

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ESTUDO CLÍNICO- CITOLÓGICO E DA ATIVAÇÃO DE
NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS E DO LAVADO
TRAQUEOBRÔNQUICO DE OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E
PORTADORES DE BRONCOPNEUMONIA**

MAYRA TEIXEIRA ALAS MARTINS

Botucatu – SP
Dezembro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ESTUDO CLÍNICO- CITOLÓGICO E DA ATIVAÇÃO DE
NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS E DO LAVADO
TRAQUEOBRÔNQUICO DE OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E
PORTADORES DE BRONCOPNEUMONIA**

MAYRA TEIXEIRA ALAS MARTINS

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Martins, Mayra Teixeira Alas.

Estudo clínico-citológico e da ativação de neutrófilos sanguíneos e do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios e portadores de broncopneumonia / Mayra Teixeira Alas Martins. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Capes: 50501003

1. Ovinos – Aparelho respiratório. 2. Pulmões - Doenças. 3. Pneumonia. 4. Neutrófilos. 5. Traquéia - Secreções. 6. Brônquios – Secreções.

Palavras-chave: Broncopneumonia, ovinos, lavado traqueobrônquico, neutrófilos.

Nome do Autor: Mayra Teixeira Alas Martins

Título: Estudo clínico-citológico e da ativação de neutrófilos sanguíneos e do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios e portadores de broncopneumonia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves _____

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus Botucatu

Prof. Dr. Simone Biagio Chiacchio _____

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus Botucatu

Prof. Dr. Fernando José Benesi _____

Membro

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

Data da Defesa: 10 de Dezembro de 2012

Dedicatória

Dedico este trabalho...

*Aos meus queridos pais **Ricardo Alas Martins e Mary Rose Teixeira**
e ao meu irmão **Ricardo Alas Martins Júnior**,
sem vocês esta conquista seria impossível.*

Amo vocês!

*Ao meu namorado **Luiz Fernando Salgado Scagion**,
por incondicionalmente me apoiar, me compreender e
fazer os meus dias muito mais felizes.*

Amo você!

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, voluntária ou involuntariamente, durante o período do mestrado. Estou certa de que nessas poucas palavras não poderei me expressar ou agradecer tanto quanto gostaria ou tanto quanto mereçam, mas saibam que cada um de vocês é responsável por uma pequena ou grande parte deste trabalho e que serão sempre lembrados por mim com muito carinho e gratidão.

Muito obrigada...

*Ao meu querido orientador **Dr. Roberto Calderon Gonçalves**, pelo incentivo desde sempre, ensinamentos e oportunidade. Mais que um excelente orientador de mestrado, o vejo como um grande amigo.*

*Aos pós-graduandos **Bianca Paola Santarosa, Danilo Otávio Laurenti Ferreira, Gabriela Dantas, João Alexandre Matos Carneiro e Naiana da Silva Branchini**, pela enorme ajuda na fase de colheitas de amostras.*

*À equipe do Laboratório Clínico Veterinário, composta pelos professores: **Dr^a. Regina Kiomi Takahira e Dr. Raimundo Souza Lopes**, por disponibilizarem o laboratório, material, equipamentos e pessoal; residentes: **Carolina Kimie Mori, Katiane Lohn de Souza, Mariana Serrano Melanchauski e Marina Mitie Monobe**, pelas análises hematológicas; e pós-graduandas: **Camila Martos Thomazini, Soraya Regina Sacco e Tatiana de Souza Barbosa**, pelas dicas, conselhos e ajuda efetiva durante a padronização dos processamentos laboratoriais.*

*Aos pós-graduandos que se dedicaram totalmente e participaram de maneira fundamental durante as coletas, processamento e leituras: **Bianca Paola Santarosa, Carolina Kimie Mori, Hugo Enrique Orsini Beserra e Naiana Branchini da Silva**. Se este trabalho foi concluído, foi graças a toda colaboração de vocês.*

*Ao **Prof. Dr. Adriano Dias**, por sua contribuição na análise estatística dos resultados, dedicação e rapidez.*

*Aos funcionários do Serviço de Clínica de Grandes Animais desta Faculdade: **César Leme da Silva e Marco Antônio Simão da Silva**, pela pronta disposição em ajudar nas diversas vezes solicitadas, pelas dicas e soluções de problemas.*

*À toda equipe do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP, em particular aos funcionários: **José Roberto de Lalla Júnior e Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel**, por toda gentileza e esclarecimentos de dúvidas.*

*À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Unesp – Campus de Botucatu** pela disponibilização da infraestrutura.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo Auxílio Financeiro à Pesquisa sem o qual este trabalho não poderia ser realizado e pela Bolsa de Estudos concedida, proporcionando a minha permanência e exclusividade no programa de pós-graduação.*

Além dos colaboradores efetivos, de forma fundamental para a conclusão do trabalho e obtenção do título, aqui menciono...

*Meus pais **Ricardo Alas Martins** e **Mary Rose Teixeira**, que vencendo todas as dificuldades, proporcionaram e impulsionaram meus estudos. Sou extremamente grata por ter tido a oportunidade de tê-los como pais... Eu somente espelho o que por vocês foi semeado, cuidado e tão amado. Meu eterno amor e agradecimento!*

*Meu irmão **Ricardo Alas Martins Júnior**, agradeço por todo o convívio e incentivo. Sei que vivemos fases diferentes, com oportunidades diferentes e que isso poderia ter gerado conflitos ou ciúme entre nós e contrariamente a isso, sempre senti muito amor em suas palavras. Irmão, muito obrigada por existir na minha vida e com certeza fazer com que ela fosse muito mais divertida.*

*Meu namorado **Luiz Fernando Salgado Scagion**, que surgiu de repente, se mostrando um excelente amigo e aos poucos tomou tal proporção na minha vida, antes inimaginável. Hoje, é impossível projetar meu futuro sem você. Meu Amor, sou muito grata por você compartilhar dos meus sonhos e vontades, por toda a ajuda, apoio e paciência, mas principalmente por fazer questão de vivenciar todos os meus momentos, tornando-os nossos. As pessoas sempre estão à procura de alguém que os complete, mas eu achei você, que vai muito além disso, que me transborda. Te amo, mais que ontem e menos que amanhã!*

Meus queridos amigos cultivados durante esses anos, meu eterno agradecimento pelo apoio, momentos de descontração, risadas e pela simples presença. As pessoas que vivem sem amigos não conhecem a verdadeira felicidade! Eu tenho uma “família conquistada”, portanto considero-me feliz e privilegiada por tê-los conhecido e assegurando-lhes que são bastante especiais pra mim.

*As colegas de pós-graduação **Andreza Amaral da Silva** e **Carla Maria Vela Ulian** obrigada por toda a ajuda e recepção desde meu início na pós graduação e principalmente pela amizade cultivada e momentos compartilhados na “salinha”, regado a boas conversas, dicas, música e brincadeiras.*

*As secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, em especial à **Marlene Dias Camargo**, muito obrigada pela ajuda.*

*Os professores do setor de Clínica Médica de Grandes Animais da FMVZ, **Dr. Alexandre Secorun Borges**, **Dr. Rogério Martins Amorim** e **Dr. Simone Biagio Chiacchio**, muito obrigada pelo acolhimento e disponibilidade.*

Epígrafe

“A rocha é imensa e dura. O cortador bate uma, duas, três, dez vezes, nenhuma rachadura. Ele dá 100 marteladas, só tirando lascas. Na centésima primeira batida, a rocha imensa e dura se parte em duas. O cortador de pedras sabe que não foi somente aquela martelada a que conseguiu, mas também todas as que vieram antes.”

Autor desconhecido

“Muitos fracassos da vida ocorrem com pessoas que não perceberam quão próximas estavam do sucesso quando desistiram.”

Thomas Edison

Listas de Tabelas, Figuras e Abreviaturas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis: temperatura (°C), frequência respiratória (mpm) e frequência cardíaca (bpm) de ovinos sadios (G1), portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.....	45
Tabela 2	Frequências de observação e percentuais dos sinais clínicos de ovinos sadios (G1), portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.....	46
Tabela 3	Ocorrência dos sinais clínicos em cada um dos ovinos portadores de broncopneumonia moderada do G2 da região de Botucatu/SP.....	48
Tabela 4	Ocorrência dos sinais clínicos em cada um dos ovinos portadores de broncopneumonia grave do G3 da região de Botucatu/SP.....	48
Tabela 5	Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis do leucograma no sangue periférico e fibrinogênio de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.....	50
Tabela 6	Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.....	52
Tabela 7	Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis dos testes de atividade de neutrófilos com Tetrazólio	

Nitroazul no sangue periférico e no lavado traqueobrônquico de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.....55

Tabela 8 Coeficientes de correlação e valores de p , através do teste Ró de Spearman (ρ) entre as porcentagens de neutrófilos ativos e os totais de neutrófilos sanguíneos (μ l) de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.....56

Tabela 9 Valores de referência do leucograma de ovinos adultos.....65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Materiais utilizados para coleta à campo: algodão com álcool iodado; caneta; lidocaína gel; luvas de procedimento; seringa de 60ml; solução fisiológica (NaCl 0,9%); sonda guia (silicone); sonda para coleta (polietileno); tubos contendo heparina e EDTA; e tubos falcon com capacidade de 15 e 50ml.....35
- Figura 2** Contenção física e posicionamento do animal com a cabeça e pescoço estendidos.....35
- Figura 3** Introdução da sonda de silicone (sonda guia) pela narina, nasofaringe e traqueia do animal.....36
- Figura 4** Passagem da sonda de polietileno (sonda de coleta) por dentro da sonda guia até a região traqueobrônquica do animal.....36
- Figura 5** Infusão de Solução Fisiológica estéril e apirogênica para a obtenção do lavado traqueobrônquico.....37
- Figura 6** Obtenção da amostra traqueobrônquica através de aspirações sequenciadas e repetidas.....37
- Figura 7** Stimulant (catálogo n°. 84015) e Nitroblue Tetrazolium 1mg (catálogo n°. 840-10), fabricante: Sigma-Aldrich®; microtubos plásticos com capacidade de 500µl, sem e com papel alumínio envolto.....41
- Figura 8** Materiais para processamento laboratorial, armazenamento e realização dos testes NBT: caixa de papelão; caixa porta-lâmina; câmara de Neubauer; caneta; contador de células; estimulante; flutuador; lâmina extensora, lâminas foscas; micropipetas;

microtubos plásticos; relógio; suportes; Tetrazólio Nitroazul; tubos contendo EDTA; tubos tipo Falcon de 15 e 50ml.....41

- Figura 9** Médias e desvios-padrão das variáveis dos hemogramas dos ovinos dos grupos: G1, animais sadios; G2, animais portadores de broncopneumonia moderada; e G3, animais portadores de broncopneumonia grave. A: Fibrinogênio plasmático; B: Contagem total de leucócitos; C: Neutrófilos segmentados; D: Eosinófilos; E: Linfócitos; F: Monócitos; G: Basófilos.....51
- Figura 10** Médias e desvios-padrão das variáveis dos lavados traqueobrônquicos dos ovinos dos grupos: G1, animais sadios; G2, animais portadores de broncopneumonia moderada; e G3, animais portadores de broncopneumonia grave. A: Contagem de células nucleadas totais; B: Células epiteliais ciliadas; C: Células epiteliais; D: Macrófagos; E: Neutrófilos; F: Linfócitos; G: Eosinófilos.....53
- Figura 11** Avaliação citológica do lavado traqueobrônquico de ovinos. A = animal do G1 com predominância de macrófagos; B = animal do G3 com predominância de neutrófilos.....54
- Figura 12** Porcentagens médias da atividade dos neutrófilos através dos testes de NBT, estimulado (NBT-E) ou não (NBT-NE), dos animais sadios (G1), portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3). A: Neutrófilos sanguíneos. B: Neutrófilos presentes no lavado traqueobrônquico.....55
- Figura 13** Porcentagens individuais dos neutrófilos ativos no sangue e no lavado traqueobrônquico dos ovinos (n=50) pertencentes aos três grupos experimentais (G1, G2 e G3), através dos testes com Tetrazólio Nitroazul, estimulado (NBT-E) ou não (NBT-NE).....56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

