi introduzida uma sonda guia siliconizada até a bifurcação da traquéia, por dentro desta passou uma sonda de menor calibre para realização do lavado traqueobrônquico. A média da contagem de células nucleadas foi de 64.650 ± 49.674 . A análise citológica das amostras evidenciou, pelas

médias das porcentagens obtidas, 62,74% de macrófagos, 15,01% de células epiteliais cilíndricas, 20,04% de neutrófilos, 1,44% de linfócitos e 0,77% de eosinófilos. Concluiu-se que o método de colheita por sondagem nasotraqueal foi eficiente na obtenção de amostras de regiões traqueobrônquicas para caracterização citológica e diferenciação celular nas amostras obtidas, sendo bem suportado pelos ovinos.

Palavras chave: Lavado traqueobrônquico, ovinos, citologia, citocentrífuga

**OBTENTION METHODS OF RESPIRATORY TRACT CELLS IN
HEALTHY SHEEP BY THE TRACHEOBRONCHEAL LAVAGE TECHNIQUE
BY NASOTRACHEAL VIA**

ABSTRACT

The technique of pulmonary cells obtention by nasotracheal intubation was evaluated and the cellular population of 19 healthy sheep was characterized. The animals were held standing still with head and neck straight; aligned with the vertebral spine and a silicone tube guide till the carina, to introduce a lower caliber tube for precede the tracheobronchial lavage. The average counting of nucleated cells was 64.650 ± 49.674 . The cytological analyses of the samples showed by the average of obtained percentages: 62,74% of macrophages, 15,01% cylindrical epithelial cells, 20,04% of neutrophils, 1,44 of lymphocytes and 0,77% of eosinophils. It was concluded that this method of sample obtention by nasotracheal intubation to reach the tracheobronchial region was efficient to cytological characterization and cellular differentiation in the obtained samples, being well supported by the animals.

Key words: tracheobronchial lavage, sheep, cytology, citocentrifugation

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a ovinocultura no estado de São Paulo abandonou a condição periférica para constituir-se na principal exploração econômica de muitas propriedades rurais, e já desponta como atividade agropecuária importante no contexto econômico do Estado.

Junto com o crescimento populacional e a intensificação na produtividade, surgiram diversas doenças, principalmente naqueles animais mantidos em sistemas de confinamento. Nestes tipos de criação, o estresse ambiental relacionado à alta taxa de lotação predispõe ao aparecimento de doenças respiratórias. Estas doenças estão entre as principais causas de mortalidade nesta espécie, variando de 10 a 40% nos animais adultos (VIEIRA et al., 1993) e 17% nos jovens (ROOK et al., 1990).

Atualmente, as doenças respiratórias são consideradas sério problema de sanidade apresentando altos índices de morbidade e mortalidade, além das perdas econômicas representadas pela menor conversão alimentar, retardo no ganho de peso e gastos com diagnóstico e tratamento (KIMBERLING, 1988; RAO et al., 1993; MARTIN, 1996).

Tendo em vista a importância desses problemas, faz-se necessário à obtenção de um grande número de informações semiológicas para melhor acurácia diagnóstica, especificamente visando a gravidade do processo para que medidas terapêuticas e profiláticas sejam instituídas prontamente. Com essa finalidade, as secreções traqueobrônquicas estão sendo cada vez mais pesquisadas e associadas ao exame clínico para auxílio diagnóstico, tanto citológico quanto microbiológico das vias aéreas.

Através da técnica de quantificação e análise dos tipos celulares recuperados em amostras do trato respiratório inferior é possível avaliar o grau da lesão das vias aéreas inferiores. Tais informações são usadas no estabelecimento do diagnóstico

(GONÇALVES, 1997), avaliação da intensidade dos processos respiratórios e da efetividade do tratamento (COUËTIL et al., 2001).

Além do diagnóstico pelo exame clínico, o estudo citológico é importante para a determinação etiológica das doenças respiratórias em diversas espécies animais (WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989; GONÇALVES et al., 2004). O lavado traqueal é freqüentemente usado para auxílio no diagnóstico das alterações do trato respiratório de eqüinos (FORGARTY, 1990), e de bovinos (GONÇALVES, 1997; BARROS et al., 1994;).

A lavagem broncoalveolar foi adaptada para uso em eqüinos por Viel (1983), demonstrando boa correlação entre a citologia do lavado traqueobrônquico e a histologia pulmonar nesses animais, sendo um dos métodos mais utilizados (WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989). Atualmente o seu amplo uso é justificado por oferecer diagnóstico rápido e resultados confiáveis. Além deste método de colheita, a sondagem nasotraqueal também é utilizada, com custo menor que a endoscopia e se presta ao estudo citológico do lavado traqueobrônquico em animais de produção (GONÇALVES, 1997).

Nos ovinos, a literatura é escassa (ROLA- PLESZCZYNSKI et al., 1981) e não se tem conhecimento de citações nacionais quanto à citologia do aparelho respiratório, com o intuito da caracterização do processo ou como auxílio diagnóstico.

Estudos têm reportado que a citologia do sistema respiratório é extremamente importante na diferenciação entre processos infecciosos, alérgicos, parasitários e neoplásicos além de contribuir significativamente na escolha da terapia (BEECH, 1981).

A utilização da técnica de colheita do lavado traqueobrônquico em ovinos ainda não é explorada. No entanto, como nas outras espécies (GONÇALVES, 1997;

FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004), deve ser útil para o diagnóstico e prognóstico de enfermidades do trato respiratório.

Historicamente, a literatura mostra o empenho de vários autores no intuito de viabilizarem a colheita de amostras do trato respiratório posterior. Inicialmente, foi utilizada no homem por Pecora (1959), que utilizou a aspiração traqueal, por via transtraqueal, para colheita de material de vias aéreas inferiores, para cultivo bacteriano. Mansmann & Knight (1972), adaptaram a técnica do aspirado traqueal para uso em eqüinos, e Beech (1975) sugeriu que a citologia do material assim obtido poderia ser utilizada na avaliação de eqüinos com doenças pulmonares. Desde então é de utilização rotineira em cavalos com doenças respiratórias crônicas (WHITWELL & GREET, 1984; COUËTIL et al., 2001).

Várias adaptações da técnica inicial foram desenvolvidas em bovinos, entre elas, a lavagem traqueobrônquica por traqueocentese, com a variante de que o líquido de colheita é injetado a partir da bifurcação traqueal (GONÇALVES, 1987; GONÇALVES et al., 1990; BARROS et al., 1994); a lavagem orotraqueal, com introdução do tubo de colheita por via oral e deposição do líquido na altura da bifurcação traqueal (CORSTVET et al., 1982); a lavagem broncoalveolar às cegas, com introdução de tubo siliconizado no brônquio para inoculação do líquido (SWEENEY & BEECH, 1991; MORI, 2000), e a lavagem broncoalveolar por endoscopia, com o endoscópio alojado no segmento bronquial, sendo o líquido de lavagem aí depositado (FORMAN et al., 1982; PRINGLE et al., 1988; ALLEN et al., 1992).

Nos bovinos a intubação nasotraqueal foi utilizada por Gonçalves (1997) que introduziu um tubo guia siliconizado através da narina e o direcionou até a porção mais baixa da traquéia. Por dentro deste tubo guia introduziu uma sonda de polietileno onde fez a infusão de 60ml de solução fisiológica e aspirou o conteúdo. Esta técnica foi

utilizada em bezerros para a realização de estudos citológicos, pela possibilidade de contaminação do material com secreções do trato respiratório anterior (GONÇALVES et al., 2004), mostrando-se porém eficiente, na amostragem celular do lavado.

