

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR E ESCOVADO
BRONQUIAL, POR MEIO DE TRAQUEOBRONCOSCOPIA, EM
CÃES (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*, LINNAEUS 1758)
DIAGNOSTICADOS COM AFECÇÕES PULMONARES

PAULO VINICIUS ABBADE MOREIRA SOUZA

Botucatu – SP
Julho de 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR E ESCOVADO
BRONQUIAL, POR MEIO DE TRAQUEOBRONCOSCOPIA, EM
CÃES (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*, LINNAEUS 1758)
DIAGNOSTICADOS COM AFECÇÕES PULMONARES

PAULO VINICIUS ABBADE MOREIRA SOUZA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Felismino
Charas dos Santos

Botucatu – SP

Julho de 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Souza, Paulo Vinicius Abbade Moreira.

Avaliação do lavado broncoalveolar e escovado bronquial, por meio de traqueobroncoscopia em cães (*Canis Lupus Familiaris*, Linnaeus 1758) diagnosticados com afecções pulmonares / Paulo Vinicius Abbade Moreira Souza. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Ivan Felismino Charas dos Santos
Capes: 50501070

1. Brônquios. 2. Citologia veterinária. 3. Estresse oxidativo. 4. Pulmões - Doenças.

Palavras-chave: Brônquios; Citologia; Estresse oxidativo; Pulmão; Traqueobroncoscopia.

Nome do autor: Paulo Vinicius Abbade Moreira Souza

Título: Avaliação do lavado broncoalveolar e escovado bronquial, por meio de traqueobroncoscopia, em cães (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus 1758) diagnosticados com afecções pulmonares.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos

Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu



Prof. Titular Dr. Carlos Alberto Hussni

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Thales Bregadioli

Membro

Orthosupport

Campinas, São Paulo

Data da defesa: 03 de julho de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha filha Giovanna Miller Souza, da qual eu espero poder mostrar o quão é importante estudar e ter o amor aos animais.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me amparar profissionalmente e me proporcionar inúmeras oportunidades na minha carreira profissional como Médico Veterinário, uma delas a oportunidade de cursar o mestrado em uma universidade renomada. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu (SP), por toda ajuda durante o período de realização do mestrado.

À minha falecida avó, Esmeralda de Jesus Souza Moreira, que sempre foi a pessoa que em vida me amparou financeiramente e me apoiou profissionalmente. Ao meu pai, Paulo Sérgio Moreira Souza, que com seus ensinamentos de honestidade e perseverança pude chegar aonde estou.

À minha esposa Beatriz Miller Pereira, que me apoiou e me ajudou com meus estudos e administrando nossa empresa na minha ausência durante o período de dedicação ao mestrado. À minha filha Giovanna Miller Souza, que meu deu um novo rumo e sentido à minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos, pela grande oportunidade que me foi concedida, obrigado por me inserir neste universo da pesquisa científica, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e auxílio durante o período do Mestrado.

À equipe do Laboratório Verum Diagnósticos, em especial aos Médicos Veterinários Kleber Parra e Daiene Karina Casagrande, que realizaram a parceria para análise dos resultados laboratoriais. Ao Médico Veterinário Paulo Gabriel Gonzalez e demais médicos veterinários integrantes de sua equipe IMAN, que anestesiaram os pacientes do projeto. À equipe da Clínica Veterinária Pet Vida 24h de Campinas (SP), que forneceu a estrutura e oportunidade de ajudar seus pacientes para que participassem desse projeto.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Laringoscopia e Traqueobroncoscopia	13
2.2 Lavado Broncoalveolar (LBA).....	14
2.3 Escovado Bronquial (EB).....	17
2.3 Biomarcadores do estresse oxidativo	17
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Animais e ambiente de experimentação	23
4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	23
4.3 Procedimento experimental	23
4.4 Variáveis avaliadas	26
4.5 Análise estatística	27
5 RESULTADOS	29
5.1 Avaliação microbiológica	29
5.2 Avaliação citológica	30
5.3 Avaliação dos biomarcadores do estresse oxidativo.....	31
7. DISCUSSÃO	34
8. CONCLUSÕES	38
9. REFERÊNCIAS.....	40
10. ANEXO	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade e tipo celular individual de cada animal, de acordo com a técnica. 30

Tabela 2. Média (Me) e desvio padrão (DP) dos biomarcadores ácido úrico (AU), albumina (ALB), capacidade antioxidante total e inibição do cátion 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (CAT – ABTS e CAT – ABTS- HRP), capacidade redutora cúprica (CAT - CUPRAC), capacidade de redução férrica do plasma (CAT - FRAP) e capacidade oxidante total (COT), avaliados nos seguintes momentos: antes da realização do procedimento endoscópico (M_0), após o lavado bronquial (M_1) e após escovado bronquial (M_2). 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Videobronscoscópio portátil da marca Argus®, modelo OIF66P.	24
Figura 2. Imagem endoscópica após a realização do LBA (A) e durante o EB.	25
Figura 3. Gráfico demonstrando a porcentagem do crescimento bacteriano nas amostras do LBA e EB.....	29
Figura 4. Representação gráfica bidimensional usada para avaliar a presença de diferenças significativas entre as técnicas usadas, de acordo com a celularidade.	31

SOUZA, P.V.A.M. Avaliação do lavado broncoalveolar e escovado bronquial, por meio de traqueobroncoscopia, em cães (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus 1758) diagnosticados com afecções pulmonares. Botucatu, 2024. 45p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

RESUMO

A traqueobroncoscopia é uma técnica endoscópica, que pode ser usada para lavado broncoalveolar e/ou escovado bronquial em casos de afecções localizadas nos brônquios e/ou alvéolos. Atualmente, existe uma controvérsia entre os clínicos endoscopistas em relação a eficácia diagnóstica entre ambas as técnicas. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o lavado broncoalveolar (LBA) e escovado bronquial (EB) por meio de traqueobroncoscopia em cães diagnosticados com afecções pulmonares, por meio de exames microbiológicos, citológicos e estresse oxidativo. Foram utilizados 14 cães adultos de tamanho, raça e sexo variados, e diagnosticados clinicamente com afecção respiratória inferior. Os lavados broncoalveolar e os escovados bronquiais foram obtidos por meio da traqueobroncoscopia e as variáveis foram avaliadas nos seguintes momentos: antes da realização do procedimento endoscópico (M_0) e após o lavado bronquial (M_1) e após escovado bronquial (M_2). Não foi identificado crescimento bacteriano aeróbico ou anaeróbico em nenhuma das amostras de LBA. No EB foi identificado o crescimento bacteriano *Citrobacter spp.* em 14,28% das amostras, contudo não foram observadas diferenças significativas na avaliação microbiológica entre ambas as técnicas. Em relação ao exame citológico e dos biomarcadores de estresse oxidativo, não foram observadas diferenças significativas entre o LBA e o EB, em relação à celularidade e atividade antioxidante, respectivamente. Concluiu-se que não existe diferença ao se analisar os aspectos microbiológicos e citológico do material coletado por lavado broncoalveolar e escovado guiado por traqueobroncoscopia, e que ambos os métodos não induzem estresse oxidativos em cães.