-	Ausente ou negativo
+	Presente ou positivo
↑	Aumentado
μL	Microlitro
bpm	Batimentos por minuto
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiamida tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FB	Fibrinogênio
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
G1	Grupo um
G2	Grupo dois
G3	Grupo três
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CFS	Fator estimulador de colônias de granulócito-monócito
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBrO	Composto halogenado – ácido hipobroso
HCIO	Composto halogenado – ácido hipocloroso
IFN- γ	Interferon gama
IgA-S	Imunoglobulina A secretora
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina um
IL-10	Interleucina dez
IL-6	Interleucina seis
IL-8	Interleucina oito
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolisacarídeo
LTB	Lavado traqueobrônquico
MA(s)	Macrófago(s) alveolar(ES)

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mpm	Movimentos por minuto
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Adenina nicotinamina dinucleotídeo fosfato
NADPH oxidase	Adenina nicotinamina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NBT - E	Teste estimulado de atividade de neutrófilos
NBT- NE	Teste não estimulado de atividade de neutrófilos
NBT	Tetrazólio Nitroazul
O₂⁻	Superóxido
O₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
OH⁻	Hidroxila
PFA(s)	Proteína(s) de fase aguda
PMN(s)	Polimorfonuclear(es)
PT	Proteína Total
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VG	Volume globular

Sumário

SUMÁRIO

Página

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1 Broncopneumonia em ovinos	09
2.2 Resposta inflamatória sistêmica	10
2.2.1 Hemograma e leucograma	14
2.3 Mecanismos de defesa e resposta inflamatória pulmonar	15
2.4 Metabolismo oxidativo de neutrófilos.....	19
2.4.1 Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos por meio do teste de redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT)	21
2.5 Recuperação e análise de amostras traqueal, brônquica e alveolar	23
2.5.1 Métodos de colheita das amostras	23
2.5.2 Estudo citológico das amostras	27
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Animais	32
4.2 Exame clínico e grupos experimentais	32
4.3 Colheita da amostra de sangue	33
4.4 Colheita do lavado traqueobrônquico	34
4.5 Local e processamento das amostras	38
4.5.1 Avaliação hematológica	38
4.5.2 Determinação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos sanguíneos	38
4.5.3 Avaliação do líquido do lavado traqueobrônquico	39
4.5.4 Determinação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos do lavado traqueobrônquico	40
4.5 Análises estatísticas	42

5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9. ARTIGO CIENTÍFICO	96
10. ANEXO	110

Resumo e Abstract

MARTINS, M.T.A. **Estudo clínico-citológico e da ativação de neutrófilos sanguíneos e do lavado traqueobrônquico de ovinos clinicamente sadios e portadores de broncopneumonia.** Botucatu, 2012. 111p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RESUMO

Os ovinos são muito susceptíveis às doenças pulmonares, sendo a broncopneumonia mais frequente e responsável por desencadear intensa resposta inflamatória, sistêmica e local, principalmente neutrofílica. O objetivo deste estudo foi analisar a resposta inflamatória sistêmica e pulmonar de ovinos portadores de broncopneumonia moderada e grave e as atividades neutrofílicas através dos testes estimulado (NBT-E) ou não (NBT-NE), com Tetrazólio Nitroazul, no sangue periférico e no lavado traqueobrônquico. Para isso, por exame clínico, 50 ovinos foram selecionados e subdivididos em três grupos: G1 – animais sadios (n=19); G2 – portadores de broncopneumonia moderada (n=21); e G3 – portadores de broncopneumonia grave (n=10). A resposta inflamatória sistêmica foi avaliada pela interpretação do exame físico, leucograma e fibrinogênio plasmático. A resposta inflamatória local, por sua vez, pela associação das alterações respiratórias ao exame físico específico e à celularidade do lavado traqueobrônquico (LTB). A atividade dos neutrófilos sanguíneos dos grupos G1 e G2 foi percentualmente semelhante e a daqueles do LTB nula. O G3 apresentou diminuição da porcentagem de neutrófilos sanguíneos ativados e atividade de NBT significativa dessas células no LTB. Nestas condições experimentais, os resultados demonstraram que o exame clínico minucioso e a associação dos sinais clínicos são fidedignos para a graduação dos estágios da broncopneumonia; a gravidade das respostas inflamatórias, sistêmica e local, é dependente do grau de comprometimento pulmonar e há tendência à leucocitose neutrofílica e ao aumento do número de células nucleadas no LTB conforme a gravidade da doença; há redução do número de neutrófilos ativos circulantes e presença destes no LTB nas broncopneumonias graves.

Palavras-chave: broncopneumonia, ovinos, lavado traqueobrônquico, neutrófilos.

MARTINS, M.T.A. **Clinical-cytological study and evaluation of neutrophils activation on blood and tracheobronchial lavage of healthy and bronchopneumonia affected ovine.** Botucatu, 2012. 111p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

ABSTRACT

Ovine are highly susceptible to lung diseases, being bronchopneumonia the most frequent and responsible for triggering intense inflammatory response, systemic and local, mainly neutrophilic. The aim of this study was analyze lung and systemic inflammation of moderate and severe bronchopneumonia affected ovine and the neutrophilic activity through stimulated (S-NBT) and not stimulated (NS-NBT) assays with Nitroblue Tetrazolium, on peripheral blood and on tracheobronchial lavage (TBL). For that, 50 animals were selected and divided based on clinical examination into three groups: G1 – healthy animals (n=19), G2 – moderate bronchopneumonia (n=21), and G3 – severe bronchopneumonia (n=10). The systemic inflammation was evaluated by the interpretation of physics parameters, white blood cells (WBC) counts and plasma fibrinogen. The local inflammatory response, in turn, by the association of respiratory abnormalities on physical examination and the TBL cellularity. The systemic neutrophils activity from G1 and G2 were similar, and the lung neutrophils activity was null. The G3 showed a reduction of the activated systemic neutrophils rate, and expressive activity of these cells on the TBL. On these experimental conditions the results showed that a detailed clinical examination associated with the clinical signs is a reliable method for the graduation of the bronchopneumonia severity; the gravity of the local and systemic inflammation relies on the lung commitment degree and there is a tendency to neutrophilic leukocytosis and increase of the nucleated cells number on the TBL, associated with the illness severity; there is a reduction of active circulating neutrophils and its presence on the TBL when the animal is stricken by severe bronchopneumonia.

Key words: bronchopneumonia, sheep, traqueobronchial lavage, neutrophil.

Introdução

1. Introdução

A ovinocultura apresenta crescimento contínuo na região Sudeste do Brasil decorrente do aumento no consumo de carne de cordeiro, o que surge como solução econômica para os pecuaristas de pequeno e médio porte viabilizando os sistemas de produção animal nessas propriedades e mostrando-se mais uma alternativa de investimento. Observa-se que o crescimento populacional e a intensificação na produtividade aumentaram o número de animais mantidos sob regime de confinamento, o que predispõe a diversas doenças.

Os problemas respiratórios são considerados como uma das principais causas de perdas na ovinocultura (CUTLIP et al., 1998), sendo responsáveis por 10 a 40% das mortes em animais adultos (VIEIRA et al., 1993) e por 17% das mortes durante o período perinatal (ROOK et al., 1990). Entre as enfermidades respiratórias que acometem os ovinos, a broncopneumonia é a mais frequente e de maior importância (RADOSTITS et al., 2002), gerando grandes perdas econômicas representadas por altas taxas de morbidade e mortalidade, conversão alimentar ineficiente, retardo no crescimento e ganho de peso, condenações de carcaças e custos com medicamentos, assistência veterinária (RUSVAI e FODOR, 1998) e morte dos animais acometidos.

A doença respiratória é precedida por desequilíbrios na tríade de interação entre um ou mais agentes infecciosos, principalmente vírus e bactérias, o sistema de defesa do hospedeiro e o ambiente. Caracteriza-se por

acentuada resposta inflamatória frente à infecção instalada (BOWLAND e SHEWEN, 2000; RADOSTITS et al., 2007) que é fundamental para a efetiva eliminação dos agentes infecciosos. No entanto, o controle da inflamação é igualmente importante para a prevenção da lesão tecidual excessiva mediada pelos leucócitos (STANDIFORD et al., 1996). A migração e ativação dos leucócitos em tecidos inflamados são reguladas por complexa rede de interações entre as citocinas, leucócitos, endotélio vascular, moléculas de adesão celular e fatores quimiotáticos circulantes (MALAZDREWICH et al., 2001).

Tendo em vista a importância desses problemas faz-se necessária a obtenção de grande número de informações semiológicas para melhor acurácia diagnóstica, especificamente visando à gravidade do processo inflamatório para que medidas terapêuticas e profiláticas sejam instituídas prontamente.

Sabe-se que no processo diagnóstico de qualquer enfermidade é imprescindível a realização de anamnese criteriosa e exame físico minucioso (GONÇALVES, 2004). Nos casos de comprometimento respiratório não é diferente, mas quando estes recursos semiológicos não são suficientes para o diagnóstico definitivo, podemos usufruir de métodos auxiliares até sua conclusão. Porém os exames complementares auxiliam não só no desfecho, mas também no prognóstico, plano terapêutico e preservação do paciente.

Dentre os exames complementares comumente usados nos casos de ovinos com alterações respiratórias estão o hemograma, lavado traqueobrônquico, exames radiográfico e ultrassonográfico e centese de tórax, trepanação de seios paranasais, gasometria, biopsia pulmonar, endoscopia, suabe nasal, exame parasitológico e titulação de anticorpos (GONÇALVES, 2004; PUGH, 2005).

Tendo em vista o acompanhamento da gravidade do processo inflamatório, dos exames supracitados, o hemograma e a avaliação citológica do lavado traqueobrônquico podem ser destacados como métodos aplicáveis, pouco invasivos, de fácil realização e bastante fidedignos. Com esta 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 (GONÇALVES, 1997; FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES, 2004). Sabe-se que em ovinos, a técnica do lavado

traqueobrônquico pela via nasotraqueal é eficaz na obtenção de celularidade dos segmentos mais distais do trato respiratório (MARCONDES et al., 2011).

Mensurar os neutrófilos ativados presentes nas vias aéreas e compará-los com os do sangue periférico, em ovinos portadores de broncopneumonia, contribuirá para o entendimento da resposta inflamatória frente à doença nesta espécie animal, pré-requisito necessário para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas que amenizem ou evitem lesões pulmonares durante a broncopneumonia. Vale destacar a técnica do lavado traqueobrônquico como ferramenta diagnóstica bastante útil, de fácil realização e baixo custo que poderá contribuir para avaliar melhor a inflamação tecidual, bem como a efetividade dos procedimentos terapêuticos e acurácia do prognóstico.

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1 Broncopneumonia em ovinos

As broncopneumonias resultam em prejuízos econômicos significativos por terem como características as altas taxas de morbidade e mortalidade, impacto na conversão alimentar levando à diminuição de crescimento e ganho de peso, inviabilização do consumo da carne e gastos com medicamentos e assistência veterinária (RUSVAI & FODOR, 1998). Na Nova Zelândia, as perdas financeiras devido ao comprometimento pulmonar no rebanho ovino, atingem US\$ 32,4 milhões (GOODWIN-RAY et al., 2008).

A prevalência da broncopneumonia é maior em animais jovens, sob regimes de semiconfinamento ou confinamento total, condições de superlotação e sob situações estressantes, como transporte, tosquia e mudanças térmicas bruscas (SMITH, 2006). No Brasil a doença atinge maior número de animais durante os meses chuvosos de fevereiro a março (ARAÚJO et al., 2004), embora Lacasta e colaboradores (2008) não tenham observado influência significativa da estação do ano e da temperatura ambiental na incidência dos quadros de broncopneumonia ovina, na Espanha.