Nos ovinos, a colheita de material de vias aéreas inferiores tem sido pouco explorada no que diz respeito ao diagnóstico de problemas respiratórios. A principal utilização dessa espécie animal no estudo das secreções broncoalveolares visa o estudo das doenças respiratórias no homem (GÓRIN et al., 1979; ROLA-PLESCZYNSKI et al., 1981; BÉGIN et al., 1983; BOSSÉ et al., 1987; BURRELS & WILLIAMS 1987; MORNEX et al., 1994; BROGDEN et al., 1998). A maior parte das colheitas foram realizadas em animais mortos (MORNEX et al., 1994; BROGDEN et al., 1998), embora alguns autores realizaram o experimento com endoscopia (BÉGIN, 1983,) ou por intubação endotraqueal (GÓRIN et al., 1979; BOSSÉ et al., 1987; BURRELS & WILLIAMS 1987) em animais submetidos à anestesia geral.

Considerando-se a importância dos prejuízos causados pelas doenças respiratórias em ovinos e a limitação de informações sobre a citologia de vias aéreas desta espécie no Brasil, o presente estudo procurou estabelecer uma metodologia adequada, de baixo custo e pouco traumática, para obtenção de fluido traqueobrônquico para análise citológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 19 ovinos, independentemente de raça e sexo, com idade entre um e quatro anos. Os animais foram submetidos à contenção física em estação, com a cabeça e pescoço estendido e alinhado com a coluna vertebral.

Após a contenção e assepsia do vestíbulo nasal, foi introduzida, por via nasotraqueal, uma sonda guia siliconizada, de 65cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro, previamente esterilizada e embalada individualmente. Na extremidade desta

sonda foi passada lidocaína gel com intuito de lubrificação e redução do desconforto. Após adentrar o vestíbulo nasal, a passagem pelo meato nasal médio e a constatação de que a sonda estava na orofaringe, foi feito um movimento de rotação de 180° para direcionar sua extremidade dorsalmente. Com isso ocorreu o toque da sonda na epiglote e seu direcionamento para a laringe e traquéia. O desconforto, meneios de cabeça, saída de ar pela extremidade da sonda guia, seguida ou não de tosse, foram os sinais indicativos de sua localização na via aérea. Aguardou-se a seguir, o momento da inspiração, para que a sonda fosse empurrada sem resistência pela traquéia, até a região da carina. Com a sonda instalada e fixada manualmente, foi introduzido uma tubo de polietileno com 85cm de comprimento e 0,3cm de diâmetro, adaptado à uma agulha calibre 30, sem bisel. Este tubo foi introduzido até a saída de sua ponta, aproximadamente cinco centímetros além da extremidade final da sonda guia, produzindo tosse no animal. As sondas eram marcadas individualmente, de tal maneira a saber o quanto fora introduzido.

Após a sondagem nasotraqueal, as amostras foram colhidas por método de lavagem traqueobrônquica (GONÇALVES et al., 2004). Por meio de uma seringa estéril com capacidade de 60ml, adaptada ao conjunto, foram injetados e imediatamente aspirados de 30 a 50ml de solução salina isotônica comercial estéril e apirogênica, de acordo com o tamanho do animal. Aspiraões sucessivas foram realizadas à medida que a sonda foi progressivamente retirada. Após a obtenção de amostra aparentemente adequada, em volume e aspecto (turvação), o conjunto de sondas foi completamente removido. O líquido do lavado traqueobrônquico obtido foi acondicionado em tubo de ensaio de polietileno, armazenado em caixa isotérmica com gelo e enviado ao Laboratório de Citopatologia do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP, no tempo máximo de duas horas, para processamento e realização de estudos citológicos.

Para a contagem total de células, o líquido do lavado traqueobrônquico foi homogeneizado em agitador de tubos (PHOENIX – Mod. AT 56), por 10 segundos, e a contagem do número total de células foi realizada em câmara de Neubauer, sem a utilização de corantes. Foram utilizados os nove quadrados da câmara, em analogia com a técnica descrita para contagem de leucócitos. O número total de células encontrado foi multiplicado por 1,1 (fator de correção), fornecendo o número total de células por microlitro de lavado, segundo Coles (1984). Multiplicou-se o valor encontrado por 10^3 para obtenção do valor em células/ml. A impressão celular em lâminas histológicas de vidro com extremidade fosca, foi obtida por meio de citocentrifugação (Revan Centrífuga Cilco Cito) de 200 microlitros do lavado traqueobrônquico a 800rpm por seis minutos. As lâminas foram coradas pelos métodos de Giemsa e Shorr, para identificar as células, avaliar suas características morfológicas e realizar as contagens diferenciais. Para coloração de Shorr, as lâminas foram fixadas com solução de álcool etílico a 95%, imediatamente após a citocentrifugação. Para a coloração por Giemsa as lâminas foram secas ao ar ambiente e fixadas com metanol (KOSS, 1992).

Analisaram-se, para cada animal, número e porcentagem de células epiteliais cilíndricas (CEC), macrófagos (M), neutrófilos (N), linfócitos (L) e eosinófilos (E). Foram contadas em 400 células em microscópio óptico comum, com aumento de 400x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica foi bem suportada pelos ovinos submetidos ao método de colheita, não houve necessidade de sedação e forneceu material adequado para realização de estudos citológicos. Foi segura, prática, pouco traumática e atingiu o objetivo de obtenção de amostra representativa da região traqueobrônquica, constituída por grande quantidade

de macrófagos alveolares e pouca contaminação por células do trato respiratório anterior (ZINKL, 1992). O tubo guia foi utilizado neste trabalho para evitar a contaminação por células da orofaringe e da traquéia, o que pode ocorrer nos lavados bucotraqueais e nasotraqueais (CORSTVET et al., 1982; GONÇALVES 1997; GONÇALVES et al., 2004). Como há a necessidade de que o lavado represente o pulmão como um todo para o estudo dos processos inflamatórios, o líquido foi depositado na bifurcação traqueal, evitando-se a limitação provocada pela lavagem broncoalveolar às cegas, realizada com a introdução do tubo guia no brônquio (SWEENEY & BEECH 1991; MORI, 2000) ou por endoscopia (PRINGLE et al., 1988; ALLEN et al., 1992). A introdução deste tubo contribuiu, também, para desencadear o reflexo de tosse, favorecendo a colheita de células das regiões mais profundas (GONÇALVES, 1997).

Segundo Gonçalves et al., (2004), os resultados citológicos da literatura de lavados broncopulmonares são variados devido à falta de padronização de técnicas de colheita, principalmente no que diz respeito à comparação de animais sadios e doentes. Por isso, é necessário o reconhecimento das limitações metodológicas que podem interferir nos resultados.

O número total de células nucleadas no lavado traqueobrônquico apresentou média de 64.650 ± 49.674 células por mililitro, com pouca variação, atingindo um máximo de 165.000 células. A contagem total e diferencial obtida neste trabalho está apresentada na Tabela 1.

As amostras do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios caracterizaram-se por predomínio de macrófagos, acima de 60% do total de células, seguindo-se por 15% de células epiteliais cilíndricas, 20% de neutrófilos, 1,4% de linfócitos e 0,77% de eosinófilos, em acordo com os achados de Gonçalves et al.,

(2004), à exceção dos eosinófilos que não foram identificados por esse autor, em bezerros sadios.

O predomínio de macrófagos nas amostras obtidas neste estudo (Figura 1), indica que o líquido obtido foi representativo das vias aéreas distais (ZINKL, 2002). Segundo a literatura, há variação na população de células, na dependência do local de colheita. Ocorre predomínio de células epiteliais cilíndricas na amostras traqueais, já nos lavados traqueobrônquicos ou broncoalveolares a célula predominante é o macrófago, caracterizando amostragem das vias mais profundas do pulmão (DERKSEN, et al, 1989; GONÇALVES et al., 2004).