Palavras-chave: brônquios, traqueobroncoscopia, estresse oxidativo, pulmão, citologia.

SOUZA, P.V.A.M. Evaluation of bronchoalveolar lavage and bronchial brushing, through tracheobronchoscopy, in dogs (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus 1758) diagnosed with pulmonary diseases. Botucatu, 2024. 45p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

ABSTRACT

Tracheobronchoscopy is an endoscopic technique that can be used for bronchoalveolar lavage and/or bronchial brushing in cases of conditions localized in the bronchi and/or alveoli. Currently, there is a controversy among clinical endoscopists regarding the diagnostic efficacy between both techniques. Therefore, the aims of the present study were to evaluate bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial brushing (BB) via tracheobronchoscopy in dogs diagnosed with pulmonary conditions, through microbiological, cytological, and oxidative stress examinations. Fourteen (14) adult dogs of various sizes, breeds, and gender, and clinically diagnosed with lower respiratory tract conditions was used. Bronchoalveolar lavages and bronchial brushings were obtained through tracheobronchoscopy, and collections were conducted at the following times: before performing the endoscopic procedures (M₀) and after bronchoalveolar lavage (M₁) and bronchial brushing (M₂). No aerobic or anaerobic bacterial growth was identified in any of the BAL samples. In BB, *Citrobacter spp.* bacterial growth was identified in 14.28% of the samples; however, no significant differences were observed in the microbiological evaluation between both techniques. Regarding cytological examination and oxidative stress biomarkers, no significant differences were observed between BAL and BB in terms of cellularity and antioxidant activity, respectively. It was concluded that there is no difference when analyzing the microbiological and cytological aspects of material collected by bronchoalveolar lavage and guided bronchoscopy-brushed techniques, and that both methods do not induce oxidative stress in dogs.

Keywords: bronchi, tracheobronchoscopy, oxidative stress, lung, cytology.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A endoscopia veterinária tem se tornado cada vez mais comum e importante na prática da clínica veterinária, permitindo aos veterinários realizarem diagnósticos mais precisos e intervenções terapêuticas menos invasivas, como por exemplo o exame endoscópico do trato respiratório (BJORLING et al., 2000; NOONE, 2001). Além da propriedade de observação magnificada da mucosa e lúmen do sistema respiratório, a endoscopia respiratória, também chamada de laringotraqueobroncoscopia (LTB), permite a realização de biopsias incisionais ou excisionais, remoção de corpos estranhos, lavado e escovado traqueal e/ou broncoalveolar, além de auxílio na colocação de próteses laríngeas, endotraqueais, endobronquiais (NOONE, 2001).

A broncoscopia com coleta de lavado broncoalveolar (LBA) tem sido empregada para diagnosticar o agente etiológico da tosse crônica em cães e gatos. Embora algumas afecções respiratórias sejam diagnosticadas pela visualização endoscópica, a confirmação da afecção infecciosa versus inflamatória requer exames citológicos e microbiológicos da amostra de fluido que mantém contato com o revestimento epitelial respiratório (PADRID, 2000; KUEHN e HESS, 2004).

Atualmente, existe uma controvérsia entre os clínicos endoscopistas em relação à eficácia diagnóstica do lavado broncoalveolar e do escovado bronquial (EB), por meio de traqueobroncoscopia, em cães com afecções pulmonares. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o lavado broncoalveolar e escovado bronquial coletados por meio de traqueobroncoscopia em cães diagnosticados com afecções pulmonares, avaliando os exames microbiológicos, citológicos e dos biomarcadores do estresse oxidativo. A hipótese é que o escovado bronquial apresente resultados significativamente melhores que o lavado bronquial na coleta, quer qualitativamente e quantitativamente. O presente estudo se justificou pela relevância clínico-cirúrgica visto que os resultados poderão servir de base para a escolha do melhor método de diagnóstico de afecções pulmonares por meio da traqueobroncoscopia.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Laringoscopia e Traqueobroncoscopia

A traqueobroncoscopia pode ser usada para examinar o trato respiratório, auxiliando no diagnóstico de afecções respiratórias, como bronquite crônica, traqueíte e neoplasias nas vias aéreas (BJORLING et al., 2000; NOONE, 2001). A extensão em que os brônquios lobares, segmentares e subsegmentares podem ser visualizados depende do tamanho do paciente, diâmetro e comprimento do broncoscópio, e da habilidade do endoscopista (PADRID, 2000; MCKIERNAN, 2005). Em todos os pacientes veterinários, excetuando os de menor tamanho, o endoscópio atravessa facilmente a traqueia, carina e brônquios principais direito e esquerdo, com a visualização da origem dos brônquios lobares (MCKIERNAN, 2005).

A laringoscopia é um procedimento realizado para diagnosticar afecções da laringe, com o paciente anestesiado ou sob sedação, e indicada para os cães com sinais clínicos de alteração no latido, estridor, aumento de esforço inspiratório ou intolerância aos exercícios, entre outras (BJORLING et al., 2000; PADRID, 2000; NOONE, 2001). A laringe é inspecionada quanto à coloração da mucosa, estrutura, simetria, movimento e a presença de massas ou corpos estranhos; no entanto, é comum a realização do exame nos casos de suspeita de disfunção laríngea em cães e raramente em gatos (NOONE, 2001; KUEHN e HESS, 2004).

Cães que apresentam sinais clínicos agudos ou crônicos de tosse, hemoptise, estridor ou dispneia e que não foram diagnosticados por outros meios, são candidatos para o procedimento de traqueobroncoscopia (KUEHN e HESS, 2004).