A broncopneumonia nos ovinos é uma doença multifatorial que ocorre quando há a combinação de condições ambientais desfavoráveis e práticas de manejo inadequadas, que determinam falhas nos mecanismos de defesa dos

animais e sobrecarregam os pulmões (BROGDEN et al., 1998, SMITH, 2006). As broncopneumonias de origem infecciosa são as mais frequentes em ovinos (PUGH, 2005) e os principais agentes envolvidos são: as bactérias – *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* (PUGH, 2005; RADOSTITS et al, 2002); os vírus – Adenovírus Ovino 6 (AVO-6), Herpes Vírus Ovino, Maedi-Visna, Parainfluenza tipo 3 (PI-3) e Sincicial Respiratório (VSR) (LEHMKUHL & CUTLIP, 1981; PUGH, 2005); e os micoplasmas – *M. arginini* (PUGH, 2005) e *M. ovipneumoniae* (TRIGO, 1987).

A doença respiratória se instala quando há desequilíbrio na tríade de interação: agente(s) infeccioso(s), sistema de defesa do hospedeiro e ambiente (BOWLAND & SHEWEN, 2000; RADOSTITS et al., 2002) e é caracterizada por alteração inflamatória de brônquios, bronquíolos e parênquima pulmonar (RADOSTITS et al., 2002).

De acordo com Gonçalves (1997), dentre os sinais clínicos relacionados ao comprometimento das vias aéreas posteriores e parênquima pulmonar incluem-se os obtidos:

- À inspeção – tosse, corrimento nasal bilateral, aumento da frequência respiratória e dispneia;
- À palpação – frêmito traqueal, bronquial e pleural;
- À percussão pulmonar – sons submaciços ou maciços;
- À auscultação – aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncoalveolar, áreas de silêncio, crepitações grossa e fina, roncos, sibilos e roce pleural.

Essas manifestações clínicas dependem diretamente do grau de comprometimento, portanto não necessariamente o animal apresentará todos os sinais, porém sabe-se que quanto mais associações, maior é a gravidade do processo (GONÇALVES et al., 2001).

2.2 Resposta inflamatória sistêmica

A inflamação consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas (COELHO, 2002; ROBBINS et al., 2005). É uma resposta de defesa do organismo que ocorre após o dano celular que

inclui a participação de diferentes tipos celulares, principalmente células com função fagocitária (RAHMAN & MACNEE, 2000).

A resposta inflamatória é consequência da ação conjunta dos componentes efetores do sistema imune, que promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios durante uma agressão tecidual, seja ela infecciosa ou não. Esta ação resulta na liberação de inúmeras substâncias, como as citocinas que mediam a migração de neutrófilos e células mononucleares até o sítio de inflamação desencadeando localmente os cinco sinais clássicos: rubor, edema, calor, dor e perda da função (GONZÁLEZ et al., 2007).

As alterações sistêmicas desencadeadas durante a inflamação são devidas às citocinas, cuja produção é estimulada por produtos bacterianos, como os lipopolissacarídeos (LPS), e clinicamente estão relacionadas à febre, aumentos da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, apatia, anorexia, aumento das proteínas de fase aguda (PFAs) e leucocitose, entre outros (ROBBINS et al., 2005).

As PFAs são assim chamadas porque sua concentração plasmática é alterada rapidamente em processos inflamatórios, traumas cirúrgicos e estresse (JAIN, 1993). Embora sejam produzidas principalmente no fígado, estudos relatam a possibilidade de produção extra-hepática, como nos vasos sanguíneos, adipócitos e tecido mamário, e por neutrófilos ativados e macrófagos alveolares (ECKERSALL & BELL, 2010). O fibrinogênio é a proteína mais empregada para avaliação da reação de fase aguda devido à facilidade de mensuração. Nos ruminantes, é um excelente indicador devido à grande capacidade de produção desta espécie frente às enfermidades, sendo considerada melhor que a leucometria como indicador da inflamação (SILVA, 2012).

A hipertermia é a elevação da temperatura corpórea e tem ação benéfica por estimular reações de defesa, como a produção de anticorpos, mobilidade e atividades bactericida e fagocítica de leucócitos, e inibição do crescimento de alguns microorganismos (FEITOSA, 2008). É induzida por pirógenos exógenos e mediada pelos pirógenos endógenos, sendo o mais importante destes, a interleucina-1 (IL-1), produzida por monócitos e macrófagos (RADOSTITIS et al., 2007).

A leucocitose é o aumento do número de leucócitos na circulação sanguínea, mensurada através do leucograma (KERR, 2003). O termo leucócito inclui todas as células brancas e suas precursoras, portanto possuem diferentes formas, origens e funções. De acordo com essas características podem ser divididos em duas categorias: os granulócitos que abrangem os neutrófilos, eosinófilos (polimorfonucleares - PMN) e os basófilos; e os mononucleares, representados pelos linfócitos e monócitos (KERR, 2003; SMITH, 2006).

Os granulócitos e monócitos desenvolvem-se na medula óssea a partir de sequenciadas diferenciações de uma célula-tronco. Na primeira destas há a formação do mieloblasto que originará dois tipos celulares: o pró-monócito que dará origem ao monócito; e o pró-granulócito, que sequencialmente originará o mielócito e o metamielócito que se diferencia em neutrófilo, eosinófilo ou basófilo (KERR, 2003).

Os neutrófilos são células que apresentam diâmetro de 10 a 12µm, um único núcleo parcialmente segmentado que lhes conferem forma lobulada, apresentando de 3 a 5 lobos. A cromatina é densa e o citoplasma pode possuir granulação fina e delicada (REAGAN et al., 1998; REBAR et al., 2003). Em colorações do tipo Leishman, o citoplasma torna-se azulado e os grânulos róseos (KERR, 2003). Os neutrófilos imaturos são chamados de bastonetes e ainda não possuem o núcleo lobulado; o surgimento das reentrâncias nucleares destas células ocorre conforme a maturação, portanto as lobulações do núcleo representam envelhecimento celular (REAGAN et al., 1998; KERR, 2003). Têm a principal função de fagocitar e destruir material estranho, especialmente bactérias patogênicas. Os produtos bacterianos, as substâncias liberadas de linfócitos ativados (linfocinas), os macrófagos e as lesões celulares são responsáveis pela atração de neutrófilos, que se movem por quimiotaxia e se ligam à partícula estranha. As opsoninas são componentes proteicos do soro que se aderem às partículas estranhas e as tornam mais suscetíveis à fagocitose (SMITH, 2006). São os leucócitos em maior quantidade no sangue periférico das espécies domésticas, com exceção dos ruminantes (REAGAN et al., 1998).

Os eosinófilos de ruminantes possuem núcleo segmentado e vários grânulos arredondados e uniformes (REAGAN et al., 1998; THRALL, 2007)

contendo proteínas com propriedades citotóxicas (WELLER, 1984; VENGE, 1990; WELLER, 1991). Estes leucócitos são os mais importantes no controle das infecções parasitárias, mas fornecem pouca resistência do hospedeiro à infecção bacteriana. Atuam na regulação das reações inflamatórias por meio da inativação de histamina, leucotrienos, fator ativador de plaquetas e outros mediadores químicos envolvidos e também atuam nas reações alérgicas regulando as respostas de hipersensibilidade tipo I (SMITH, 2006).

Os basófilos são relativamente escassos no sangue, são maiores que os neutrófilos, apresentam núcleos lobulados e possuem o citoplasma preenchido com numerosos grânulos (THRALL, 2007). O basófilo atua semelhantemente ao mastócito, ambos possuem substâncias intragranulares estocadas que mediam sua participação nos processos alérgicos e inflamatórios. Tem como principal função, iniciar a reação de hipersensibilidade imediata por meio da secreção de mediadores vasoativos, incluindo histamina, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas e outros (SMITH, 2006).

Os linfócitos são produzidos na medula óssea, linfonodos, timo, baço e placas de Peyer (SMITH, 2006). Possuem núcleo de arredondado a oval, quantidade mínima de citoplasma claro e podem ter tamanhos variados (THRALL, 2007). São os leucócitos predominantes em ruminantes (REAGAN et al., 1998). Os linfócitos T são originados no timo e estão em maior número que os linfócitos B na circulação de animais de grande porte. Além de possuírem função citotóxica direta para destruir células estranhas desencadeando as reações de hipersensibilidade tardia responsável pela rejeição de enxertos e tumores, fornecem resistência a determinados patógenos intracelulares. Já os linfócitos que derivam da medula óssea são chamados de células B e transformam-se em plasmócitos que, sob regulação dos linfócitos T, são responsáveis pela produção de anticorpos (SMITH, 2006).

Os monócitos são células grandes, de 15 a 20µm de diâmetro, possuem núcleo de formatos variáveis (oval, reniforme ou segmentado), cromatina menos densa que a dos neutrófilos e o citoplasma podendo conter grânulos extremamente finos (REAGAN et al., 1998; THRALL, 2007). Como já citado, são produzidos na medula óssea e liberados na circulação onde permanecem por 1 a 3 dias, alcançando em seguida as cavidades e tecidos corpóreos transformando-se então em macrófagos, estes, possuem atividade fagocítica

para remover tecidos mortos ou lesados, ação antimicrobiana contra bactérias, vírus, fungos e protozoários, reparo e modelação tecidual, e secreção de monocinas, enzimas lisossômicas e fatores de coagulação (SMITH, 2006).

2.2.1 Hemograma e Leucograma

O hemograma incluindo a concentração de fibrinogênio, normalmente revela achados inespecíficos, mas pode ser útil na avaliação de casos com suspeita de condições inflamatórias (WILSON & LOFSTEDT, 2006). O leucograma faz parte do hemograma e é realizado pela análise quantitativa e qualitativa dos leucócitos do sangue periférico (KERR, 2003). Apesar de fornecer informações valiosas sobre o estado geral e momentâneo da produção, distribuição e fisiopatologia leucocitária, raramente é patognomônico em determinada doença, porém quando associado aos sinais clínicos auxilia na avaliação da gravidade do processo instalado (LATIMER & MEYER, 1992).

O leucograma consiste na contagem dos leucócitos, análise diferencial e morfológica dessas células (SMITH, 2006). A contagem diferencial de leucócitos pode ser apresentada como valor relativo, ou seja, em porcentagem (%) ou valor absoluto, em número de células por microlitro (μ l) de sangue. Esta última deve, preferencialmente, ser usada na interpretação do exame.

Para Gonçalves (2004), o leucograma fornece informações esclarecedoras, principalmente no sentido de indicar se a alteração respiratória é infecciosa ou não. As infecções virais agudas frequentemente induzem à anemia e leucopenia transitória, predominantemente linfopenia, seguida por monocitose, durante a recuperação. A neutrofilia e a hiperfibrinogenemia são características de muitas condições inflamatórias, mas geralmente são mais marcantes no diagnóstico de uma infecção bacteriana ou nas pneumonias por aspiração (WILSON & LOFSTEDT, 2006).

Pacientes com doença respiratória infecciosa crônica podem apresentar leucocitose por neutrofilia, hiperfibrinogenemia, anemia, e, muitas vezes, hiperproteinemia devido à hiperglobulinemia (PUSTERLA et al., 2006).

Vale ressaltar que os bovinos e os ovinos apresentam fisiologicamente número de linfócitos maior que de neutrófilos (SMITH, 2006). Nos quadros de resposta infamatória aguda em ruminantes, geralmente acompanhada à leucocitose neutrofílica há linfopenia. Fato que está mais associado à

recuperação destas células da circulação para os tecidos linfóides por ação das citocinas, do que por sua ação em debelar a infecção (JAIN, 1993).