A literatura demonstra porcentagens baixas de neutrófilos em animais sadios variando de 6,0 % a 8,9% em bovinos e eqüinos, respectivamente (FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004). Nossos dados revelaram média de 20,04%, valor superior ao encontrado na literatura citada. Esse fato pode estar relacionado ao hábito de pastejo e tipo de manejo dos ovinos, que recebem ração pulverulenta e são mantidos em ambientes fechados e com cama, facilitando a inalação e instalação de agentes patogênicos e alérgenos ambientais, o que aumenta o aporte de células de defesa, como os neutrófilos, para o lúmem traqueobrônquico. Sabe-se que os neutrófilos são as células de defesa mais mobilizadas na inflamação (LEID & POTTER, 1985).

Em relação às células epiteliais cilíndricas, nossos dados concordam com os de Gonçalves et al., (2004) que encontraram 14,9% destas células nas amostras estudadas. Neste trabalho encontrou-se 15,01% de células epiteliais cilíndricas, a maioria ciliadas (Figura 2), refletindo a integridade do epitélio de revestimento broncopulmonar, nos ovinos sadios.

A contagem diferencial de linfócitos no lavado traqueobrônquico de eqüinos é controversa, na dependência da técnica de colheita utilizada. Por via endoscópica, em

animais clinicamente saudáveis, o número de linfócitos varia de 30 a 50% da população total de células do lavado (NAYLOR et al., 1992; SWEENEY et al., 1992a e b; MCGORUM et al., 1993). Em ovinos saudáveis, utilizando a endoscopia, Burrells & Williams (1987) encontraram 21,9% de linfócitos. Já Collie et al., (1999) encontraram 3% desta célula em BAL de ovinos. A porcentagem de linfócitos no lavado traqueobrônquico, obtida neste trabalho foi ainda mais baixa (Tabela 1), no entanto concorda com os dados de Gonçalves et al., (2004) que estudaram a celularidade do lavado traqueobrônquico de bezerros.

A presença de eosinófilos nesta espécie, discorda da literatura (GONÇALVES et al., 2004), no entanto é equiparada à porcentagem encontrada em lavados traqueobrônquicos de equinos (LARSON & BUSCH, 1985; DERKSEN, 1989; SWEENEY & BEECH, 1991; FERNADES et al., 2000), provavelmente, nos ovinos, relaciona-se à presença de verminose, já que são altamente susceptíveis a endoparasitas.

CONCLUSÕES

Com relação à metodologia utilizada para obtenção das amostras de via aéreas posteriores, o lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal mostrou-se eficiente na obtenção de amostras de vias aéreas distais, com representatividade celular da região broncopulmonar. É de fácil realização, utiliza material de baixo custo, no entanto, requer treinamento e habilidade para passagem da sonda em menor tempo possível, sem muito desconforto ao animal, o que evita contaminação por células do trato respiratório anterior. O seu uso é recomendado como adjuvante no estudo do sistema respiratório de ovinos. Desta maneira, o uso desta técnica deve ser estimulado no estudo do sistema respiratório de ovinos e recomendado como método auxiliar no diagnóstico das doenças respiratórias.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Citopatologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp Botucatu

Ao Cnpq pela bolsa concedida durante a realização deste estudo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J.W., VIEL, L., BATEMAN, K.G., ROSENDAL, S., SHEWEN, P. Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. **Can. J. Vet. Res.**, v.56, p.122-6, 1992.

BARROS, M.S.R.M.; CASTRO, R.S.; TABOSA, J.H.C.; BRITO, M.F.; AMARAL, B. Colheita do fluido brônquio-alveolar de bezerros através da traqueocentese transcutânea. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 6, n.1, p.41-49, mai. 1994.

BEECH, J. Cytology of Tracheobronchial Aspirates in Horses. **Vet. Pathol.**, 12, p.157-164, 1975.

BEECH, J. Technique of traqueobronchial aspiration in horse. **Equine Vet. Journal**, v.13, n.2, p.136 –137, 1981.

BÉGIN, R.; ROLA-PLESZYNSKI, M.; MASSÉ, S.; LEMAIRE, I.; SIRIOIS, P.; BOCTOR, M.; NADEAU, D.; DRAPEAU, G.; BUREAU, M. A. Asbestos –induced lung injury in the sheep model: the initial alveolitis. **Enviromental Research**, v.30, p.195-210, 1983.

BOSSÉ, J.; BOILEAU, R.; BÉGIN, R.; GEOFFROY, M.; MARTEL, M.; DESMARAIS, Y. Chronic allergic airway disease in sheep model: functional an lung-lavage features. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.79, n.2, p.339-344, fev. 1987.

BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.; HUTTNER, K.M. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infection and Immunity*. v.66, n.12, dez. 1998.

BURRELLS, C., WILLIAMS J. T. Bronchoalveolar lavage of the live anaesthetised sheep. **Res Vet Sci**. v.42. n.1, p.109-112, jan. 1987.

COLES E. H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ed. Manole: São Paulo, p.390-426, 1984.

COLLIE, D. D. S.; BAKER, A.; MAUCLINE, S.; PORTEOUS, D.; McLACHLAN G. Ovine bronchoalveolar lavage cellularity: reproducibility and the effect of multiple repeated lavage. **Res. Vet. Sci**. v. 67, n. 2, p.137-40, 1999.

CORSTVET, R.E.; RUMMAGE, J.A.; HOMER, J.T. Recovery of pulmonary alveolar macrophages from nonanesthetized calves. **Am. J. Vet. Res.**, 43:12, p.2253-2254. 1982.

COUËTIL L. L.; ROSENTHAL F. S.; DeNICOLA D. B.; CHILCOAT C. D. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n. 4, p.538-46, 2001.

DERKSEN, F.J.; BROWN, C.M.; SONEA, I.; DARIEN, B.J.; ROBINSON, N.E. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. **Equine Vet. Journal**, 21:1, p.23-26. 1989.

FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arq. Bras. Med. Vet.** v. 52, n. 6, 2000.

FORGARTY, U. A bronchoalveolar lavage technique for routine diagnostic purposes. **Equine Vet. Education**, 2:2, p.102-104. 1990.

FORMAN, A.J., BABIUK, L.A., BALDWIN, F., FRIEND, S.C.E. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection of calves on cell populations recovered by lung lavage. **Am. J. Vet. Res.**, v.43, p.1174-9, 1982.

GONÇALVES, R.C. **Estudo da flora bacteriana traqueobrônquica em bezerros clinicamente sadios e portadores de pneumonia, na região de Botucatu – SP.** 1987. 43f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu.

GONÇALVES, R.C. **Estudo Clínico e citológico em Bezerros clinicamente Sadios e Portadores de Broncopneumonia Moderada e Grave. - O lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico.** 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista -Botucatu.

GONÇALVES, R.C.; KUCHEMUCK, M.R.G.; ALMEIDA, C.T. Lavagem Traqueobrônquica por Traqueocentese em Bovinos. **Vet. e Zoot**, 2, p.17-25. 1990.

GONÇALVES, R.C., MATTOS, M.C.F.I., KUCHEMUCK, M.R.G. *et al.* Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.3, p.307-311, jun. 2004.

GÓRIN, A.B.; STEWART, P.; GOULD, J. Concentrations of immunoglobulin classes in subcompartments of the sheep lung. **Res. Vet. Sci.** v.26, p.126-28, 1979.

KIMBERLING, C.V. **Jensen and Swift's Diseases of Sheep.** 3^o ed., 1988, p.94.

MARTIN, W.B. Respiratory Infections of sheep. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.** 19:3, p.171-179, 1996.

KOSS, L.G. **Diagnostic cytology and its histopathologic bases.** 4. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. 2V.

LARSON, V.G; BUSCH, R.H Equine tracheobronchial lavage: Comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. **Am. J. Vet. Res.** v.46, n.1, 1985.

LEID, R.W., POTTER, K.A. Inflammation and mediators of lung injury. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p.377-400, 1985.