A traqueobroncoscopia é o método mais confiável de exploração e coleta de amostras da mucosa respiratória, quando existe a suspeita de afecções como inflamações e neoplasias, sem ter que se recorrer à cirurgia aberta (KUEHN e HESS, 2004). Além disso, esse procedimento é útil em cães com suspeita de

colapso traqueal, visto que fornece informações adicionais sobre a gravidade, extensão e aspectos dinâmicos do colapso, que podem não serem visualizados no exame radiográfico ou fluoroscópico (BJORLING, 2000). Contudo, pacientes com lesões pulmonares focais ou afecção intersticial difusa podem ser menos propensos a se beneficiar da visualização direta das vias aéreas por traqueobroncoscopia (BJORLING, 2000).

A traqueobroncoscopia é mais valiosa quando é combinada com o lavado broncoalveolar (LBA) para afecções localizadas nas pequenas vias aéreas ou alvéolos (HAWKINS, 2004). Estudo realizado por Johnson e Dragenovich (2007), Norris et al. (2002), utilizaram a broncoscopia com LBA guiada no diagnóstico definitivo de pneumonia bacteriana e fúngica, neoplasia, fibrose pulmonar e colapso brônquico e bronquiectasia em gatos. Entretanto, o seu uso é limitado devido ao elevado custo do procedimento.

O procedimento é realizado com o paciente posicionado em decúbito esternal, passando suavemente o broncoscópio por meio do trato respiratório superior, sendo que a árvore respiratória deve ser examinada de forma sistemática, passando pela traqueia, brônquio principal direito e esquerdo, e cada um de seus ramos subsequentes até o limite de comprimento do endoscópio, ou diâmetro do lúmen das vias aéreas (BJORLING, 2000). Durante o exame, os parâmetros como a consistência, coloração e aspecto da mucosa do trato respiratório; presença e aparência de secreções; e a localização das neoformações, devem ser identificados e registrados (MCKIERNAN, 2005).

2.2 Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA são amostras de células e material das vias aéreas e alvéolos obtidas por meio da traqueobroncoscopia, geralmente mais profundos do que os obtidos com lavado transtraqueal ou endotraqueal (ANDREASEN, 2003).

A técnica de traqueobroncoscopia para o LBA consiste em fixar uma seringa pré-carregada com a quantidade escolhida de solução fisiológica (NaCl 0,9%) no canal de trabalho e a realização do lavado e recuperação do fluido por

meio da mesma seringa (HAWKINS, 2004). Em alguns casos, a aspiração produz pressão negativa sem recuperação de fluido, o que se presume estar associado ao colapso das vias aéreas em resposta à sucção, e assim, o endoscópio deve ser recuado e a aspiração deve ser repetida (HAWKINS, 2004).

Uma técnica alternativa em pacientes de grande porte é fixar um frasco coletor de sucção na porta de sucção do broncoscópio, e a sucção a vácuo é anexada ao frasco coletor de sucção, permitindo maior rendimento na recuperação de fluidos, sem a necessidade de troca repetida ou evacuação de seringas (CHEEVY, 2009).

As amostras podem ser obtidas de uma região anatômica específica quando guiados por endoscopia, ou de regiões aleatória (ANDREASEN, 2003; HAWKINS, 2004). O procedimento normalmente é realizado após o exame visual e antes de qualquer outro procedimento, como escovado ou biópsia bronquial, com o intuito de se evitar a alteração dos resultados pela presença de hemorragia iatrogênica (HAWKINS, 2004). A coleta depende da infusão de um volume adequado de solução e do ajuste do broncoscópio no brônquio regional, com o intuito de facilitar a recuperação de uma alta porcentagem da solução (ANDREASEN, 2003; HAWKINS, 2004).

No entanto, similar ao lavado transtraqueal e endotraqueal, existe um debate sobre a dose ideal de solução para o LBA, embora a maioria dos autores concorde que devem ser realizadas pelo menos duas infusões em bolus por local (HAWKINS, 2004). Na maioria dos cães devem ser utilizadas pelo menos dois bolus de 25 mL por local de interesse, porém, aqueles com menos de 8 kg, podem ser usados pelo menos quatro bolus de 10 mL (HAWKINS, 2004). Segundo Hawkins et al. (1994), o volume total de 15 a 75 mL por cão, dividido em duas ou mais alíquotas foi ideal para realização do exame. Por outro lado, em um estudo retrospectivo realizado por Johnson e Drazenovich (2007), foi referenciado o uso de volume médio de 2,62 a 5,05 mL/kg em gatos, correspondendo a alíquotas de cinco ou 10 mL.

As amostras recuperadas pelo LBA são apropriadas para citologia, cultura ou diagnósticos especiais, como o exame de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), isolamento de vírus ou ensaios de antígenos específicos (HAWKINS,

1994). Estudo realizado por Hawkins (1994) avaliou os resultados da citologia com base em amostras individuais de um paciente em relação a uma amostra agrupada do mesmo paciente, não sendo identificadas diferenças significativas.

A LBA fornece um método para amostragem de um segmento específico do pulmão que demonstre evidência radiográfica ou afecção pela broncoscopia. No entanto, como os tipos e a presença de inflamação podem diferir entre os lobos pulmonares entre 37 e 42% dos lavados, a afecção pode ser facilmente não diagnosticada, especialmente se apenas um segmento pulmonar for avaliado (NOONE, 2001; RADLINSKY et al., 2004). Paralelamente, a análise do fluido da lavagem broncoalveolar não contribuiu para o diagnóstico final em 25% dos pacientes caninos que apresentaram sinais de afecção respiratória, indicando a necessidade de ferramentas adicionais para confirmar o diagnóstico (NOONE, 2001). Além disso, o fluido do revestimento epitelial coletado via LBA é diluído para 2 a 3% do volume recuperado, o que pode resultar na falha na obtenção de uma amostra representativa (BJORLING et al., 2000).

A citologia realizada por meio da LBA, determina as contagens absolutas; e aumentos relativos nos leucócitos podem ser observados na inflamação e infecção, sendo o macrófago alveolar a célula mais recuperada no LBA (> 70%) (ANDREASSEN, 2003; MCKIERNAN, 2005). O surfactante é um achado normal em amostras de LBA, deixando o fluido recuperado com aspecto mais espumoso (HAWKINS, 2004; MCKIERNAN, 2005).