Jain (1993) descreve que em ruminantes, a leucocitose com aumento do número de monócitos indica maior severidade e duração do processo inflamatório instalado, caracterizando cronificação da broncopneumonia.

Pouco se tem na literatura sobre o leucograma de ovinos com broncopneumonia, porém, correlacionando os dados de Silva (2012) com estudos realizados em bovinos, pode se concluir que a leucocitose por neutrofilia é compatível com a doença, especialmente em quadros agudos.

A eosinofilia pode ser indicativa de intensa parasitose (BUDDLE et al., 1992). Quando esta hipótese é descartada nos animais com sintomatologia de comprometimento respiratório o aumento no número de eosinófilos, pode ser devido a outros processos compatíveis com ativação e degranulação deste tipo celular mediada por imunocomplexos (SILVA, 2012).

2.3 Mecanismos de defesa e resposta inflamatória pulmonar

O risco de uma infecção respiratória está associado à habilidade dos patógenos terem acesso à superfície do epitélio respiratório e, posteriormente, estabelecer a infecção invasiva (WELSH & MASON, 2001). O trato respiratório tem como principal função a interface entre o hospedeiro e o meio ambiente e, devido à grande área de contato com o meio externo, é continuamente exposto a uma diversificada gama de microorganismos, partículas orgânicas e inorgânicas (ZHANG et al., 2000; BOYTON & OPENSHAW, 2002; HAPPEL et al., 2004; PILETTE et al., 2004; MASON & NELSON, 2005; ZAAS & SCHWARTZ, 2005). Além disso, existe a possibilidade da ascensão de patógenos até o aparelho respiratório por via hematogênica, em função da grande extensão da superfície para as trocas gasosas (WELSH & MASON, 2001; COHN & REINERO, 2007).

A fim de proteger o trato respiratório do hospedeiro contra estes desafios recorrentes e eliminar qualquer partícula que tenha acesso às vias aéreas posteriores, um complexo e robusto sistema de defesa foi desenvolvido (ZHANG et al., 2000; BOYTON & OPENSHAW, 2002; HAPPEL et al., 2004; MASON & NELSON, 2005). Esse sistema de defesa conta com mecanismos

que representam uma adaptação mais avançada aos agentes infecciosos ou a uma situação específica, sendo alguns deles semelhantes aos observados em outros sistemas do organismo animal, como o de limpeza mucociliar, enquanto outros são encontrados exclusivamente no trato respiratório, como os reflexos da tosse e espirro, anatomia sinuosa das vias aéreas e a filtração aerodinâmica (HAPPEL et al., 2004; ZAAS & SCHWARTZ, 2005; COHN & REINERO, 2007). Esses mecanismos de defesa aparecem ordenados e podem atuar em conjunto ou em sequência (BEVINS, 1999).

A tosse é um reflexo iniciado por estímulos irritativos em receptores subepiteliais distribuídos em grande número nas vias aéreas anteriores, desde a laringe até a bifurcação dos brônquios principais. Esses receptores podem ser estimulados por agentes químicos (gases), mecânicos (secreções, corpos estranhos), térmicos (ar frio, mudanças bruscas de temperatura) e inflamatórios (mediadores químicos) (HARADA & REPINE, 1985; NICOD, 1999). Os impulsos aferentes provenientes das vias aéreas passam principalmente pelo nervo vago e dirigem-se para o “centro da tosse” no bulbo, onde é desencadeada uma sequência automática de eventos pelos circuitos neuronais, que culmina com a expulsão súbita e forçada de ar dos pulmões (CUNNINGHAM, 1999).

A resposta imune inata também desempenha papel fundamental na defesa das vias aéreas, principalmente contra agentes patogênicos (ZAAS & SCHWARTZ, 2005). No aparelho respiratório a resposta imune inata está sempre ativa e é imediatamente responsiva, pronta para reconhecer e inativar partículas que penetram as vias aéreas. É constituída por uma série de eventos e substâncias que serão ativados independentemente das características do agente infectante e com base no reconhecimento de sítios comuns aos diferentes patógenos, portanto, não necessitam de sensibilização prévia. Contudo, não confere nenhuma proteção futura (NELSON & SUMMER, 1998; SCHUTTE & McCRAY, 2002; HAPPEL et al., 2004; ZAAS & SCHWARTZ, 2005; COHN & REINERO, 2007). Integram esse sistema barreiras físicas (epitélio respiratório), humorais (complemento, citocinas e moléculas antimicrobianas) e celulares (macrófagos alveolares, polimorfonucleares e células imunes efectoras) (NELSON & SUMMER, 1998; BEVINS, 1999; TRAVIS et al., 2001; HAPPEL et al., 2004).

Como os mecanismos de defesa do aparelho respiratório e a resposta imune inata desenvolvem-se e atuam independentemente da presença de infecções e não são providos de especificidade para um determinado microorganismo, são considerados a primeira linha de defesa do trato respiratório (NELSON & SUMMER, 1998; BEVINS, 1999; TRAVIS et al., 2001; HAPPEL et al., 2004).

Contudo, a insuficiência ou dano desses sistemas pode levar a progressão de agentes patogênicos em número suficiente para estabelecer uma infecção (PILETTE et al., 2004; MASON & NELSON, 2005). Os mecanismos de defesa celular participam da fagocitose de partículas e reações imunológicas para combater esses agentes (HARADA & REPINE, 1985; MASON & NELSON, 1999; MASON & NELSON, 2005). Fazem parte da defesa inata celular, células fagocíticas (macrófagos alveolares) e células imunes efetoras (células dendríticas e natural killer) presentes na luz dos alvéolos (SCHUTTE & McCRAY, 2002).

Devido à sua localização no tecido alveolar, o macrófago alveolar (MA) é a primeira linha de defesa celular contra partículas e microorganismos infecciosos que penetram profundamente nos pulmões (ZHANG et al., 2000; VALDIVIA-ARENAS et al., 2007). Constituindo cerca de 80% a 90% das células observadas no líquido que recobre as vias aéreas de animais hígidos, os MAs podem permanecer livres na luz alveolar ou presentes no interstício (LIGGITT, 1985; GILLES & AZEVEDO NETO, 1987; MOREIRA & LEITE, 1991; HAPPEL et al., 2004). Os MAs possuem múltiplas funções como: iniciação e modulação da resposta inflamatória pela liberação de mediadores químicos, como as citocinas; ação bactericida por sua capacidade fagocítica e pela produção de lisozima e defensinas; produção de componentes do complemento que facilitam a opsonização de microorganismos; e envolvimento na remodelação e reparação pulmonar (NICOD, 1999).

A fagocitose é um evento complexo que envolve, no mínimo, o reconhecimento de uma partícula pela superfície dos MAs e sua ligação a esse material, seguido da sua “ingestão”. A superfície altamente complexa da membrana dos MAs fornece extensa área para a fixação (LIGGITT, 1985; HAPPEL et al., 2004). Embora a adesão de macrófagos aos antígenos possa ocorrer aleatoriamente, esta ligação é facilitada pela presença de receptores

específicos sobre os macrófagos (DeLONG & KOTLOFF, 2000; WELSH & MASON, 2001; HAPPEL et al., 2004; COHN & REINERO, 2007; VALDIVIA-ARENAS et al., 2007). Cabe ressaltar que a ligação do MA ao microorganismo e até mesmo a fagocitose ocorrem de forma mais eficiente quando o antígeno é opsonizado, seja por componentes do complemento ou pela imunoglobulina G (IgG) (HARADA & REPINE, 1985; DeLONG & KOTLOFF, 2000).

Em comparação com os monócitos do sangue, os MAs demonstram maior capacidade de fagocitar partículas e menor potencial de explosão respiratória. Esta diferença pode ter evoluído em parte para limitar uma resposta inflamatória exagerada, o que poderia comprometer o trato respiratório posterior (DeLONG & KOTLOFF, 2000).

A defesa fagocitária dos MAs é essencial para a depuração diária de pequenos desafios microbianos. Contudo, quando os patógenos invasores são muito virulentos ou representam uma carga demasiadamente grande, essas células liberam mediadores químicos que orquestram o recrutamento de um grande número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) em direção ao espaço alveolar. Estes PMNs recrutados fornecem capacidade fagocítica auxiliar e são críticos para a erradicação efetiva dos patógenos invasores (NELSON & SUMMER, 1998; MOREIRA & LEITE 1991; DeLONG & KOTLOFF, 2000; ZHANG et al., 2000; WELSH & MASON, 2001).

Os PMNs, figurados no trato respiratório principalmente por neutrófilos e eosinófilos, representam a maior população de fagócitos intravasculares e são essenciais na defesa contra muitas infecções bacterianas e outros microorganismos. Estes fagócitos patrulham a circulação periférica e rapidamente migram para os sítios de infecção em resposta a vários estímulos inflamatórios, incluindo compostos derivados de microorganismos e mediadores químicos liberados por células e tecido (ZHANG et al., 2000; HAPPEL et al., 2004).

Os eosinófilos são menos comumente recrutados para o pulmão para fins de fagocitose e de atividade antimicrobiana. Eles demonstram maior importância na defesa contra infecções parasitárias (NICOD, 1999; DeLONG & KOTLOFF, 2000).

Os neutrófilos são os PMN em maior quantidade na circulação e cerca de 40% permanecem agrupados na parede dos vasos pulmonares (pool

marginal) (MURPHY & FLORMAN, 1983; NICOD, 1999). Em estados pulmonares normais poucos neutrófilos são observados no espaço alveolar, porém, na presença de infecção e inflamação pulmonar são prontamente recrutados (GOLDSTEIN & SHAK, 1994; DeLONG & KOTLOFF, 2000; ZHANG et al., 2000; HAPPEL et al., 2004), tornando-se funcionalmente ativos. Sua atividade fagocítica é maior do que a dos MAs (MURPHY & FLORMAN, 1983) e destroem o agente por degranulação de seus lisossomas e ação de radicais livres e H_2O_2 gerados por queima respiratória não mitocondrial (GOLDSTEIN & SHAK, 1994). As substâncias presentes nos grânulos neutrofílicos são poderosos compostos antimicrobianos que possuem atividade contra a maioria das espécies de microorganismos (NELSON & SUMMER, 1998; NICOD, 1999; DeLONG & KOTLOFF, 2000; ZHANG et al., 2000; HAPPEL et al., 2004).

2.4 Metabolismo oxidativo de neutrófilos

Os mecanismos antibacterianos dos neutrófilos são classificados em dependentes e independentes de oxigênio. O mecanismo dependente de oxigênio é iniciado pela fagocitose ou por distúrbios na membrana da célula e envolvem uma série de reações com produção de espécies reativas de oxigênio, que interagem com outras substâncias ou atuam diretamente sobre as bactérias. A ativação do metabolismo oxidativo de neutrófilos é modulada por vários mediadores inflamatórios como o peptídeo N-formilado, os leucotrienos, o fator ativador de plaquetas, o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias granulócito-monócito (GM-CSF), o interferon- γ e o fator de necrose tumoral (TNF). Nas reações inflamatórias os monócitos e/ou linfócitos ativados secretam várias citocinas, como interleucina-1 (IL-1), o TNF e o interferon- γ que estimulam as células endoteliais e/ou fibroblastos a secretarem os fatores estimuladores de colônias (G-CFS e GM-CFS), que ativam os neutrófilos. Outros estímulos envolvidos no disparo de explosão respiratória são as partículas opsonizadas, alguns componentes do complemento, a imunoglobulina G (IgG), a concavalina A e a fosfolipase C (STYRT, 1989).

A adenina nicotinamina dinucleotídeo fosfato ligada à membrana (NADPH oxidase) é uma enzima que cataliza a produção do superóxido e, por

meio do seu complexo, ativa os neutrófilos que estão em contato com microorganismos fornecendo-lhes agentes bactericidas, viricidas e fungicidas (BABIOR, 2004). Estima-se que aproximadamente 1 a 4% do oxigênio que reage na explosão respiratória leva a formação do radical superóxido (KANNAN & JAIN, 2000).