McGORUM, B.C., DIXON, P.M., HALLIWELL, R.E.W., IRVING, P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvest from different segments of the equine lungs. **Res. Vet. Sci.**, v.55, p.57-9, 1993.

MORI, E. **Avaliação da função dos macrófagos alveolares após infecção experimental em cavalos (*Equus caballus* – Linnaeus, 1758) por herpesvírus equino tipo 1 (HVE-1)**. 2000. 98f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORNEX, J.F.; LENA, P.; LOIRE, R.; COZON, G.; GREELAND, T.; GUIGEN, F.; JACQUIER, M.F.; CORDIER, G. Lentivirus-induced interstitial disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. **Vet. Res.** v.25, p. 478-488, 1994.

NAYLOR, J.M., CLARK, E.G., CLAYTON, H.M. Chronic obstructive pulmonary disease: usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. **Can. Vet. J.**, v.33, p.591-8, 1992.

PECORA, D.V. A method of securing uncontaminated tracheal secretions for bacterial examination. **J. Thoracic Surg.**, v.37, p.653-654, 1959.

PRINGLE, J.K., VIEL, L., SHEWEN, P.E., WILLOUGHBY, R.A., MARTIN, S.W., VALLI, V.E.O. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. **Can. J. Vet. Res.**, v.52, p.239-48, 1988.

RAO, T.M.; CHARYULU, E.K.; PRASAD, R.D.D.; SRINIVASULU, D. & MUNIRATHNAM, D. Some Observations on Incidence and Mortality of Pneumonia in Sheep. **Indian J. Anim. Hlth.** 32 : 1, p.77-78. 1993.

ROLA - PLESZCZYNSKI, M.; SIROIS, P.; BÉGIN, R. Cellular and Humoral Components of Bronchoalveolar Lavage In: The Sheep. **Lung**. 159, p.91-99. 1981.

ROOK, J.S.; SCHOLMAN, G.; WING-PROCTOR, S.; SHEA, M. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. **The Vet. Clin. of North Am. Food Anim. Practice**, 6:3, p.531-562. 1990.

SWEENEY, C.R., BEECH, J. Bronchoalveolar lavage In: BEECH, J. **Equine respiratory disorders**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991. Cap. 4, p.55-61.

SWEENEY, C.R., HUMBER, K.A., ROBY, K.A.W. Cytologic findings of tracheobronchial aspirates from 66 Thoroughbred racehorses. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.1172-5, 1992a.

SWEENEY, C.R., ROSSIER, Y., ZIEMER, E.L., LINDBORG, S. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.1376-9, 1992b.

VIERA, F.J.B.; TRIGO T.,F.J.; MEZA, L.J.; ROMERO, F.A.; PÉREZ, G.T.; GÜEMES, F.S. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. **Vet. Méx.**, 27: 2, p.107-112. 1993.

VIEL, L. **Structural functional correlations of the lung in horses with small airway disease** - Phd Dissertation. University of Guelph, Ontario, Canada, 1983.

WHITWELL, K.E.; GREET, T.R.C. Collection and evolution of traqueobronchial washes in the horse. **Equine Veterinary Journal**, 16:6, p.499-508. 1984.

ZINKL J. G. Lowe Respiratory Tract. In. COWELL R. L.; TYLER R. D. **Diagnostic Cytology and Hematology of the horse**. Missouri: Mosby. 2 ed. 2002 p. 73-86.

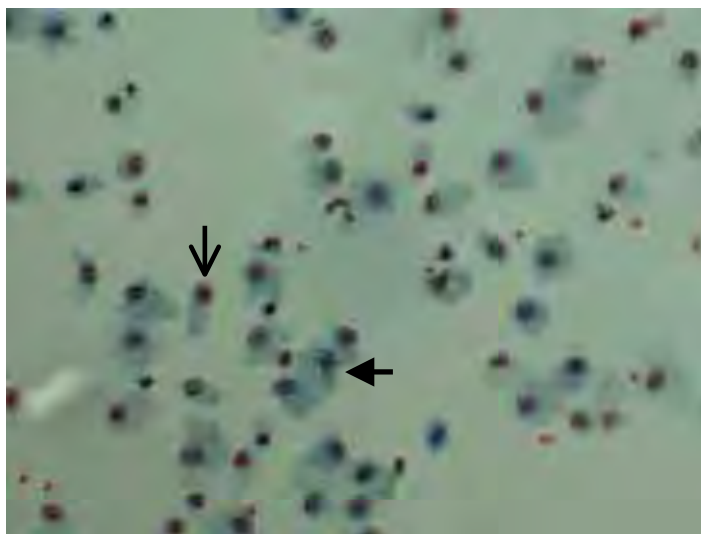


Figura 1. Visão panorâmica de células do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios, com predomínio de macrófagos (→), nota-se algumas células epiteliais cilíndricas (⇨) – Shorr (400x).

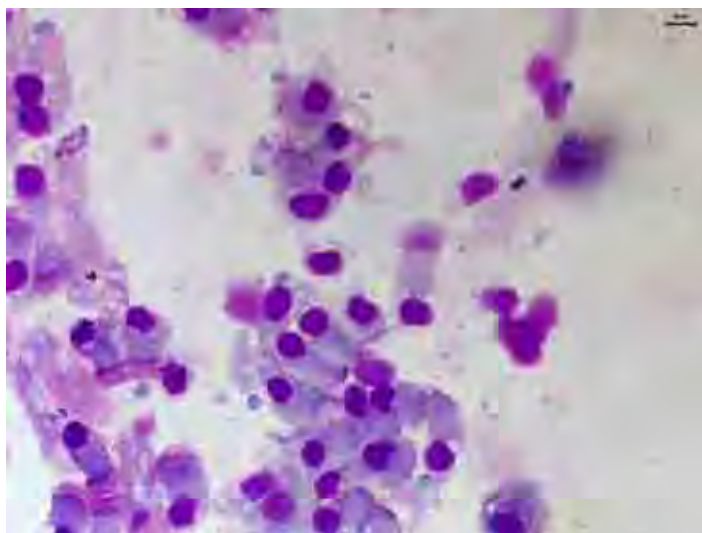


FIGURA 2. Células epiteliais cilíndricas e ciliadas – Giemsa (500x).

Tabela 1. Contagem total de células nucleadas e contagem diferencial das células do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios, média (m), mediana (md) e desvios-padrão (s).

	m	md	s
Células nucleadas (/ml)	64.650	57750,0	49,674,3
Macrófagos (%)	62,74	67,54	20,04
Células epiteliais cilíndricas (%)	15,01	12,06	9,8
Neutrófilos (%)	20,04	12,75	20,26
Linfócitos (%)	1,44	1,0	1,27
Eosinófilos (%)	0,77	0	1,8

Trabalho científico enviado para publicação na Revista Ciência Animal Brasileira

METODOLOGIA DE COLHEITA DE CÉLULAS DO TRATO RESPIRATÓRIO EM OVINOS SADIOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAVAGEM TRAQUEOBRÔNQUICA POR VIA NASOTRAQUEAL.

Julio Simões Marcondes²; Roberto Calderon Gonçalves¹

1. Prof^o Ass. Dr. da área de Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Botucatu – Universidade Estadual Paulista. Departamento de Clínica Veterinária. Cep: 18618-000 – Botucatu, SP. Brasil. email: calderon@fmvz.unesp.br

2. Pós graduando da Área de Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Botucatu – Universidade Estadual Paulista. Departamento de Clínica Veterinária. Cep: 18618-000 – Botucatu, SP. Brasil. email: marcondesjs@yahoo.com

Resumo

Avaliou-se a técnica de colheita de células do trato respiratório em ovinos, por sondagem nasotraqueal e caracterizou-se a população celular em 19 ovinos clinicamente sadios. Os animais foram contidos em estação, com cabeça e pescoço estendidos e alinhados com a coluna vertebral. Após a contenção foi introduzida uma sonda guia siliconizada até a bifurcação da traquéia, por dentro desta passou uma sonda de menor calibre para realização do lavado traqueobrônquico. A média da contagem de células nucleadas foi de 64.650 ± 49.674 . A análise citológica das amostras evidenciou, pelas

médias das porcentagens obtidas, 62,74% de macrófagos, 15,01% de células epiteliais cilíndricas, 20,04% de neutrófilos, 1,44% de linfócitos e 0,77% de eosinófilos. Concluiu-se que o método de colheita por sondagem nasotraqueal foi eficiente na obtenção de amostras de regiões traqueobrônquicas para caracterização citológica e diferenciação celular nas amostras obtidas, sendo bem suportado pelos ovinos.