Visto que a árvore traqueobrônquica não é estéril, alguns clínicos recomendam culturas bacterianas quantitativas ou semiquantitativas de LBA (PEETERS et al., 2000; MCKIERNEY, 2005). Padrid (2000); Mckiernan (2005), relataram que mais de 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) (ou cultivadas a partir de cultura primária) representaram infecção verdadeira, ao passo que menos de 10^3 UFC/mL (ou cultivadas a partir de subcultura) representam contaminação. Estudo realizado por Peeters et al. (2000), descreveu culturas bacterianas quantitativas e exame citológico em fluídos do LBA em cães, e identificaram um ponto de corte de $1,7 \times 10^3$ UFC/mL e com sensibilidade de 86% e especificidade de 100% para o diagnóstico de infecção

do trato respiratório inferior. Contudo, a presença de bactérias intracelulares no exame citológico, como critério de diagnóstico adicional, pode mudar ligeiramente esses valores, produzindo uma sensibilidade de 87% e uma especificidade de 97%.

2.3 Escovado Bronquial (EB)

O EB é uma técnica que consiste em obter células que estão aderidas à mucosa do trato respiratório inferior (HAWKINS et al., 2006). A citologia da escova traqueobrônquica é um método complementar de amostragem de vias aéreas que permite a avaliação citológica direta de lesões endobrônquicas visíveis, e possui uma sensibilidade de até 71% para o diagnóstico de malignidade em pacientes humanos, em contraste da citologia realizada pelo LBA, que possui uma sensibilidade de 37% (GARG et al., 2007).

Na Medicina Veterinária, as neoplasias malignas respiratórias raramente são endobrônquicas; no entanto, uma avaliação adicional das amostras de escovado em tais casos é considerada valiosa.

O procedimento é realizado por meio de escovas endoscópicas estéreis, que contém uma bainha de plástico retrátil. A técnica consiste na passagem da escova protegida pela bainha e pelo canal de trabalho até a área de interesse. No local da coleta deve-se avançar a escova da bainha de plástico e arrastar suavemente sobre a mucosa, seguida da retração de volta para a bainha e, por fim, a remoção do canal de trabalho (HAWKINS et al., 2006).

2.3 Biomarcadores do estresse oxidativo

Os radicais livres derivados do oxigênio e do nitrogênio são produtos do metabolismo aeróbico fisiológico, mas também são produzidos em processos inflamatórios e na maioria das disfunções biológicas (BARREIROS e DAVID, 2006). Contudo, quando esses radicais livres são produzidos em excesso,

desencadeando o estresse oxidativo, ocorrem efeitos deletérios celulares associados com a peroxidação lipídica da membrana celular (CYMROT et al., 2004; BARREIROS e DAVID, 2006). Durante o metabolismo celular aeróbico, ocorre redução tetravalente do oxigênio na mitocôndria para que se forme a molécula de água, e os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, que incluem o superóxido (O_2^-), o hidroxil (OH), o hidroperóxil (HO_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARREIROS e DAVID, 2006). O radical hidroxil (OH) é um dos componentes mais reativos que promove a peroxidação lipídica da membrana e lise celular (CYMROT et al., 2004).

Por outro lado, o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) possuem interação com íons de ferro formando o radical hidroxil (BARREIROS e DAVID, 2006). Para que não ocorra o estresse oxidativo, por meio de inativação dos radicais livres, o organismo produz os antioxidantes enzimáticos os quais incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione reduzida (GSH), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione redutase (GR) e a glutathione oxidase (GO); e os antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C e E (BARREIROS e DAVID, 2006). O estresse oxidativo pode ser determinado utilizando-se biomarcadores, que incluem a capacidade antioxidante total (CAT), que determina estado antioxidante de amostras biológicas em resposta a moléculas oxidativas produzidas no curso da afecção. Dentre as formas de se avaliar a CAT, a inibição do cátion *2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid* (ABTS) é uma metodologia interessante clinicamente visto que mensura todas as substâncias antioxidantes presentes no plasma e a interação entre elas (EREL, 2004).

A CAT também pode ser determinada pela capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) e pela capacidade redutora cúprica (CUPRAC) (RUBIO et al., 2016). Além da CAT, os antioxidantes como a albumina e o ácido úrico, a capacidade oxidante total (COT) e a peroxidação lipídica, também são biomarcadores usados para avaliar o estresse oxidativo no ambiente biológico (ALMEIDA et al., 2013). A COT refere-se ao conjunto de substâncias plasmáticas que agem como agentes pró-oxidante, favorecendo o estresse oxidativo,

enquanto que peroxidação lipídica é o produto do estresse oxidativo em membranas lipídicas (EREL, 2005).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o lavado broncoalveolar e escovado bronquial, por meio de traqueobroncoscopia, em cães diagnosticados clinicamente com afecções pulmonares.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar comparativamente o lavado broncoalveolar e escovado bronquial, por meio de traqueobroncoscopia, em cães diagnosticados clinicamente com afecções pulmonares, por meio de exames microbiológicos, citológicos e biomarcadores do estresse oxidativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu, São Paulo (SP), com número 0539/2023 (Anexo 1). Os tutores estavam cientes de todos os procedimentos e assinaram o termo de consentimento para inclusão dos animais no estudo

Os animais eram provenientes de tutores residentes no Estado de São Paulo. Foram utilizados 14 cães adultos de diferentes massas corpóreas, raças e sexo, e com o diagnóstico clínico de afecção respiratória inferior. Todos os procedimentos endoscópios foram realizados no Centro Veterinário Pet e Vida, Campinas (SP).

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo cães adultos (machos e fêmeas) submetidos à contracepção cirúrgica há pelo menos três meses, e diagnosticados clinicamente com afecção respiratória, sem medicação a pelo menos três dias antes do procedimento de laringotraqueobroncoscopia. Cães com idade inferior a um ano, com massa corpórea menor que 3 kg e com afecções em outros sistemas foram excluídos do estudo.

4.3 Procedimento experimental

Antes do procedimento de traqueobroncoscopia, os animais foram submetidos ao jejum alimentar de oito horas e restrição hídrica de duas horas.

Todos os cães foram submetidos ao procedimento anestésico utilizando o protocolo de medicação pré-anestésica com midazolan (0,3 mg/kg, via intramuscular) e indução dose efeito com propofol (2 mg/kg, via intravenosa). Posteriormente, foi realizada a inspeção endoscópica laríngea e intubação endotraqueal com tubo endotraqueal estéril. A manutenção anestésica inalatória foi realizada com o isoflurano associado ao oxigênio (100%). O tubo endotraqueal foi conectado em um cateter “mount” ou em T para que nele fosse conectado os tubos de expiração e inspiração, e o endoscópio.