A ativação da NADPH oxidase depende da interação do citocromo b associado à membrana e de outras proteínas localizadas no interior da célula. Sob estímulo, as proteínas do citosol são transportadas para a membrana e completam o sistema NADPH oxidase. O sistema NADPH oxidase catalisa a reação de redução do oxigênio molecular (O_2) para ânion superóxido (O_2^-), determinando rápido aumento da atividade da oxidase causando uma explosão respiratória no consumo de oxigênio ("respiratory burst"). As reações da explosão respiratória produzem derivados tóxicos do oxigênio no vacúolo fagocítico. Porém, esta reação é dependente de uma contínua redução do NADP para suprir o elétron receptor NADPH na redução do oxigênio (O_2) para ânion superóxido (O_2^-). O NADPH é suprido por um aumento no metabolismo da glicose através da via da hexose monofosfato. Após o ânion superóxido (O_2^-) ser produzido, ele é rapidamente transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) geram hidroxila ($OH^\cdot$) e o oxigênio (O_2) (KANEKO et al., 1997).

Os neutrófilos têm papel fundamental na fagocitose e morte de bactérias. Durante a fagocitose ocorre a ativação do metabolismo oxidativo que leva a um aumento no consumo de oxigênio pelos neutrófilos, gerando substâncias altamente oxidantes (radical superóxido e peróxidos). Esses produtos oxigenados gerados são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e possuem papel fundamental na destruição do tecido inflamatório, uma vez que essas formas reativas de oxigênio provocam reações secundárias capazes de destruir bactérias e outras células (BABIOR, 1978; ZINKL & KABBUR, 1997).

Embora metabólitos de oxigênio gerados pelos neutrófilos sejam necessários para o mecanismo de defesa antimicrobiano, estes radicais livres produzidos podem lesar o neutrófilo e o tecido ao seu redor (WEISS & LOBUGLIO, 1982). Os radicais livres produzidos podem induzir a peroxidação de lipídios na membrana do eritrócito, que diminui sua capacidade de

deformabilidade, sendo removidos da circulação precocemente (PFAPPEROTT et al., 1982; CLASTER et al., 1984). Segundo WEISS e KLAUSNER (1988) os radicais livres ainda podem modificar a estrutura antigênica da membrana do eritrócito, o que permite a ligação de imunoglobulinas resultando em destruição eritrocitária.

Existem vários métodos de avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, dentre eles estão: a determinação do consumo de oxigênio, redução do ferricitocromo C, quimioluminescência, determinação da atividade da mieloperoxidase, habilidade de iodinação, determinação da 2,7-diclorofluoresceína por citometria de fluxo, sendo o teste de redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT) um dos mais indicados (BAEHNER & NATHAN, 1968). A mensuração quantitativa do metabolismo oxidativo foi dificultada em alguns testes, como a quimioluminescência e a redução do citocromo C por serem complicados e trabalhosos (RICHARDSON et al., 1998).

Nas últimas décadas a citometria de fluxo foi desenvolvida para identificar os produtos do metabolismo oxidativo, sendo uma metodologia mais simples e capaz de mensurar a atividade de centenas de neutrófilos em um período muito curto de tempo (BASS et al., 1983).

2.4.1 Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos por meio do teste de redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT)

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos pode ser avaliado pelo teste de redução do NBT à formazan (MILLER & KAPLAN, 1970). Este teste foi considerado como de triagem em hospitais (SARA & DWARAKNATH, 1977), amplamente utilizado para o diagnóstico de doença granulomatosa crônica em crianças (MILLER & KAPLAN, 1970), malária, micoplasmose, meningite viral, extremamente útil na determinação de defeitos na explosão respiratória em pacientes com infecções crônicas recorrentes (BABIOR, 1978) e avaliação da atividade bactericida do neutrófilo (ROTH et al., 1983).

Segundo Wintrobe (1939), o teste do NBT é mais confiável que a contagem total de leucócitos como indicativo de infecção bacteriana, uma vez que, condições de estresse também podem levar a um quadro de leucocitose. Já as modificações enzimáticas detectadas na reação do teste NBT, que aparecem durante as infecções, são independentes de leucocitose (BEISEL,

1967; FEIGIN et al, 1971). Em um trabalho publicado por Feigin e colaboradores (1971), pacientes com infecções bacterianas tiveram depósitos de formazan aumentados quando comparados com indivíduos saudáveis ou com outras enfermidades de origem não bacteriana, o que faz do teste do NBT um método simples para avaliar a capacidade bactericida dos neutrófilos. Além disso, auxilia no prognóstico das doenças infecciosas, através da avaliação e acompanhamento da eficiência da terapia antimicrobiana (FEIGIN et al, 1971).

O microrganismo invasor é rodeado pelos pseudópodes dos neutrófilos, formando um fagossomo. Logo em seguida os grânulos presentes no citoplasma dos neutrófilos fundem suas membranas com aquelas do fagossomo de modo que possam liberar seu conteúdo no interior do fagossomo e destruir o agente invasor por meio de enzimas lisossomais e agentes oxidantes (JANEWAY et al., 2007). Durante este processo há aumento no consumo de oxigênio em aproximadamente 200 vezes (BABIOR, 2004) e de acordo com Ferreira e Matsubara (1997), em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio que sofre redução formando água (H_2O), produz as EROs: O_2^- , hidroperoxila (HO_2), OH^- , H_2O_2 e os compostos halogenados: $HClO$ e $HBrO$.

Por serem consideradas espécies altamente reativas, as EROs são liberadas primariamente no interior dos fagossomos, onde se combinam rapidamente com as proteínas microbianas e lipídeos resultando na oxidação dos mesmos.

O NBT é um corante supravital amarelo claro que quando adicionado a uma suspensão de neutrófilos entra no vacúolo fagocítico junto com a partícula ingerida. No vacúolo fagocítico, o corante é reduzido pelo ânion superóxido a um precipitado insolúvel de coloração azul enegrecida conhecido como formazan (NATHAN, 1974). Dessa maneira, constituindo-se um método rápido, simples, que não requer isolamento celular e de baixo custo, presta-se muito bem à avaliação do metabolismo oxidativo dos fagócitos (GORDON et al., 1973).

O teste do NBT pode ser considerado como mensuração indireta da atividade microbicida dependente de oxigênio dos neutrófilos (GORDON et al., 1975; FELDMAN et al, 2000) e pode ser avaliado por meio da microscopia óptica ou por espectrofotometria (METCALF et al., 1986). A redução do corante

pode ser avaliada ao visibilizar, à microscopia óptica, as células redutoras que apresentam precipitado intracitoplasmático de azul escuro a enegrecido, e assim determinar o percentual de positivas (CIARLINI, 1997). Nesta avaliação, a localização do formazan é muito heterogênea, podendo apresentar-se ligado à membrana da célula ou no interior dos fagócitos (NATHAN, 1974). Os depósitos de formazan podem ser reconhecidos de duas formas: um único e grande depósito de coloração negra localizada no citoplasma de células ativadas, representando o vacúolo fagocítico, ou como múltiplas manchas negras distribuídas aleatoriamente no citoplasma da célula. Aglomerados e sobreposições de plaquetas e neutrófilos podem dificultar a identificação do formazan (NATHAN, 1974).

Park e Good (1970), com o objetivo de evitar resultados falsos negativos, desenvolveram uma técnica que avalia a capacidade do neutrófilo em reduzir o NBT na presença de um estimulante à base de extrato bacteriano inativado, conhecido como teste estimulado de redução do NBT (NBT- E). O teste do NBT-E distingue os resultados falsos negativos devido a defeitos metabólicos dos resultados verdadeiramente negativos associados com a ausência de infecção bacteriana ativa. A extensão da produção do formazan pelo fagócito em repouso é muito menor do que aquela observada durante a fagocitose.

Na Medicina Veterinária, Poli e colaboradores (1973) foram os primeiros a utilizarem o teste de NBT em cães com doenças bacterianas e desde então, o teste foi utilizado em diversas situações e diferentes espécies de animais de grande porte, por Ciarlini e colaboradores (1997) e Laposy e colaboradores (2000) em equinos, Borges (1998), Amorim (2002) em bovinos, Lopes e colaboradores (2003) em caprinos e Ciarlini (1998) em ovinos.

2.5 Recuperação e análise de amostras traqueal, brônquica e alveolar

2.5.1 Métodos de colheita das amostras

Diariamente, os profissionais da área clínica buscam o diagnóstico de doenças através dos exames físicos e complementares (MEDRONHO, 2004), porém a confiabilidade dos resultados e a interpretação adequada são importantes (FRANCO & PASSOS, 2005). Atualmente, a utilização dessas

técnicas é justificada por oferecer diagnóstico rápido e resultados confiáveis (GONÇALVES, 1997).

Primeiramente, na Medicina, a aspiração traqueal foi introduzida como método de colheita de amostras do trato respiratório para análises bacterianas e citológicas (PECORA, 1959) e desde a década de 70 vem sendo utilizada na Medicina Veterinária. São procedimentos comumente utilizados para avaliação do trato respiratório posterior para, através do exame citológico de material obtido das vias aéreas posteriores, ser possível determinar a causa da doença pulmonar, especialmente quando outras técnicas falham (RAKICH & LATIMER, 1989).

A técnica foi adaptada para equinos por Mansmann e Knight (1972) e, mais tarde, Beech (1975) sugeriu que a citologia dessas amostras poderia ser utilizada na avaliação de cavalos com doenças respiratórias crônicas (HOFFMAN & VIEL, 1997) com boa correlação entre a citologia e a histologia pulmonar nesses animais (WHITWELL & GREET, 1984; DERKSEN et al., 1989).

A aspiração de secreções traqueais para as análises citológica e microbiológica pode ser realizada de maneira transtraqueal, pela via percutânea ou via canal de biópsia durante a avaliação endoscópica. Ambas são relativamente fáceis de serem executadas à campo (HELSON & VIEL, 2002).

O lavado traqueobrônquico realizado através de traqueocentese é realizado sob rigorosas medidas de antissepsia. É obtido com a perfuração com uma agulha grossa (60x30-40) entre os anéis traqueais na região média do pescoço e cranial à bifurcação do músculo esternocéfálico e passagem de um cateter de polietileno, atingindo assim o lúmen traqueal. Feito isso, injeta-se de 20 a 100 ml de solução fisiológica estéril, aspirando-a em seguida. O material obtido pode ser encaminhado para exame citológico e/ou microbiológico (GONÇALVES 1987; GONÇALVES et al., 1990; FERNANDES et al., 2000; HEWSON & VIEL, 2002; ZINKL, 2002).

A técnica transtraqueal possui a vantagem da não contaminação da amostra por microrganismos da flora comensal da nasofaringe, diferentemente das amostras coletadas com a passagem do endoscópio pela cavidade nasal e porção anterior do trato respiratório (HEWSON & VIEL, 2002). Mas apresentam

o risco, como consequências de laceração dos anéis traqueais, de estenose traqueal, condromas (BEECH, 1991), enfisema subcutâneo, celulite no local da incisão e risco de ruptura do cateter com progressão de pedaços para dentro da traqueia (Wilkins et al., 2006).

Gonçalves (1987) e Barros e colaboradores (1994), ao trabalharem com lavado traqueal por traqueocentese em bezerros saudáveis e portadores de broncopneumonia bacteriana, verificaram que esse recurso diagnóstico contribuiu para identificar a etiologia e estabeleceram o baixo risco dessa técnica, ressaltando a facilidade de aplicação do método pelos profissionais no campo.

Ambas as técnicas auxiliam o clínico tanto na realização do diagnóstico como no estabelecimento do prognóstico. Fornecem acesso ao trato respiratório posterior, permitindo a colheita de células, de material para cultura microbiológica e exames imuno-histoquímicos, facilitando o diagnóstico do agente causal (GONÇALVES et al., 2004).