Palavras chave: Lavado traqueobrônquico, ovinos, citologia, citocentrífuga

**OBTENTION METHODS OF RESPIRATORY TRACT CELLS IN
HEALTHY SHEEP BY THE TRACHEOBRONCHEAL LAVAGE TECHNIQUE
BY NASOTRACHEAL VIA**

ABSTRACT

The technique of pulmonary cells obtention by nasotracheal intubation was evaluated and the cellular population of 19 healthy sheep was characterized. The animals were held standing still with head and neck straight; aligned with the vertebral spine and a silicone tube guide till the carina, to introduce a lower caliber tube for precede the tracheobronchial lavage. The average counting of nucleated cells was 64.650 ± 49.674 . The cytological analyses of the samples showed by the average of obtained percentages: 62,74% of macrophages, 15,01% cylindrical epithelial cells, 20,04% of neutrophils, 1,44 of lymphocytes and 0,77% of eosinophils. It was concluded that this method of sample obtention by nasotracheal intubation to reach the tracheobronchial region was efficient to cytological characterization and cellular differentiation in the obtained samples, being well supported by the animals.

Key words: tracheobronchial lavage, sheep, cytology, citocentrifugation

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a ovinocultura no estado de São Paulo abandonou a condição periférica para constituir-se na principal exploração econômica de muitas propriedades rurais, e já desponta como atividade agropecuária importante no contexto econômico do Estado.

Junto com o crescimento populacional e a intensificação na produtividade, surgiram diversas doenças, principalmente naqueles animais mantidos em sistemas de confinamento. Nestes tipos de criação, o estresse ambiental relacionado à alta taxa de lotação predispõe ao aparecimento de doenças respiratórias. Estas doenças estão entre as principais causas de mortalidade nesta espécie, variando de 10 a 40% nos animais adultos (VIEIRA et al., 1993) e 17% nos jovens (ROOK et al., 1990).

Atualmente, as doenças respiratórias são consideradas sério problema de sanidade apresentando altos índices de morbidade e mortalidade, além das perdas econômicas representadas pela menor conversão alimentar, retardo no ganho de peso e gastos com diagnóstico e tratamento (KIMBERLING, 1988; RAO et al., 1993; MARTIN, 1996).

Tendo em vista a importância desses problemas, faz-se necessário à obtenção de um grande número de informações semiológicas para melhor acurácia diagnóstica, especificamente visando a gravidade do processo para que medidas terapêuticas e profiláticas sejam instituídas prontamente. Com essa finalidade, as secreções traqueobrônquicas estão sendo cada vez mais pesquisadas e associadas ao exame clínico para auxílio diagnóstico, tanto citológico quanto microbiológico das vias aéreas.

Através da técnica de quantificação e análise dos tipos celulares recuperados em amostras do trato respiratório inferior é possível avaliar o grau da lesão das vias aéreas inferiores. Tais informações são usadas no estabelecimento do diagnóstico

(GONÇALVES, 1997), avaliação da intensidade dos processos respiratórios e da efetividade do tratamento (COUËTIL et al., 2001).

Além do diagnóstico pelo exame clínico, o estudo citológico é importante para a determinação etiológica das doenças respiratórias em diversas espécies animais (WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989; GONÇALVES et al., 2004). O lavado traqueal é freqüentemente usado para auxílio no diagnóstico das alterações do trato respiratório de eqüinos (FORGARTY, 1990), e de bovinos (GONÇALVES, 1997; BARROS et al., 1994;).

A lavagem broncoalveolar foi adaptada para uso em eqüinos por Viel (1983), demonstrando boa correlação entre a citologia do lavado traqueobrônquico e a histologia pulmonar nesses animais, sendo um dos métodos mais utilizados (WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989). Atualmente o seu amplo uso é justificado por oferecer diagnóstico rápido e resultados confiáveis. Além deste método de colheita, a sondagem nasotraqueal também é utilizada, com custo menor que a endoscopia e se presta ao estudo citológico do lavado traqueobrônquico em animais de produção (GONÇALVES, 1997).

Nos ovinos, a literatura é escassa (ROLA- PLESZCZYNSKI et al., 1981) e não se tem conhecimento de citações nacionais quanto à citologia do aparelho respiratório, com o intuito da caracterização do processo ou como auxílio diagnóstico.

Estudos têm reportado que a citologia do sistema respiratório é extremamente importante na diferenciação entre processos infecciosos, alérgicos, parasitários e neoplásicos além de contribuir significativamente na escolha da terapia (BEECH, 1981).

A utilização da técnica de colheita do lavado traqueobrônquico em ovinos ainda não é explorada. No entanto, como nas outras espécies (GONÇALVES, 1997;

FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004), deve ser útil para o diagnóstico e prognóstico de enfermidades do trato respiratório.

Historicamente, a literatura mostra o empenho de vários autores no intuito de viabilizarem a colheita de amostras do trato respiratório posterior. Inicialmente, foi utilizada no homem por Pecora (1959), que utilizou a aspiração traqueal, por via transtraqueal, para colheita de material de vias aéreas inferiores, para cultivo bacteriano. Mansmann & Knight (1972), adaptaram a técnica do aspirado traqueal para uso em eqüinos, e Beech (1975) sugeriu que a citologia do material assim obtido poderia ser utilizada na avaliação de eqüinos com doenças pulmonares. Desde então é de utilização rotineira em cavalos com doenças respiratórias crônicas (WHITWELL & GREET, 1984; COUËTIL et al., 2001).

Várias adaptações da técnica inicial foram desenvolvidas em bovinos, entre elas, a lavagem traqueobrônquica por traqueocentese, com a variante de que o líquido de colheita é injetado a partir da bifurcação traqueal (GONÇALVES, 1987; GONÇALVES et al., 1990; BARROS et al., 1994); a lavagem orotraqueal, com introdução do tubo de colheita por via oral e deposição do líquido na altura da bifurcação traqueal (CORSTVET et al., 1982); a lavagem broncoalveolar às cegas, com introdução de tubo siliconizado no brônquio para inoculação do líquido (SWEENEY & BEECH, 1991; MORI, 2000), e a lavagem broncoalveolar por endoscopia, com o endoscópio alojado no segmento bronquial, sendo o líquido de lavagem aí depositado (FORMAN et al., 1982; PRINGLE et al., 1988; ALLEN et al., 1992).

Nos bovinos a intubação nasotraqueal foi utilizada por Gonçalves (1997) que introduziu um tubo guia siliconizado através da narina e o direcionou até a porção mais baixa da traquéia. Por dentro deste tubo guia introduziu uma sonda de polietileno onde fez a infusão de 60ml de solução fisiológica e aspirou o conteúdo. Esta técnica foi

utilizada em bezerros para a realização de estudos citológicos, pela possibilidade de contaminação do material com secreções do trato respiratório anterior (GONÇALVES et al., 2004), mostrando-se porém eficiente, na amostragem celular do lavado.