Todos os animais foram submetidos à monitorização anestésica por meio da oximetria de pulso, capnografia, eletrocardiograma (ECG) e pressão arterial não invasiva, durante todo o procedimento.

Para a realização da traqueobroncoscopia foi utilizado o videobronscoscópio portátil (Argus® Modelo OIF66P) (Figura 1), que possuía tela de 3,5 polegadas, comprimento do tubo de 60 cm, espessura 5,2 mm e canal de trabalho de 2,6 mm. Antes do procedimento, o broncoscópio foi desinfetado por imersão em solução de orthoftaldeído (0,55%) durante cinco minutos, e posterior enxague com solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril.



Figura 1. Videobronscoscópio portátil Argus®, modelo OIF66P.

Com o animal em decúbito ventral e com o auxílio do abridor de boca, foi realizada a introdução do broncoscópio pelo cateter 'mount' e avaliação de todo o seguimento traqueal e os brônquios primários e secundários (Figura 2A). O lavado bronquial foi realizado com solução salina (0,9%), na quantidade entre 2 e 4 mL/kg, dependendo do grau de dispneia, dividida para cada lado pulmonar. A solução foi introduzida pelo canal de trabalho do endoscópio e, em seguida foi realizada a aspiração pelo botão de sucção acoplado ao tubo coletor de secreção, e este acoplado ao aspirador cirúrgico portátil.

Após a lavagem bronquial, foi introduzida a escova de citologia tipo *brush* estéril pelo canal de trabalho do broncoscópio (Figura 2B), e realizado o esfregaço nos brônquios principais de ambos os lados.



Figura 2. Imagem endoscópica após a realização do LBA (A) e durante o EB.

Após a broncoscopia foi prescrito dipirona (15 mg/kg, via oral), a cada oito horas, durante três dias; e nos casos em que a mucosa apresentou sinais de inflamação, como enantema e espessamento foi prescrito prednisolona (0,5 mg/kg, via oral), a cada 24 horas, durante cinco dias.

4.4 Variáveis avaliadas

4.4.1 Exame microbiológico e citológico

As amostras coletadas pelo lavado broncoalveolar e escovado bronquial foram colocados em tubos com meio *stuart*, para cultura e identificação microbiana e antibiograma. Para o exame citológico, foi realizado um esfregaço laminar e em seguida, realizado a fixação com álcool (96%) e coloração com solução de hematoxilina e eosina (H&E).

4.4.2 Biomarcadores de estresse oxidativo

Três mililitros de sangue foram coletados por venopunção da jugular e depositados em tubo com ativador de coágulo e gel separador para obtenção do soro. As amostras foram submetidas à centrifugação (3000 rotações, 10 minutos) e o soro foi removido por meio de micropipetas, e colocado em Eppendorfs e congelados à – 80° C para posterior avaliação dos biomarcadores.

O estresse oxidativo foi avaliado pela mensuração da CAT, da COT e pela determinação dos antioxidantes ácido úrico e albumina. Os níveis de ácido úrico foram determinados utilizando método enzimático-Trinder e de albumina pelo método colorimétrico com verde de bromocresol, ambos utilizando conjunto de reativos comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante, e após calibração com calibrador (Calibra H, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) e verificação com controles comerciais níveis I (Qualitrol 1H, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) e II (Qualitrol 2H, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A CAT foi determinada pela inibição do cátion ABTS (CAT-ABTS) (EREL, 2004); pela inibição do cátion ABTS associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP) (RUBIO et al., 2016a); pela capacidade antioxidante cúprica redutora (CAT-CUPRAC) (RUBIO et al., 2016b); e pela capacidade de redução férrica do plasma (CAT-FRAP) (BENZIE e STRAIN, 1996; RUBIO et al., 2017). A COT foi determinada pelo método colorimétrico do xilenol laranja (EREL, 2005).

As variáveis foram avaliadas nos seguintes momentos: antes da realização do procedimento endoscópico (M_0), após o lavado bronquial (M_1) e após escovado bronquial (M_2).

4.5 Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados os softwares R (Version 4.0.5 - © 2021, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) e o Excel Versão 16.0.6742.2048 – 2019, Microsoft, Washington, Estados Unidos). Procedeu-se o cálculo de estatística descritiva das variáveis quantitativas por meio da média, desvio padrão, mediana, valores máximo e mínimo, primeiro e terceiro quartis. A suposição de normalidade foi avaliada pelo Teste Shapiro-Wilk, nos casos em que a suposição de normalidade seja atendida utilizar-se-á o teste paramétrico Teste t para amostras dependentes e independentes. Nos casos que a suposição de normalidade não seja atendida foi usado o Teste de Wilcoxon. Em todas as comparações considerou-se a diferença significativa com valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 14 cães, com idade entre 5 e 14 anos (9 ± 3 anos) e massa corpórea 3,1 e 48 kg ($18,1 \pm 22,1$ kg). Do total dos animais, seis eram machos (6/14; 42%) e oito eram fêmeas (8/14, 58%); e as raças que participaram do estudo incluíram: sem raça definida (9/14, 64%); Akita (1/14; 7%); Chihuahua (1/14; 7%), Cocker Spainel (1/14; 7%), Pastor Alemão (1/14; 7%); e Spitz Alemão (1/14; 7%).

5.1 Avaliação microbiológica

Não foi identificado crescimento bacteriano aeróbico ou anaeróbico em nenhuma das amostras de LBA. Contudo, no EB foram identificadas o crescimento bacteriano de *Citrobacter spp* em duas amostras (14,28%) (Figura 3). Não foram observadas diferenças significativas na avaliação microbiológica entre ambas as técnicas pelo teste de distribuição do Qui-Quadrado, sendo identificada a proporção de negativo e positivo diferente tanto para o LBA ($\chi^2 = 14$ df = 1; $p < 0,001$) como para o EB ($\chi^2 = 7,14$ df = 1; $p = 0,007$).