Segundo Gonçalves (1997), os métodos de colheita do lavado traqueobrônquico devem obedecer a alguns preceitos metodológicos, tanto na realização, quanto no processamento do líquido obtido. A técnica não pode ser de difícil execução, deve ser barata, segura e desenvolvida de tal maneira, que permita o emprego a campo pelos médicos veterinários. O líquido do lavado tem que ser rico em células e ser representativo das regiões mais profundas do pulmão (ZINKL, 2002). A sondagem nasotraqueal surgiu como método alternativo, com custo menor que a endoscopia (GONÇALVES, 1997) e menos traumática que a traqueocentese.

O LTB por via nasotraqueal pode ser realizado com o animal em posição quadrupedal e a cabeça e pescoço estendidos. A sondagem é realizada com tubo guia siliconizado, introduzido através da narina e direcionado até a porção mais baixa da traqueia. Por dentro desse tubo, destinada à infusão e aspiração do conteúdo, uma sonda de polietileno é introduzida (GONÇALVES, 2004). Fernandes e colaboradores (2000) e Hewson e Viel (2002) descrevem infusões de alíquotas estéreis de 60 ml de solução salina 0,9% ou solução fosfatada salina tamponada (PBS).

Esta técnica foi utilizada em bezerros e mais indicada para realização de citologia, tendo em vista a possibilidade de contaminação do material com

secreções do trato respiratório anterior (GONÇALVES, 2004). Apesar de não explorada em ovinos, Marcondes e colaboradores (2011) provaram que a metodologia descrita anteriormente mostrou-se eficiente na obtenção de amostras das vias aéreas distais, com representatividade celular da região broncopulmonar à semelhança das demais espécies estudadas (GONÇALVES, 1997; FERNANDES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2004).

Segundo Wilson e Lofstedt (2006), o LBA é a técnica mais conveniente para avaliação da doença pulmonar difusa. A maior vantagem do lavado broncoalveolar é a obtenção de células locais do trato respiratório posterior e consequente boa correlação com a avaliação histopatológica pulmonar. O aspirado traqueal é um método de avaliação menos sensível (MANSMANN & KING, 1998).

A técnica do LBA envolve aceso às vias aéreas posteriores através de um endoscópio ou cateter que tenha sido passado traqueia abaixo e se encaixado em um brônquio. Dependendo da vigorosidade da lavagem, seu volume e da progressão ou não do cateter até as vias aéreas menores, o método produz amostras de lavado bronquial ou broncoalveolar (SPEIRS, 1997).

No entanto, uma vez que o líquido é instilado em uma região limitada do pulmão, nos casos em que as lesões estão localizadas longe de onde a colheita é feita, o resultado não é representativo (SPEIRS, 1997). Para contornar isso, a coleta através da endoscopia permite a visualização das estruturas do trato respiratório e direcionamento da sonda para o lobo pulmonar mais afetado (HEWSON & VIEL, 2002).

Gonçalves e colaboradores (2004) mencionam que são essenciais a especificação precisa dos aspectos avaliados e o reconhecimento das limitações metodológicas que possam interferir nos resultados, pois a literatura apresenta vários resultados citológicos de lavados pulmonares de animais sadios e doentes bastante variados. A metodologia de colheita e as condições patológicas nem sempre uniformes dificultam a comparação dos achados e, por consequência, a diferenciação entre o normal e o alterado.

Independente da técnica utilizada e das controvérsias assinaladas, a citologia do líquido que recobre as vias aéreas apresenta boa aceitação no auxílio diagnóstico, não só pela confirmação etiológica e diferenciação

prognóstica das broncopneumonias, como também pela relação com achados histopatológicos (LARSON & BUSH, 1985).

2.5.2 Estudo citológico das amostras

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 a avaliação dos tipos celulares (BEECH, 1981; WHITWELL & GREET, 1984; STÖBER, 1993). Além das contagens totais e diferenciais, devem ser levadas em consideração as alterações morfológicas celulares e a presença de vacuolizações citoplasmáticas, 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 (WHITWELL & GREET, 1984), e a contagem diferencial apresenta maior valor diagnóstico do que a contagem total de células (ZINKL, 2002).

Em animais clinicamente sadios, os macrófagos alveolares predominam no lavado traqueobrônquico. Já em 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). Os agentes infecciosos frequentemente causam redução do número de macrófagos no lavado (SLAUSON et al., 1987), e, como a reação inflamatória local no pulmão estimula a migração quimiotática de neutrófilos (GONÇALVES, 1997; MARCONDES et al., 2011), há predominância desse tipo celular.

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; ZINKL, 2002). Na lavagem broncoalveolar, a constituição celular difere de modo significativo da transtraqueal, apresentando predomínio de macrófagos (60% - 80%) com poucas células epiteliais cilíndricas ciliadas (MAIR et al., 1987; DERKSEN et al., 1989; ZINKL, 2002), moderado número de linfócitos (20% - 30%), poucos neutrófilos (<5%) e raros mastócitos (<2%) (ZINKL, 2002).

Fernandes e colaboradores (2000), também realizando estudos comparativos dos exames citológicos obtidos de amostras de LTB e LBA de cavalos clinicamente sadios, encontraram diferenças significativas na contagem de macrófagos (81,52% e 54,78%) e linfócitos (2,91% e 33,70%), respectivamente. Para os demais tipos celulares, neutrófilos (8,92% e 9,76%), eosinófilos (0,76% e 0,98%) e mastócitos (0,15% e 0,78%), as contagens entre os LTB e LBA foram semelhantes e em pequenas quantidades. Os autores relatam que somente no LTB foram encontradas células epiteliais cilíndricas (5,51%) e células produtoras de muco (0,23%), corroborando com Mansmann e Knight (1972).

Gonçalves e colaboradores (2004) avaliando a técnica de lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal e caracterizando a população celular em bezerros clinicamente sadios, observaram que a celularidade do lavado traqueobrônquico revelou pequena variação no número total de células, atingindo um máximo de 185.000 células por mililitro, sendo a média encontrada de $133.750 \pm 51.496,36$; e na contagem diferencial, o LTB caracterizou-se por alta porcentagem de macrófagos (77,2%), seguida por células epiteliais cilíndricas (14,9%), neutrófilos (6,0%) e linfócitos (1,8%), e ausência de eosinófilos.

A técnica do lavado traqueobrônquico em ovinos é eficaz na obtenção de células. Burrels e Williams (1987) detectaram predomínio de macrófagos, seguido por linfócitos e eosinófilos em lavados broncoalveolares por endoscopia e em lavado total de pulmão de ovinos abatidos. Marcondes e colaboradores (2011) afirmaram que em ovinos sadios, à semelhança dos bovinos, há predomínio de macrófagos, seguido por células epiteliais cilíndricas, neutrófilos e linfócitos. Já nos animais portadores de broncopneumonia, observou redução de macrófagos e tendência ao aumento de neutrófilos.

Objetivos

3. Objetivos

Em ovinos clinicamente sadios e portadores de broncopneumonia:

- Determinar a gravidade da broncopneumonia pela associação dos sinais clínicos à citologia traqueobrônquica;
- Aferir, pelas provas de redução do Tetrazólio Nitroazul, a porcentagem de neutrófilos ativados no sangue periférico e no lavado traqueobrônquico;
- Correlacionar a concentração de neutrófilos ativados no sangue e no recuperado no lavado traqueobrônquico;
- Comparar os resultados dos testes de redução do Tetrazólio Nitroazul com a gravidade da broncopneumonia;
- Comparar os dados dos ovinos sadios com os portadores de broncopneumonia moderada e grave;
- Estudar a relação da severidade da broncopneumonia à intensidade da resposta inflamatória e alterações da celularidade do lavado traqueobrônquico e sistêmica.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Seleção dos Animais

Foram utilizados 50 ovinos independentes de raça, sexo e estação do ano, com idade de até um ano, selecionados aleatoriamente em propriedades rurais e, animais que foram atendidos pelo Serviço de Clínica Médica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP, do município de Botucatu, São Paulo – Brasil.

Somente compuseram os grupos experimentais os animais que apresentaram ao hemograma as variáveis: número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e do Volume Globular (VG) dentro dos padrões de referência segundo Pugh (2005) para espécie.

4.2. Exame clínico e Grupos experimentais

Todos os animais foram submetidos ao exame clínico imediatamente antes do início das colheitas das amostras para o estudo, utilizando-se protocolo adotado por Viana (2003) e critério clínico de Gonçalves (2004) e os resultados anotados em fichas individuais (Anexo 1). Os valores de referência, segundo Feitosa (2008), dos parâmetros físicos foram de 90 a 115bpm para a

frequência cardíaca, de 36 a 48mpm para a frequência respiratória e variação de temperatura corpórea entre 38,5 e 40°C.

Dentre os sinais clínicos utilizados como critério para a seleção dos animais portadores de broncopneumonia e diferenciação da intensidade da doença, estavam as manifestações de: depressão, secreção nasal mucopurulenta ou purulenta, tosse produtiva, reflexo da tosse positivo, hipertermia, taquicardia, taquipneia, dispneia com ou sem ruído expiratório aumentado, sons respiratórios rudes ou anormais à auscultação pulmonar e crepitações fina e/ou grossa. Quanto maior o número de sinais associados, maior a gravidade da doença. Ainda para auxiliar na classificação da doença, lançou-se mão da interpretação do hemograma e da celularidade do lavado traqueobrônquico.

Foram considerados animais sadios, portanto, aptos a compor o grupo controle, os que ao exame físico não manifestaram qualquer alteração clínica e apresentaram variáveis hematológicas dentro dos valores considerados de referência para a espécie (WEISS & WARDROP, 2010).

Desta maneira, os animais foram subdivididos em três grupos experimentais:

- G1: 19 animais clinicamente sadios;
- G2: 21 animais portadores de broncopneumonia moderada;
- G3: 10 animais portadores de broncopneumonia grave.

4.3. Colheita das amostras de sangue

A colheita das amostras de sangue foi realizada imediatamente após o exame clínico, mediante assepsia local com álcool iodado. Utilizando-se o sistema de colheita a vácuo com agulha 25 x 8; foram colhidos aproximadamente 8mL de sangue por venopunção da jugular:

- 5mL de sangue venoso em tubo de plástico contendo ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) para a avaliação hematológica;
- 3mL de sangue venoso em tubo de plástico contendo 60 unidades de heparina sódica, para a realização dos testes de redução do NBT.

As amostras dos tubos com EDTA foram transportadas em temperatura ambiente e as dos tubos de heparina, sob refrigeração em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, até o laboratório, para serem processadas.

4.4. Colheita do Lavado Traqueobrônquico

O procedimento de lavagem traqueobrônquica seguiu o padrão descrito por Marcondes e colaboradores (2011), realizado através da sondagem nasotraqueal. Para isso, os animais foram submetidos somente à contenção física, em estação.

Após a antissepsia da área externa das narinas com álcool iodado, uma sonda guia siliconizada com 65cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro teve sua extremidade lubrificada com Lidocaína gel para reduzir o desconforto do animal e então introduzida pelo vestíbulo nasal e meato nasal médio até a orofaringe, onde sofreu uma rotação de 180° direcionando sua extremidade dorsalmente; ao tocar a epiglote, a sonda foi automaticamente direcionada para a laringe e traqueia. A presença da sonda no trato respiratório foi confirmada pelos sinais clínicos como: desconforto, meneios de cabeça, saída de ar pela extremidade da sonda guia e tosse. Durante a inspiração seguinte, para facilitar a entrada na traqueia e reduzir a resistência sofrida pelo ar, a sonda foi progredida até a região da Carina. A sonda guia foi fixada manualmente e foi introduzida uma sonda de polietileno, com 85cm de comprimento e 0,3cm de diâmetro, acoplada a uma agulha 40X16 sem bisel. Com uma seringa estéril de capacidade de 60mL, acoplada à sonda de polietileno, foram infundidos de 25 a 40mL de solução salina isotônica comercial estéril e apirogênica e imediatamente aspirados. As aspirações foram realizadas de forma progressiva e repetidamente à medida que a sonda foi retirada.