Nos ovinos, a colheita de material de vias aéreas inferiores tem sido pouco explorada no que diz respeito ao diagnóstico de problemas respiratórios. A principal utilização dessa espécie animal no estudo das secreções broncoalveolares visa o estudo das doenças respiratórias no homem (GÓRIN et al., 1979; ROLA-PLESCZYNSKI et al., 1981; BÉGIN et al., 1983; BOSSÉ et al., 1987; BURRELS & WILLIAMS 1987; MORNEX et al., 1994; BROGDEN et al., 1998). A maior parte das colheitas foram realizadas em animais mortos (MORNEX et al., 1994; BROGDEN et al., 1998), embora alguns autores realizaram o experimento com endoscopia (BÉGIN, 1983,) ou por intubação endotraqueal (GÓRIN et al., 1979; BOSSÉ et al., 1987; BURRELS & WILLIAMS 1987) em animais submetidos à anestesia geral.

Considerando-se a importância dos prejuízos causados pelas doenças respiratórias em ovinos e a limitação de informações sobre a citologia de vias aéreas desta espécie no Brasil, o presente estudo procurou estabelecer uma metodologia adequada, de baixo custo e pouco traumática, para obtenção de fluido traqueobrônquico para análise citológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 19 ovinos, independentemente de raça e sexo, com idade entre um e quatro anos. Os animais foram submetidos à contenção física em estação, com a cabeça e pescoço estendido e alinhado com a coluna vertebral.

Após a contenção e assepsia do vestíbulo nasal, foi introduzida, por via nasotraqueal, uma sonda guia siliconizada, de 65cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro, previamente esterilizada e embalada individualmente. Na extremidade desta

sonda foi passada lidocaína gel com intuito de lubrificação e redução do desconforto. Após adentrar o vestíbulo nasal, a passagem pelo meato nasal médio e a constatação de que a sonda estava na orofaringe, foi feito um movimento de rotação de 180° para direcionar sua extremidade dorsalmente. Com isso ocorreu o toque da sonda na epiglote e seu direcionamento para a laringe e traquéia. O desconforto, meneios de cabeça, saída de ar pela extremidade da sonda guia, seguida ou não de tosse, foram os sinais indicativos de sua localização na via aérea. Aguardou-se a seguir, o momento da inspiração, para que a sonda fosse empurrada sem resistência pela traquéia, até a região da carina. Com a sonda instalada e fixada manualmente, foi introduzido uma tubo de polietileno com 85cm de comprimento e 0,3cm de diâmetro, adaptado à uma agulha calibre 30, sem bisel. Este tubo foi introduzido até a saída de sua ponta, aproximadamente cinco centímetros além da extremidade final da sonda guia, produzindo tosse no animal. As sondas eram marcadas individualmente, de tal maneira a saber o quanto fora introduzido.

Após a sondagem nasotraqueal, as amostras foram colhidas por método de lavagem traqueobrônquica (GONÇALVES et al., 2004). Por meio de uma seringa estéril com capacidade de 60ml, adaptada ao conjunto, foram injetados e imediatamente aspirados de 30 a 50ml de solução salina isotônica comercial estéril e apirogênica, de acordo com o tamanho do animal. Aspirações sucessivas foram realizadas à medida que a sonda foi progressivamente retirada. Após a obtenção de amostra aparentemente adequada, em volume e aspecto (turvação), o conjunto de sondas foi completamente removido. O líquido do lavado traqueobrônquico obtido foi acondicionado em tubo de ensaio de polietileno, armazenado em caixa isotérmica com gelo e enviado ao Laboratório de Citopatologia do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP, no tempo máximo de duas horas, para processamento e realização de estudos citológicos.

Para a contagem total de células, o líquido do lavado traqueobrônquico foi homogeneizado em agitador de tubos (PHOENIX – Mod. AT 56), por 10 segundos, e a contagem do número total de células foi realizada em câmara de Neubauer, sem a utilização de corantes. Foram utilizados os nove quadrados da câmara, em analogia com a técnica descrita para contagem de leucócitos. O número total de células encontrado foi multiplicado por 1,1 (fator de correção), fornecendo o número total de células por microlitro de lavado, segundo Coles (1984). Multiplicou-se o valor encontrado por 10^3 para obtenção do valor em células/ml. A impressão celular em lâminas histológicas de vidro com extremidade fosca, foi obtida por meio de citocentrifugação (Revan Centrífuga Cilco Cito) de 200 microlitros do lavado traqueobrônquico a 800rpm por seis minutos. As lâminas foram coradas pelos métodos de Giemsa e Shorr, para identificar as células, avaliar suas características morfológicas e realizar as contagens diferenciais. Para coloração de Shorr, as lâminas foram fixadas com solução de álcool etílico a 95%, imediatamente após a citocentrifugação. Para a coloração por Giemsa as lâminas foram secas ao ar ambiente e fixadas com metanol (KOSS, 1992).

Analisaram-se, para cada animal, número e porcentagem de células epiteliais cilíndricas (CEC), macrófagos (M), neutrófilos (N), linfócitos (L) e eosinófilos (E). Foram contadas em 400 células em microscópio óptico comum, com aumento de 400x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica foi bem suportada pelos ovinos submetidos ao método de colheita, não houve necessidade de sedação e forneceu material adequado para realização de estudos citológicos. Foi segura, prática, pouco traumática e atingiu o objetivo de obtenção de amostra representativa da região traqueobrônquica, constituída por grande quantidade

de macrófagos alveolares e pouca contaminação por células do trato respiratório anterior (ZINKL, 1992). O tubo guia foi utilizado neste trabalho para evitar a contaminação por células da orofaringe e da traquéia, o que pode ocorrer nos lavados bucotraqueais e nasotraqueais (CORSTVET et al., 1982; GONÇALVES 1997; GONÇALVES et al., 2004). Como há a necessidade de que o lavado represente o pulmão como um todo para o estudo dos processos inflamatórios, o líquido foi depositado na bifurcação traqueal, evitando-se a limitação provocada pela lavagem broncoalveolar às cegas, realizada com a introdução do tubo guia no brônquio (SWEENEY & BEECH 1991; MORI, 2000) ou por endoscopia (PRINGLE et al., 1988; ALLEN et al., 1992). A introdução deste tubo contribuiu, também, para desencadear o reflexo de tosse, favorecendo a colheita de células das regiões mais profundas (GONÇALVES, 1997).

Segundo Gonçalves et al., (2004), os resultados citológicos da literatura de lavados broncopulmonares são variados devido à falta de padronização de técnicas de colheita, principalmente no que diz respeito à comparação de animais sadios e doentes. Por isso, é necessário o reconhecimento das limitações metodológicas que podem interferir nos resultados.

O número total de células nucleadas no lavado traqueobrônquico apresentou média de 64.650 ± 49.674 células por mililitro, com pouca variação, atingindo um máximo de 165.000 células. A contagem total e diferencial obtida neste trabalho está apresentada na Tabela 1.

As amostras do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios caracterizaram-se por predomínio de macrófagos, acima de 60% do total de células, seguindo-se por 15% de células epiteliais cilíndricas, 20% de neutrófilos, 1,4% de linfócitos e 0,77% de eosinófilos, em acordo com os achados de Gonçalves et al.,

(2004), à exceção dos eosinófilos que não foram identificados por esse autor, em bezerros sadios.

O predomínio de macrófagos nas amostras obtidas neste estudo (Figura 1), indica que o líquido obtido foi representativo das vias aéreas distais (ZINKL, 2002). Segundo a literatura, há variação na população de células, na dependência do local de colheita. Ocorre predomínio de células epiteliais cilíndricas nas amostras traqueais, já nos lavados traqueobrônquicos ou broncoalveolares a célula predominante é o macrófago, caracterizando amostragem das vias mais profundas do pulmão (DERKSEN, et al, 1989; GONÇALVES et al., 2004).