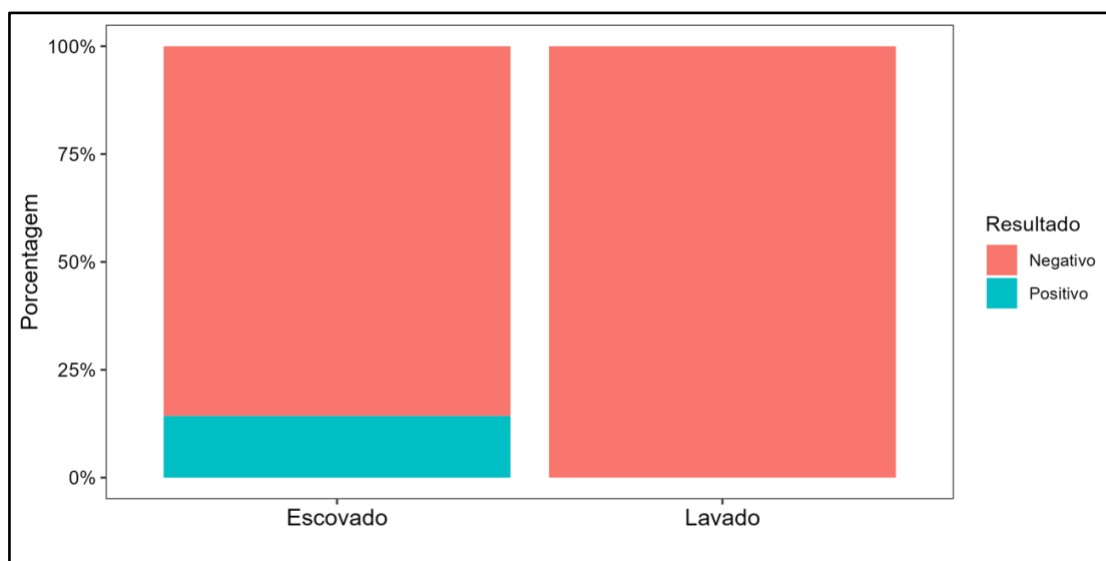


Figura 3. Gráfico demonstrando a porcentagem do crescimento bacteriano nas amostras do LBA e EB.

5.2 Avaliação citológica

Em ambas as técnicas foram identificadas células caliciformes, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade e tipo celular individual de cada animal, de acordo com a técnica.

Animal	Técnica	Epitélio Respiratório	Neutrófilo	Macrófago	Linfócitos	Eosinófilos	Mastócitos	Cocos (bacteria)	Material amorfo (muco)	Células neoplásicas
1	L	95	2	1	1	0	0	0	1	0
1	E	95	2	1	1	0	0	0	1	0
2	L	95	2	1	1	0	0	0	1	0
2	E	95	2	1	1	0	0	0	1	0
3	L	40	60	0	0	0	0	0	0	0
3	E	20	70	10	0	0	0	0	0	0
4	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	E	50	25	20	5	0	0	0	0	0
5	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	E	50	35	8	6	0	1	0	0	0
6	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	E	10	0	0	0	0	0	0	60	30
7	L	95	2	1	1	0	0	0	1	0
7	E	95	2	1	1	0	0	0	1	0
8	L	90	8	1	1	0	0	0	0	0
8	E	90	8	1	1	0	0	0	0	0
9	L	0	0	0	0	0	0	0	70	30
9	E	0	0	0	0	0	0	0	70	30
10	L	70	3	2	1	0	0	0	24	0
10	E	0	0	0	0	0	0	0	100	0
11	L	2	28	0	70	0	0	0	0	0
11	E	20	0	0	0	0	0	0	20	0
12	L	30	50	5	5	7	0	3	0	0
12	E	5	50	10	5	30	0	0	0	0
13	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	E	90	8	1	1	0	0	0	0	0
14	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	E	70	5	3	10	2	5	0	5	0

L – Lavado; E – escovado.

A representação gráfica bidimensional (Figura 4) foi usada para avaliar a presença de diferenças significativas entre as técnicas usadas em relação às células presentes na amostra. Para tal, foi utilizada dois eixos de uma Análise de Componentes Principais (PCA) (LEGENDREE e LEGENDRE 2022), e o número de eixos foi selecionado com base na técnica de Broken-Stick. Os dois primeiros eixos identificaram 82,2 % da variação dos dados, e a representação gráfica demonstrou ausência de diferenças significativas em relação à celularidade entre o LBA e o EB.

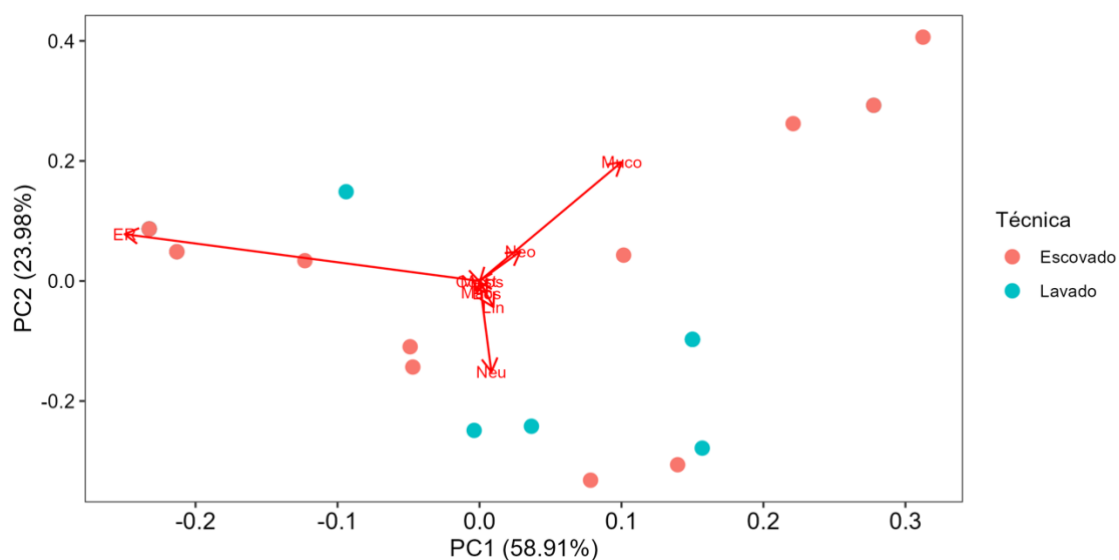


Figura 4. Representação gráfica bidimensional usada para avaliar a presença de diferenças significativas entre as técnicas usadas, de acordo com a celularidade.