FIGURA 1. Materiais utilizados para coleta à campo: algodão com álcool iodado; caneta; lidocaína gel; luvas de procedimento; seringa de 60mL; solução fisiológica (NaCl 0,9%); sonda guia (silicone); sonda para coleta (polietileno); tubos contendo heparina e EDTA; e tubos de polipropileno tipo Falcon com capacidade de 15 e 50mL.



FIGURA 2. Contenção física e posicionamento do animal com a cabeça e pescoço estendidos.



FIGURA 3. Introdução da sonda de silicone (sonda guia) pela narina, nasofaringe e traqueia do animal.



FIGURA 4. Passagem da sonda de polietileno (sonda de coleta) por dentro da sonda guia até a região traqueobrônquica do animal.



FIGURA 5. Infusão de solução fisiológica estéril e apirrogênica para a obtenção do lavado traqueobrônquico.



FIGURA 6. Obtenção da amostra traqueobrônquica através de aspirações sequenciadas e repetidas.

Após a obtenção da amostra, tracionou-se a sonda de polietileno para que permanecesse totalmente dentro da sonda guia e o conjunto foi completamente removido.

O líquido do lavado traqueobrônquico obtido foi acondicionado em tubo de ensaio de polietileno, com capacidade de 15 ou 50mL, devidamente identificado e armazenado em caixa isotérmica com gelo por no máximo duas horas até o seu processamento.

4.5 Local e processamento das amostras

4.5.1 Avaliação hematológica

As avaliações hematológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, campus de Botucatu, SP.

As amostras foram submetidas ao hemograma completo, proteína total (PT) e fibrinogênio (FB) plasmáticos de acordo com métodos convencionais do Laboratório (FELDMAN et al, 2000): contagem total de leucócitos e hemácias em contador automático¹; dosagem da hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina; mensuração da PT plasmática e do FB por refratometria²; e o Volume globular pelo método do microhematócrito³.

4.5.2 Determinação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos sanguíneos

Para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos foram empregados os testes de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) estimulado (NBT-E) e o não estimulado (NBT-NE) no máximo duas horas após a colheita, pelo método citoquímico descrito por Park e Good (1970), utilizando-se reativo comercial (NBT vial, catalog No. 840-10, Sigma Diagnostic, St. Louis, USA).

Para tal, foram transferidas a tubos eppendorff com capacidade de 0,5mL, partes iguais de sangue e da solução de NBT, sendo 25µL para o teste não estimulado (NBT-NE) e, para o teste estimulado (NBT-E) 25µL acrescidos de 2,5µL de estimulante (extrato bacteriano inativado). Após homogeneização

¹ HEMASCREEN - Ebran

² Refratômetro RTP-20ATC

³ Centimicro

por pipetagem, da amostra e reagentes, os frascos foram incubados por dez minutos a 37°C em banho-maria e à temperatura ambiente por outros dez minutos. Imediatamente após, os esfregaços eram confeccionados e corados com Panótico rápido. Para a leitura, foram contados 100 neutrófilos por amostra, em microscópio com aumento de 1000X para ambos os testes, discriminando-se o percentual de células NBT positivas e negativas, conforme a apresentação ou não de formazan intracitoplasmático (NBT reduzido).

4.5.3 Avaliação do líquido do lavado traqueobrônquico (LTB)

O líquido do lavado traqueobrônquico foi processado no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, campus de Botucatu, e a realização dos estudos citológicos consistiu de:

- Concentração do lavado e fixação do volume

O lavado traqueobrônquico foi centrifugado em tubos de polipropileno tipo Falcon de 14mL, a 3500 rpm, por 6 minutos a 5°C. O sobrenadante foi desprezado até que permanecessem no tubo apenas 0,5mL, composto principalmente pelo *pellet* celular, ressuspendido em volume fixo de 2mL de solução salina isotônica comercial estéril e apirogênica. Esse procedimento foi adotado em todas as amostras, independente do grupo experimental, para que os resultados não sofressem interferência de processamento.

- Citocentrifugação

A impressão celular de 6mm de diâmetro em lâminas histológicas de vidro com extremidade fosca foi obtida por meio de citocentrifugação⁴ de 200µL do lavado traqueobrônquico a 89xG por cinco minutos.

- Fixação e coloração do material nas lâminas

Imediatamente após a citocentrifugação, as lâminas foram fixadas e coradas pelos métodos de Shorr e Panótico rápido, para identificação e contagem celular (KOSS, 1992).

⁴ Modelo 2000D - Revan

- Contagem total de células

A contagem do número total celular foi realizada em câmara de Neubauer, sem a utilização de corantes. Para isso, o lavado traqueobrônquico acondicionado em tubo de ensaio de polipropileno foi homogeneizado em agitador de tubos, por 10 segundos e a câmara preenchida em seguida.

Foram utilizados todos 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) e esse valor encontrado, multiplicado por 10^3 para obtenção do valor em células/mL.

- Contagem diferencial das células

Foram analisados, para cada animal, número e porcentagem de células epiteliais ciliadas, células epiteliais cilíndricas, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em um total de 200 células contadas em microscópio óptico comum, em aumento de 400 vezes. Nas lâminas que apresentaram muitos aglomerados celulares, a contagem diferencial foi feita na sua periferia.

4.5.4 Determinação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos do LTB

Para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos do LTB foram empregados os testes de redução do NBT estimulado (NBT-E) e o não estimulado (NBT-NE), à semelhança dos testes sanguíneos, no máximo duas horas após a colheita, pelo método citoquímico descrito por Park & Good (1970), utilizando-se reativo comercial (NBT vial, catalog No. 840-10, Sigma Diagnostic, St. Louis, USA).

Foram transferidas a tubos tipo eppendorff partes iguais do lavado traqueobrônquico e da solução de NBT, sendo 50µL para o teste não estimulado (NBT-NE) e, para o teste estimulado (NBT-E) 50µL acrescidos de 5,0µL de estimulante (extrato bacteriano inativado). Após homogeneização da amostra e reagentes, por pipetagem, os frascos foram incubados por dez minutos a 37°C em banho-maria e à temperatura ambiente por outros dez minutos. Os esfregaços foram confeccionados imediatamente após por meio de citocentrifugação a 89xG por cinco minutos.

As lâminas foram coradas com Panótico rápido e 100 neutrófilos contados para cada amostra em microscópio com aumento de 1000X para ambos os testes, discriminando-se o percentual de células NBT positivas e negativas, conforme a apresentação ou não de formazan intracitoplasmático (NBT reduzido).



FIGURA 7. Stimulant (catálogo n°. 84015) e Nitroblue Tetrazolium 1mg (catálogo n°. 840-10), fabricante: Sigma-Aldrich®; microtubos plásticos com capacidade de 500 μ L, sem e com papel alumínio envolto.



FIGURA 8. Materiais para processamento laboratorial, armazenamento e realização dos testes NBT: caixa de papelão; caixa porta-lâmina; câmara de Neubauer; caneta; contador de células; estimulante; flutuador; lâmina extensora, lâminas foscas; micropipetas; microtubos plásticos; relógio;

suportes; Tetrazólio Nitroazul; tubos contendo EDTA; tubos de polipropileno tipo Falcon de 15 e 50mL.

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram executadas utilizando-se o pacote *IBM/SPSS Statistics v.20.0*, assumindo o nível de significância de 5%.

A análise exploratória dos dados está expressa em medidas de tendência central (média e mediana), de dispersão (desvio padrão) e amplitude (máximo e mínimo) para as variáveis contínuas; para as variáveis categóricas, está expressa na forma de contagens e frequências simples.

As comparações entre grupos, para as variáveis contínuas, em função da distribuição não-normal dos resultados foi realizada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, visto que sempre foi feita aos pares, fixando o grupo de animais sadios como referência. Já para as variáveis categóricas, os testes executados foram o quiquadrado (quando os valores observados nas caselas excediam os valores esperados) ou o Exato de Fisher (quando a condição anterior não era verificada).

Quando foi verificada a correlação entre variáveis contínuas, ainda pela natureza não-normal da distribuição dos resultados, aplicou-se o teste Rô de Spearman.

Resultados

5. Resultados

Os três grupos (G1, G2 e G3) foram compostos de ovinos com idade máxima de um ano e distribuição aleatória de machos e fêmeas, provenientes de propriedades rurais na região de Botucatu ou atendimentos ambulatoriais realizados pelo Setor de Clínica de Grandes Animais da FMVZ – UNESP ou de posse do Setor da Ovinocultura da FMVZ – UNESP.

Ao exame clínico, no grupo de animais sadios (G1), as médias da temperatura retal (°C), frequência respiratória (mpm) e frequência cardíaca (bpm) apresentaram-se todas dentro dos valores de referência para a espécie, sendo seus valores respectivamente de $39,2 \pm 0,42$, $36,2 \pm 9,93$ e $74,3 \pm 12,81$ (Tabela 1). Individualmente, a única dessas variáveis que se apresentou acima dos valores considerados normais foi a frequência respiratória (FR), observada em 15,79% (3/19) dos animais do grupo G1 (Tabela 2), atingindo valor máximo de 60mpm (Tabela 1).

No grupo dos animais com broncopneumonia grau moderado (G2), os valores médios de temperatura, FR e frequência cardíaca (FC) foram de $39,5 \pm 0,81$, $46,0 \pm 10,70$ e $99,6 \pm 17,93$, também todos dentro dos parâmetros de normalidade (Tabela 1), sendo a porcentagem dos animais que apresentaram valores acima dos parâmetros de aproximadamente 28,6% (6/21) para a FC (Tabela 2) com valor máximo de 140bpm e 19% (4/21) para as FR e temperatura corpórea (Tabela 2), sendo seus valores máximos respectivamente de 72mpm e 41°C (Tabela1).

O grupo G3, composto pelos animais com broncopneumonia grave, apresentou os seguintes valores médios dentro dos considerados normais: $39,7 \pm 1,05^{\circ}\text{C}$ de temperatura e $92,8 \pm 27,83\text{bpm}$ da FC. Já a média da FR, de $52,4 \pm 19,17\text{mpm}$, apresentou-se acima dos valores de referência (Tabela 1). Dos 10 animais que compunham o grupo, 10% apresentaram a FC, 50% a FR e 20% a temperatura corpórea acima do normal (Tabela 2), sendo os valores máximos respectivamente de: 144bpm, 80mpm e 42°C (Tabela 1).

TABELA 1: Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), frequência respiratória (mpm) e frequência cardíaca (bpm) de ovinos sadios (G1), portadores de broncopneumonia grau moderado (G2) e grau severo (G3) da região de Botucatu/SP.

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=19)</i>	<i>G2 (n=21)</i>	<i>G3 (n=10)</i>
<i>Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)</i>			
<i>Média $\pm$ sd¹</i>	39,2 $\pm$ 0,42	39,5 $\pm$ 0,81	39,7 $\pm$ 1,06
<i>Mediana</i>	39,0	40,0	40
<i>Máximo</i>	40	41	42
<i>Mínimo</i>	39	38	38
<i>Frequência Respiratória (mpm)</i>			
<i>Média $\pm$ sd</i>	36,2 $\pm$ 9,93	46,0 $\pm$ 10,70*	52,4 $\pm$ 19,18*
<i>Mediana</i>	32	44	50
<i>Máximo</i>	60	72	80
<i>Mínimo</i>	24	32	24
<i>Frequência Cardíaca (bpm)</i>			
<i>Média $\pm$ sd</i>	74,3 $\pm$ 12,81	99,6 $\pm$ 17,93*	92,8 $\pm$ 27,83*
<i>Mediana</i>	72	96	92
<i>Máximo</i>	100	140	144
<i>Mínimo</i>	52	64	52

*Significativo ao Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo dos animais sadios.