A literatura demonstra porcentagens baixas de neutrófilos em animais sadios variando de 6,0 % a 8,9% em bovinos e eqüinos, respectivamente (FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004). Nossos dados revelaram média de 20,04%, valor superior ao encontrado na literatura citada. Esse fato pode estar relacionado ao hábito de pastejo e tipo de manejo dos ovinos, que recebem ração pulverulenta e são mantidos em ambientes fechados e com cama, facilitando a inalação e instalação de agentes patogênicos e alérgenos ambientais, o que aumenta o aporte de células de defesa, como os neutrófilos, para o lúmen traqueobrônquico. Sabe-se que os neutrófilos são as células de defesa mais mobilizadas na inflamação (LEID & POTTER, 1985).

Em relação às células epiteliais cilíndricas, nossos dados concordam com os de Gonçalves et al., (2004) que encontraram 14,9% destas células nas amostras estudadas. Neste trabalho encontrou-se 15,01% de células epiteliais cilíndricas, a maioria ciliadas (Figura 2), refletindo a integridade do epitélio de revestimento broncopulmonar, nos ovinos sadios.

A contagem diferencial de linfócitos no lavado traqueobrônquico de eqüinos é controversa, na dependência da técnica de colheita utilizada. Por via endoscópica, em

animais clinicamente saudáveis, o número de linfócitos varia de 30 a 50% da população total de células do lavado (NAYLOR et al., 1992; SWEENEY et al., 1992a e b; MCGORUM et al., 1993). Em ovinos saudáveis, utilizando a endoscopia, Burrells & Williams (1987) encontraram 21,9% de linfócitos. Já Collie et al., (1999) encontraram 3% desta célula em BAL de ovinos. A porcentagem de linfócitos no lavado traqueobrônquico, obtida neste trabalho foi ainda mais baixa (Tabela 1), no entanto concorda com os dados de Gonçalves et al., (2004) que estudaram a celularidade do lavado traqueobrônquico de bezerros.

A presença de eosinófilos nesta espécie, discorda da literatura (GONÇALVES et al., 2004), no entanto é equiparada à porcentagem encontrada em lavados traqueobrônquicos de equinos (LARSON & BUSCH, 1985; DERKSEN, 1989; SWEENEY & BEECH, 1991; FERNADES et al., 2000), provavelmente, nos ovinos, relaciona-se à presença de verminose, já que são altamente susceptíveis a endoparasitas.

CONCLUSÕES

Com relação à metodologia utilizada para obtenção das amostras de via aéreas posteriores, o lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal mostrou-se eficiente na obtenção de amostras de vias aéreas distais, com representatividade celular da região broncopulmonar. É de fácil realização, utiliza material de baixo custo, no entanto, requer treinamento e habilidade para passagem da sonda em menor tempo possível, sem muito desconforto ao animal, o que evita contaminação por células do trato respiratório anterior. O seu uso é recomendado como adjuvante no estudo do sistema respiratório de ovinos. Desta maneira, o uso desta técnica deve ser estimulado no estudo do sistema respiratório de ovinos e recomendado como método auxiliar no diagnóstico das doenças respiratórias.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Citopatologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp Botucatu

Ao Cnpq pela bolsa concedida durante a realização deste estudo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J.W., VIEL, L., BATEMAN, K.G., ROSENDAL, S., SHEWEN, P. Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. **Can. J. Vet. Res.**, v.56, p.122-6, 1992.

BARROS, M.S.R.M.; CASTRO, R.S.; TABOSA, J.H.C.; BRITO, M.F.; AMARAL, B. Colheita do fluido brônquio-alveolar de bezerros através da traqueocentese transcutânea. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 6, n.1, p.41-49, mai. 1994.

BEECH, J. Cytology of Tracheobronchial Aspirates in Horses. **Vet. Pathol.**, 12, p.157-164, 1975.

BEECH, J. Technique of traqueobronchial aspiration in horse. **Equine Vet. Journal**, v.13, n.2, p.136 –137, 1981.

BÉGIN, R.; ROLA-PLESZYNSKI, M.; MASSÉ, S.; LEMAIRE, I.; SIRIOIS, P.; BOCTOR, M.; NADEAU, D.; DRAPEAU, G.; BUREAU, M. A. Asbestos –induced lung injury in the sheep model: the initial alveolitis. **Enviromental Research**, v.30, p.195-210, 1983.

BOSSÉ, J.; BOILEAU, R.; BÉGIN, R.; GEOFFROY, M.; MARTEL, M.; DESMARAIS, Y. Chronic allergic airway disease in sheep model: functional an lung-lavage features. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.79, n.2, p.339-344, fev. 1987.

BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.; HUTTNER, K.M. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infection and Immunity*. v.66, n.12, dez. 1998.

BURRELLS, C., WILLIAMS J. T. Bronchoalveolar lavage of the live anaesthetised sheep. *Res Vet Sci*. v.42. n.1, p.109-112, jan. 1987.

COLES E. H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ed. Manole: São Paulo, p.390-426, 1984.

COLLIE, D. D. S.; BAKER, A.; MAUCLINE, S.; PORTEOUS, D.; McLACHLAN G. Ovine bronchoalveolar lavage cellularity: reproducibility and the effect of multiple repeated lavage. *Res. Vet. Sci*. v. 67, n. 2, p.137-40, 1999.

CORSTVET, R.E.; RUMMAGE, J.A.; HOMER, J.T. Recovery of pulmonary alveolar macrophages from nonanesthetized calves. *Am. J. Vet. Res.*, 43:12, p.2253-2254. 1982.

COUËTIL L. L.; ROSENTHAL F. S.; DeNICOLA D. B.; CHILCOAT C. D. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, n. 4, p.538-46, 2001.

DERKSEN, F.J.; BROWN, C.M.; SONEA, I.; DARIEN, B.J.; ROBINSON, N.E. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Vet. Journal*, 21:1, p.23-26. 1989.

FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. *Arq. Bras. Med. Vet.* v. 52, n. 6, 2000.

FORGARTY, U. A bronchoalveolar lavage technique for routine diagnostic purposes. *Equine Vet. Education*, 2:2, p.102-104. 1990.

FORMAN, A.J., BABIUK, L.A., BALDWIN, F., FRIEND, S.C.E. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection of calves on cell populations recovered by lung lavage. **Am. J. Vet. Res.**, v.43, p.1174-9, 1982.

GONÇALVES, R.C. **Estudo da flora bacteriana traqueobrônquica em bezerros clinicamente sadios e portadores de pneumonia, na região de Botucatu – SP.** 1987. 43f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu.

GONÇALVES, R.C. **Estudo Clínico e citológico em Bezerros clinicamente Sadios e Portadores de Broncopneumonia Moderada e Grave. - O lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico.** 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista -Botucatu.

GONÇALVES, R.C.; KUCHEMUCK, M.R.G.; ALMEIDA, C.T. Lavagem Traqueobrônquica por Traqueocentese em Bovinos. **Vet. e Zoot**, 2, p.17-25. 1990.

GONÇALVES, R.C., MATTOS, M.C.F.I., KUCHEMUCK, M.R.G. *et al.* Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.3, p.307-311, jun. 2004.

GÓRIN, A.B.; STEWART, P.; GOULD, J. Concentrations of immunoglobulin classes in subcompartments of the sheep lung. **Res. Vet. Sci.** v.26, p.126-28, 1979.

KIMBERLING, C.V. **Jensen and Swift's Diseases of Sheep.** 3° ed., 1988, p.94.

MARTIN, W.B. Respiratory Infections of sheep. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.** 19:3, p.171-179, 1996.

KOSS, L.G. **Diagnostic cytology and its histopathologic bases.** 4. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. 2V.

LARSON, V.G; BUSCH, R.H Equine tracheobronchial lavage: Comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. **Am. J. Vet. Res.** v.46, n.1, 1985.

LEID, R.W., POTTER, K.A. Inflammation and mediators of lung injury. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p.377-400, 1985.