5.3 Avaliação dos biomarcadores do estresse oxidativo

Não foram identificadas diferenças significativas intra e intergrupos utilizando os biomarcadores: ácido úrico, albumina, CAT-ABTS, CAT-ABTS+HRP, CAT-CUPRAC, CAT-FRAP e COT (Tabela 2).

Tabela 2. Média (Me) e desvio padrão (DP) dos biomarcadores ácido úrico (AU), albumina (ALB), capacidade antioxidante total e inibição do cátion 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (CAT – ABTS e CAT – ABTS- HRP), capacidade redutora cúprica (CAT - CUPRAC), capacidade de redução férrica do plasma (CAT - FRAP) e capacidade oxidante total (COT), avaliados nos seguintes momentos: antes da realização do procedimento endoscópico (M₀), após o lavado bronquial (M₁) e após escovado bronquial (M₂).

Variável	M0	M1	M2	F (2,26)	P
AU (mg/dL)	2,58±2,85	2,22 ±2,34	2,94±2,25	0,28	0,75
ALB (mg/dL)	2,90 ± 0,64	3,02 ± 0,70	3,18 ± 0,72	1,77	0,18
CAT_ABTS (umol/L)	1482,93±332,94	1417,07±408,19	1508,67±367,35	0,17	0,83
CAT_ABTS_HRP (umol/L)	716,32 ±414,05	798,58 ±564,79	624,26 ± 663,10	0,27	0,76
CAT_CUPRAC (umol/L)	1330,22±595,44	1395,27±662,99	1441,17±448,09	0,14	0,86
CAT_FRAP (umol/L)	618,41 ±278,73	795,80±480,68	844,61±558,58	1,81	0,18
COT (umol/L)	81,73±31,40	70,86±39,05	80,61±33,03	0,38	0,68

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o lavado broncoalveolar (LBA) e o escovado bronquial (EB) coletados por meio de traqueobroncoscopia em cães diagnosticados com afecções pulmonares, por meio dos exames microbiológicos, citológicos e dos biomarcadores do estresse oxidativo. A justificativa do estudo foi associada à controvérsia existente entre os clínicos endoscopistas em relação à eficácia diagnóstica do LBA e EB, em cães com afecções pulmonares. A hipótese que o EB apresentaria resultados significativamente melhores que o LBA na coleta de amostras não foi alcançado, pois não foram identificadas diferenças significativas entre ambas as técnicas em relação as variáveis avaliadas (exames microbiológicos e citológicos).

Zhu et al. (2015) avaliaram comparativamente a técnica do LBA e EB em 45 cães com tosse crônica, por meio de estudo retrospectivo. Esses autores, observaram que a citologia de EB detectou inflamação das vias aéreas centrais em 85% dos cães com fluido de LBA inflamatório, sendo que o tipo de inflamação relatada diferiu em 23 dos 34 cães, e desse modo concluíram que a citologia utilizando a EB pode fornecer informações complementares ao LBA.

Acredita-se que nenhum dos métodos de coleta das amostras bronquiais induziu dano celular e, conseqüentemente, estresse oxidativo, visto que, não foram observadas diferenças significativas na avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo que incluíram os antioxidantes enzimáticos (CAT-ABTS, CAT-ABTS+HRP, CAT-CUPRAC, CAT-FRAP e COT) e os não enzimáticos (ácido úrico e albumina) entre os métodos avaliados. Segundo Cymrot et al. (2004), Barreiros e David (2006), os radicais livres em excesso que induzem o estresse oxidativo celular e conseqüentemente peroxidação lipídica da membrana celular são provenientes de processos inflamatórios e na maioria das disfunções biológicas (BARREIROS e DAVID, 2006).

A técnica de LBA usada no presente estudo foi de acordo com a literatura (HAWKINS, 2004; JOHNSON 2016), e também foi utilizada uma técnica alternativa (CHEEVY, 2009), onde foi fixado um frasco coletor de sucção na porta

de sucção do broncoscópio, permitindo maior rendimento na recuperação de fluidos, sem a necessidade de troca repetida ou evacuação de seringas.

A quantidade de infusões em bolus utilizadas no presente estudo diferiu da literatura (HAWKINS et al., 1994; HAWKINS, 2004) visto que foi usado somente um bolus de infusão de solução salina (0,9%) na quantidade entre 2 e 4 mL/kg. Hawkins et al. (1994), Hawkins (2004), referenciaram o uso de pelo menos dois bolus de volume total entre 15 a 75 mL por local de coleta de interesse; em gatos foi referenciado o uso de volume médio de 2,62 a 5,05 mL/kg em gatos (JOHNSON e DRAZENOVICH (2007).

O método do EB usado no estudo foi similar do preconizado por Hawkins et al. (2006), e não foi observado sangramento no trans e pós-operatório, comumente identificado em escovados onde ocorre trauma da mucosa no momento do procedimento (Hawkins et al. (2006).

Em relação ao exame microbiológico, não foi observado diferença significativa entre ambas as técnicas, porém, em duas amostras coletadas por meio do EB foi identificado a *Citrobacter spp*. A mesma bactéria foi isolada em estudo realizado por Johnson et al. (2001), utilizando o EB, totalizando em três amostras de um total de 24 cães com colapso traqueal. Estudo realizado por Kansla et al. (2022), onde foi usado o LBA para coleta de exame microbiológico e citológico em cães com o diagnóstico de broncopneumopatia eosinofílica, concluiu que o LBA foi considerado o teste padrão-ouro na confirmação da afecção.

No exame citológico, não foram observadas diferenças significativas em relação às células identificadas em ambas as técnicas, estando presentes as células caliciformes, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos. No estudo realizado por Hawkins et al. (2006), em 10 cães com tosse crônica associada à bronquite neutrofílica ou eosinofílica, o exame citológico realizado por meio da escova traqueobrônquica não identificou a inflamação neutrofílica em 1/5 dos cães, porém, identificou a presença de neutrófilos em 4/5 dos casos em que a citologia do LBA foi eosinofílica ou mista. Essa informação isolada não esclarece o diagnóstico e tratamento do paciente, mas se for associado com o quadro clínico do paciente, poder-se-á realizar o diagnóstico definitivo. Entretanto,

células do epitélio respiratório (células caliciformes), material amorfo ou muco e neutrófilos foram as principais células identificadas na literatura (JOHNSON et al., 2013).

A limitação do estudo incluiu a ausência de mensuração das enzimas antioxidantes específicas, contudo, os métodos de determinação do estresse oxidativo mais apropriados para cada situação, bem como as metodologias para cada espécie, ainda necessitam de estudos e pesquisas adicionais.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÕES

Conclui-se que não existe diferença ao se analisar os aspectos microbiológicos e citológico do material coletado por lavado broncoalveolar e escovado guiado por traqueobroncoscopia, e que ambos os métodos não induzem estresse oxidativos em cães, sendo ambas as técnicas seguras e minimamente invasivas.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ANDREASSEN, C. B. Bronchoalveolar lavage. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. 69-88, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113 - 123, 2006.

BJORLING, D; MCANULTY, J; SWAINSON, S. Surgically treatable upper respiratory disorders. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, n.6, p. 1227–1251, 2000.

DE OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; Salomão, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v.37, p.277–285, 2004.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v.38, p.1103–1111, 2005.

HAWKINS, E. C. Bronchoalveolar lavage. In: King LG, editor. **Respiratory Disease in Dogs and Cats**. St. Louis: WB Saunders;p. 118–127, 2004.

HAWKINS, E. C.; ROGALA, A. R.; LARGE, E. E., et al. Cellular composition of bronchial brushings obtained from healthy dogs and dogs with chronic cough and cytologic composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from dogs with chronic cough. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 1, p. 160-167, 2006.

Kansla, A.S.; Kavitha, S.; Bhavani, M.S.; Chandrasekaran, D.; Vairamuthu, S. and Pazanivel, N. Bronchoscopic Evaluation of Eosinophilic Bronchopneumopathy in Dogs. **Indian Journal of Animal Research**, B-4736, p.1-7, 2022

KUEHN, N. F.; HESS, R. S. Bronchoscopy. In: King LG, editor. **Respiratory Disease in Dogs and Cats**. St. Louis: WB Saunders; p. 112–118, 2004.

JOHNSON, L. R.; DRAZENOVICH, T. Flexible bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in 68 cats (2001–2006). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 219-225, 2007.

JOHNSON, L. Small animal bronchoscopy. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.31, n. 4, p. 691-705, 2001.

JOHNSON, L. R.; FALES, W. H. Clinical and microbiologic findings in dogs with bronchoscopically diagnosed tracheal collapse: 37 cases (1990–1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 9, p. 1247-1250, 2001.

JOHNSON, L. R.; QUEEN, E. V.; VERNAU, W.; SYKES, J. E.; BYRNE, B. A. Microbiologic and Cytologic Assessment of Bronchoalveolar Lavage Fluid from Dogs with Lower Respiratory Tract Infection: 105 Cases (2001–2011). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 259-267, 2013.

JOHNSON, L. R. Laryngeal structure and function in dogs with cough. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 249, n. 2, p.195-201, 2016.

MCKIERNAN, B. C.; SMITH, A. R.; KISSIL, M. Bacterial isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 20, n. 1, p. 139-142, 1984.

MCKIERNAN, B. C. Bronchoscopy. In: McCarthy TC, editor. **Veterinary Endoscopy for the Small Animal Practitioner**. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 201–227.

NOONE, K. E. Rhinoscopy, pharyngoscopy, and laryngoscopy. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 31, n. 4, p. 671-689, 2001.

NORRIS, C. R.; GRIFFEY, S. M.; SAMII, V. F., et al. Thoracic radiography, bronchoalveolar lavage cytopathology, and pulmonary parenchymal histopathology: a comparison of diagnostic results in 11 cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.38, n. 4, p. 337-345, 2002.

PADRID, P. A.; FELDMAN, B. F.; FUNK, K. et al. Cytologic, microbiologic, and biochemical analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained from 24 healthy cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 8, p. 1300 – 1307, 1991.

PADRID, P. Pulmonary diagnostics. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, n. 6, p. 1187-1206, 2000.

PEETERS, D. E., MACKIERNAN, B. C., WEISIGER, R. M., et al. Quantitative bacterial cultures and cytological examination of bronchoalveolar lavage specimens in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 5, p. 534-541, 2000.

PRYOR, W.A., STANLEY, J.P., BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids** v.11, p.370–9. 1976.

RADLINSKY, M. G.; MASON, D. E., HODGSON, D. Transnasal laryngoscopy for the diagnosis of laryngeal paralysis in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 211-215, 2004.

RUBIO, C.P., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., MARTINEZ-SUBIELA, S., TVARIJONAVICIUTE, A., ARNAO, M.B., CERON, J.J. Validation of three automated assays for total antioxidant capacity determination in canine serum samples. **Veterinary Diagnostic Investigation**, v.28, n.6, p.693-698, 2016.

RUBIO, C.P., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., MARTINEZ-SUBIELA, S., TVARIJONAVICIUTE, A., CERON, J.J. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. **BMC Veterinary Research**, v.12, 166, 2016.

RUBIO, C.P., MARTINEZ-SUBIELA, S., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., TVARIJONAVICIUTE, A., CERON, J.J. Analytical validation of an automated assay for ferric-reducing ability of plasma in dog serum. **Journal. Vet. Diagnostic Investig.** v.29, p.574–578, 2017.

RUBIO, C.P., TVARIJONAVICIUTE, A., MARTINEZ-SUBIELA, S., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., CERÓN, J.J., Validation of an automated assay for the measurement of cupric reducing antioxidant capacity in serum of dogs. **BMC Veterinary Res.**, v.12, 137, 2016.

ZHU, B.Y.; JOHNSON, L.R.; VERNAU, W. Tracheobronchial brush cytology and bronchoalveolar lavage in dogs and cats with chronic cough: 45 cases (2012-2014). **Journal of Veterinary Internal Medicine.**, v. 29, n. 2, p. 526-532, 2015.

10. ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atesto que o Projeto "AVALIAÇÃO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR E ESCOVADO BRONQUIAL POR MEIO DE TRAQUEOBRONCOSCOPIA EM CÃES" **Protocolo CEUA 0539/2023**, a ser conduzido por Paulo Vinicius Abbade Moreira Souza, responsável/orientador Ivan Felismino Charas dos Santos, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	03/11/2023 a 31/12/2023
Nome Comum / Espécie / Linhagem	CANINA / CANIS LUPUS FAMILIARIS / Heterogênica
Raça	Variada
Nº de animais machos	7
Nº de animais fêmeas	8
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	15
Peso médio de animais fêmeas	15
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	2 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Tutores

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 01/11/2023

JULIANY GOMES QUITZAN
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Comia, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2170 - patricia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br