McGORUM, B.C., DIXON, P.M., HALLIWELL, R.E.W., IRVING, P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvest from different segments of the equine lungs. **Res. Vet. Sci.**, v.55, p.57-9, 1993.

MORI, E. **Avaliação da função dos macrófagos alveolares após infecção experimental em cavalos (*Equus caballus* – Linnaeus, 1758) por herpesvírus equino tipo 1 (HVE-1)**. 2000. 98f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORNEX, J.F.; LENA, P.; LOIRE, R.; COZON, G.; GREELAND, T.; GUIGEN, F.; JACQUIER, M.F.; CORDIER, G. Lentivirus-induced interstitial disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. **Vet. Res.** v.25, p. 478-488, 1994.

NAYLOR, J.M., CLARK, E.G., CLAYTON, H.M. Chronic obstructive pulmonary disease: usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. **Can. Vet. J.**, v.33, p.591-8, 1992.

PECORA, D.V. A method of securing uncontaminated tracheal secretions for bacterial examination. **J. Thoracic Surg.**, v.37, p.653-654, 1959.

PRINGLE, J.K., VIEL, L., SHEWEN, P.E., WILLOUGHBY, R.A., MARTIN, S.W., VALLI, V.E.O. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. **Can. J. Vet. Res.**, v.52, p.239-48, 1988.

RAO, T.M.; CHARYULU, E.K.; PRASAD, R.D.D.; SRINIVASULU, D. & MUNIRATHNAM, D. Some Observations on Incidence and Mortality of Pneumonia in Sheep. **Indian J. Anim. Hlth.** 32 : 1, p.77-78. 1993.

ROLA - PLESZCZYNSKI, M.; SIROIS, P.; BÉGIN, R. Cellular and Humoral Components of Bronchoalveolar Lavage In: The Sheep. **Lung**. 159, p.91-99. 1981.

ROOK, J.S.; SCHOLMAN, G.; WING-PROCTOR, S.; SHEA, M. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. **The Vet. Clin. of North Am. Food Anim. Practice**, 6:3, p.531-562. 1990.

SWEENEY, C.R., BEECH, J. Bronchoalveolar lavage In: BEECH, J. **Equine respiratory disorders**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991. Cap. 4, p.55-61.

SWEENEY, C.R., HUMBER, K.A., ROBY, K.A.W. Cytologic findings of tracheobronchial aspirates from 66 Thoroughbred racehorses. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.1172-5, 1992a.

SWEENEY, C.R., ROSSIER, Y., ZIEMER, E.L., LINDBORG, S. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.1376-9, 1992b.

VIERA, F.J.B.; TRIGO T.,F.J.; MEZA, L.J.; ROMERO, F.A.; PÉREZ, G.T.; GÜEMES, F.S. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. **Vet. Méx.**, 27: 2, p.107-112. 1993.

VIEL, L. **Structural functional correlations of the lung in horses with small airway disease** - Phd Dissertation. University of Guelph, Ontario, Canada, 1983.

WHITWELL, K.E.; GREET, T.R.C. Collection and evolution of traqueobronchial washes in the horse. **Equine Veterinary Journal**, 16:6, p.499-508. 1984.

ZINKL J. G. Lowe Respiratory Tract. In. COWELL R. L.; TYLER R. D. **Diagnostic Cytology and Hematology of the horse**. Missouri: Mosby. 2 ed. 2002 p. 73-86.

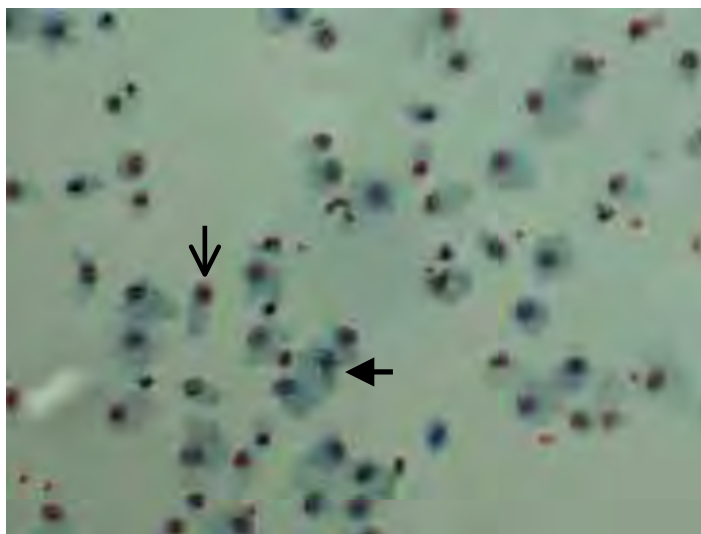


Figura 1. Visão panorâmica de células do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios, com predomínio de macrófagos (→), nota-se algumas células epiteliais cilíndricas (↪) – Shorr (400x).

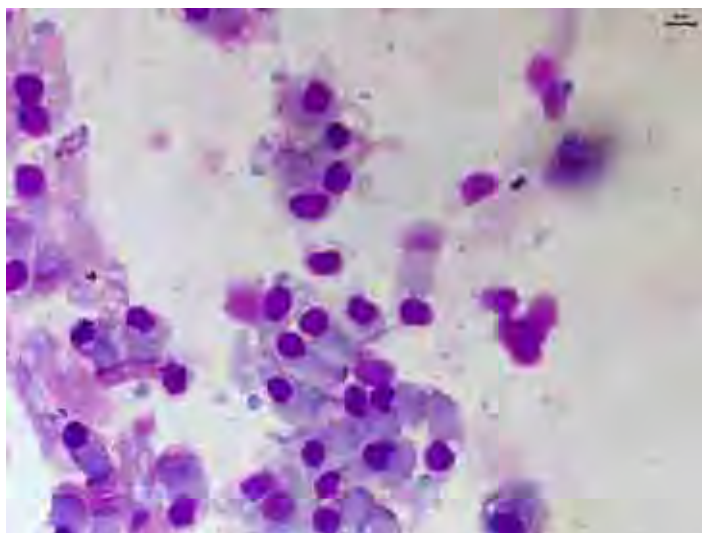


FIGURA 2. Células epiteliais cilíndricas e ciliadas – Giemsa (500x).

Tabela 1. Contagem total de células nucleadas e contagem diferencial das células do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios, média (m), mediana (md) e desvios-padrão (s).

	m	md	s
Células nucleadas (/ml)	64.650	57750,0	49,674,3
Macrófagos (%)	62,74	67,54	20,04
Células epiteliais cilíndricas (%)	15,01	12,06	9,8
Neutrófilos (%)	20,04	12,75	20,26
Linfócitos (%)	1,44	1,0	1,27
Eosinófilos (%)	0,77	0	1,8

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO



- Ciência Animal Brasileira publica trabalhos originais relacionados à pesquisa em Medicina Veterinária, Zootecnia, Biologia e áreas correlatas, em forma de artigos, revisão, notas de pesquisa, comunicações, resumos de teses;
- Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Eles devem ser apresentados em três cópias impressas, fonte Times New Roman 12, espaço duplo, com folhas numeradas, bem como em disquete com a indicação do programa e da versão utilizados. Notas de rodapé não serão aceitas;
- Os trabalhos devem ser organizados na seguinte ordem:
 - 1) título
 - 2) nomes dos autores (por extenso)
 - 3) filiação científica (informar Departamento, Instituição ou Faculdade, Universidade, CEP, cidade, país, estado, e-mail)

- 4) resumo (na língua principal do texto e em inglês – Summary – com um máximo de 200 palavras)
- 5) palavras-chave (no máximo cinco, apresentadas na língua do texto e em inglês – Keywords)
- 6) introdução
- 7) material e métodos
- 8) resultados e discussão
- 9) conclusões
- 10) agradecimentos (se necessário)
- 11) referências bibliográficas