¹Sd: desvio padrão

Quando comparadas as variáveis FC, FR e temperatura corpórea dos animais do G1 com os do G2 foram possíveis observar diferenças estatísticas na FC ($p=0,000$) e na FR ($p=0,002$) e entre o G1 e o G3, na FC ($p=0,041$) e na FR ($p=0,012$), significativamente maiores nos grupos dos animais portadores

de broncopneumonia. Comparando-se as mesmas variáveis entre os animais doentes, G2 e G3, não houve diferença estatística (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta os percentuais referentes a cada manifestação clínica dos diferentes grupos experimentais. Nela, podemos observar que em nenhum dos animais sadios (G1) foram encontrados sinais clínicos característicos de doença respiratória, porém 21,1% (4/19) deles apresentaram reflexo de tosse positivo sem secreção e 15,8% (3/19) apresentaram aumento da frequência respiratória e secreção nasal serosa.

TABELA 2: Frequências de observação e percentuais dos sinais clínicos de ovinos sadios (G1), portadores de broncopneumonia grau moderado (G2) e grau severo (G3) da região de Botucatu/SP.

Sinal Clínico	G1 (n=19)		G2 (n=21)		G3 (n=10)	
	N	%	N	%	N	%
<i>Frequência Cardíaca aumentada</i>	0	0,0	6	28,6 ^a	1	10,0
<i>Frequência Respiratória aumentada</i>	3	15,8	4	19,0	5	50,0
<i>Hipertermia</i>	0	0,0	4	19,0	2	20,0
<i>Aumento do linfonodo submandibular</i>	0	0,0	3	14,3	1	10,0
<i>Secreção nasal presente</i>	3	15,8	17	81,0 ^a	10	100,0 ^a
<i>Serosa</i>	3	15,8	3	14,3	2	20,0
<i>Mucopurulenta</i>	0	0,0	14	66,7 ^a	5	50,0 ^a
<i>Purulenta</i>	0	0,0	2	9,5	3	30,0 ^a
<i>Dispneia</i>	0	0,0	20	95,2 ^a	10	100,0 ^a
<i>Reflexo de Tosse positivo</i>	4	21,1	14	66,7 ^a	7	70,0 ^a
<i>Tosse seca</i>	4	21,1	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a
<i>Tosse produtiva</i>	0	0,0	14	66,7 ^a	7	70,0 ^a
<i>Ruído laringotraqueal aumentado</i>	0	0,0	4	19,0 ^a	4	40,0 ^a
<i>Frêmito torácico</i>	0	0,0	0	0,0	1	10,0
<i>Propagação do ruído cardíaco</i>	0	0,0	9	42,9 ^a	5	50,0 ^a
<i>Crepitação fina</i>	0	0,0	14	66,7 ^a	6	60,0 ^a
<i>Crepitação grossa</i>	0	0,0	7	33,3 ^a	8	80,0 ^{ab}
<i>Roncos e Sibilos</i>	0	0,0	0	0,0	1	10,0
<i>Ruído traqueobrônquico aumentado</i>	0	0,0	4	19,0	7	70,0 ^{ab}
<i>Ruído broncobronquiolar aumentado</i>	0	0,0	4	19,0	5	50,0 ^a

^a Diferença significativa ao Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo dos animais sadios.

^b Diferença significativa ao Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo dos animais portadores de broncopneumonia moderada.

Já os animais do G2, apresentaram como sinais clínicos mais frequentes: dispneia em 95,2% (20/21), presença de secreção nasal em 81% dos animais (17/21) sendo mucopurulenta em 66,7% (14/21), serosa em 14,3% (3/21) e purulenta em 9,5% (2/21), reflexo de tosse positivo com tosse produtiva e crepitação fina estavam presentes em 66,7% (14/21). Como sinais intermediários, o G2 apresentou: propagação do ruído cardíaco em 42,9% (9/21), crepitação grossa em 33,3% (7/21) e frequência cardíaca aumentada em 28,6% (6/21). Em menores porcentagens estavam a taquipneia, a hipertermia e os ruídos laringotraqueal, traqueobrônquico e broncobronquiolar aumentados, em 19% dos animais (4/21) e 14% (3/21) apresentou aumento dos linfonodos submandibulares (Tabela 2).

Todos os animais do G3 apresentaram dispneia e secreção nasal, sendo 50% (5/10) mucopurulenta, 30% (3/10) purulenta e 20% (2/10) serosa. Ainda ocorreram em maiores frequências: crepitação grossa em 80% (8/10) dos animais, em 70% (7/10), reflexo de tosse positivo com tosse produtiva e aumento do ruído traqueobrônquico e em 60% (6/10) a crepitação fina. Com porcentagens intermediárias estavam a frequência respiratória aumentada, propagação do ruído cardíaco e ruído broncobronquiolar aumentado em 50% (5/10) e o aumento do ruído laringotraqueal em 40% (4/10). Menos frequentes estavam hipertermia em 20% (2/10) e em 10% (1/10) a frequência cardíaca aumentada, aumento dos linfonodos submandibular, presença de frêmito torácico e roncos e sibilos (Tabela 2).

As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) das manifestações clínicas entre animais doentes e sadios foram: aumento dos linfonodos submandibulares, propagação do ruído cardíaco e crepitações fina e grossa. Entre o G1 e G2: aumento da frequência cardíaca, dispneia e aumento do ruído laringotraqueal. Entre o G1 e G3: tosse produtiva e aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar aumentado. Comparando-se os grupos de animais doentes, G2 e G3, os sinais clínicos que se apresentaram estatisticamente diferentes foram: aumento do ruído traqueobrônquico e crepitação grossa (Tabela 2).

Nas Tabelas 3 e 4 estão esquematizadas as manifestações clínicas individuais de ambos os grupos de animais doentes.

TABELA 3. Ocorrência dos sinais clínicos em cada um dos ovinos portadores de broncopneumonia moderada do G2 (n=21) da região de Botucatu/SP.

Sinais Clínicos	Animais portadores de broncopneumonia moderada																					Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Tosse produtiva	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	14
Secreção nasal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	19
Dispneia	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20
Reflexo de tosse positivo	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	14
Ruído laringotraqueal ↑	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	13
Ruído traqueobrônquico ↑	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	4
Ruído broncobreonquiolar ↑	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	4
Frêmito torácico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Propagação do ruído cardíaco	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	9
Crepitação grossa	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	7
Crepitação fina	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	14
Roncos/Sibilos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Hipertermia	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Taquipneia	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4
Taquicardia	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	6

+ sinal clínico presente

- sinal clínico ausente

TABELA 4. Ocorrência dos sinais clínicos em cada um dos ovinos portadores de broncopneumonia grave do G3 (n=10) da região de Botucatu/SP.

<i>Sinais Clínicos</i>	<i>Animais portadores de broncopneumonia grave</i>										<i>Total</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Tosse produtiva</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	7
<i>Secreção nasal</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>Dispneia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>Reflexo de tosse positivo</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	7
<i>Ruído laringotraqueal ↑</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	6
<i>Ruído traqueobrônquico ↑</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	7
<i>Ruído broncobreonquiolar ↑</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	5
<i>Frêmito torácico</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Propagação do ruído cardíaco</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	5
<i>Crepitação grossa</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	8
<i>Crepitação fina</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	6
<i>Roncos/Sibilos</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hipertermia</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	2
<i>Taquipneia</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	5
<i>Taquicardia</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1

+ sinal clínico presente

- sinal clínico ausente

Os componentes do hemograma: contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular e plaquetas serviram como critérios de seleção dos animais para o experimento e não foram submetidos a testes estatísticos.

Na comparação dos leucogramas entre os grupos, houve diferença significativa entre G1 e G2 ($p=0,007$) e entre G1 e G3 ($p=0,025$) somente para o número de neutrófilos segmentados, porém foi possível observar tendência de aumento da contagem total de leucócitos (leucocitose) proporcional à gravidade da doença. As médias dos demais tipos celulares: eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos, foram bastante semelhantes entre os três grupos (Tabela 5).

Os valores do fibrinogênio dos diferentes grupos não apresentaram diferenças estatísticas, porém nota-se aumento gradativo com o surgimento e severidade da doença. O valor mínimo encontrado foi de 100mg/dL no G1, atingindo o máximo de 1000mg/dL no G3 (Tabela 5).

Os animais submetidos à sondagem nasotraqueal que demonstraram resistência ao procedimento, meneios de cabeça, desconforto à passagem da sonda mesmo lubrificada com lidocaína gel, saltos e tentativas de coices tiveram como complicações decorrentes do procedimento o sangramento nasal e a recuperação de volume insuficiente de amostras traqueobrônquicas para processamento, o que levou ao descarte das amostras e consequente exclusão dos animais do experimento. As amostras de líquido traqueobrônquico dos animais que participaram do estudo ($n=50$) foram colhidas com sucesso e em volume suficiente.

Os resultados das análises do lavado traqueobrônquico estão representados na Tabela 6. A diferença estatística ($p<0,05$) entre o G1 e G2 ficou restrita à contagem de células nucleadas totais. Já as diferenças estatísticas manifestadas entre o G3 e o G1, foram a contagem de células nucleadas totais e as porcentagens de células epiteliais cilíndricas, macrófagos e neutrófilos, bem como quando comparadas ao G2. Ainda entre o G3 e G2 houve diferença na porcentagem de eosinófilos (Tabela 6).

TABELA 5: Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis do leucograma no sangue periférico e fibrinogênio de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.

Variáveis	G1 (n=19)	G2 (n=21)	G3 (n=10)
Fibrinogênio (mg/dL)			
<i>Média ± sd¹</i>	336,84 ± 153,52	409,52 ± 194,69	520,00 ± 269,98
<i>Mediana</i>	400	400	400
<i>Máximo</i>	600	800	1000
<i>Mínimo</i>	100	200	200
Leucócitos totais/μl			
<i>Média ± sd</i>	9105,26 ± 2289,22	9410,24 ± 3625,73	10520,00 ± 3229,31
<i>Mediana</i>	8800	9088	10350
<i>Máximo</i>	12400	18700	15300
<i>Mínimo</i>	4600	5100	6400
Segmentados/μl			
<i>Média ± sd</i>	2526,74 ± 1103,22	4002,14 ± 2156,83*	4617,80 ± 3349,80*
<i>Mediana</i>	2376	3720	3874,5
<i>Máximo</i>	5390	10659	12992
<i>Mínimo</i>	1334	1530	1926
Eosinófilos/μl			
<i>Média ± sd</i>	341,80 ± 446,17	185,10 ± 224,48	212,00 ± 355,38
<i>Mediana</i>	116	136	100,5
<i>Máximo</i>	1776	935	1177
<i>Mínimo</i>	0	0	0
Linfócitos/μl			
<i>Média ± sd</i>	5773,84 ± 1776,06	4791,81 ± 2017,53	5272,00 ± 2955,72
<i>Mediana</i>	5544	4858	4748,5
<i>Máximo</i>	9394	8442	10863
<i>Mínimo</i>	2852	1560	1314
Monócitos/μl			
<i>Média ± sd</i>	450,16 ± 276,81	422,62 ± 254,63	403,60 ± 251,48
<i>Mediana</i>	414	374	356,5
<i>Máximo</i>	1023	973	792
<i>Mínimo</i>	0	0	0
Basófilos/μl			
<i>Média ± sd</i>	12,74 ± 31,04	8,43 ± 26,23	14,60 ± 46,17
<i>Mediana</i>	0	0	0
<i>Máximo</i>	98	107	146
<i>Mínimo</i>	0	0	0

*Significativo ao Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo dos animais sadios.

¹Sd: desvio padrão

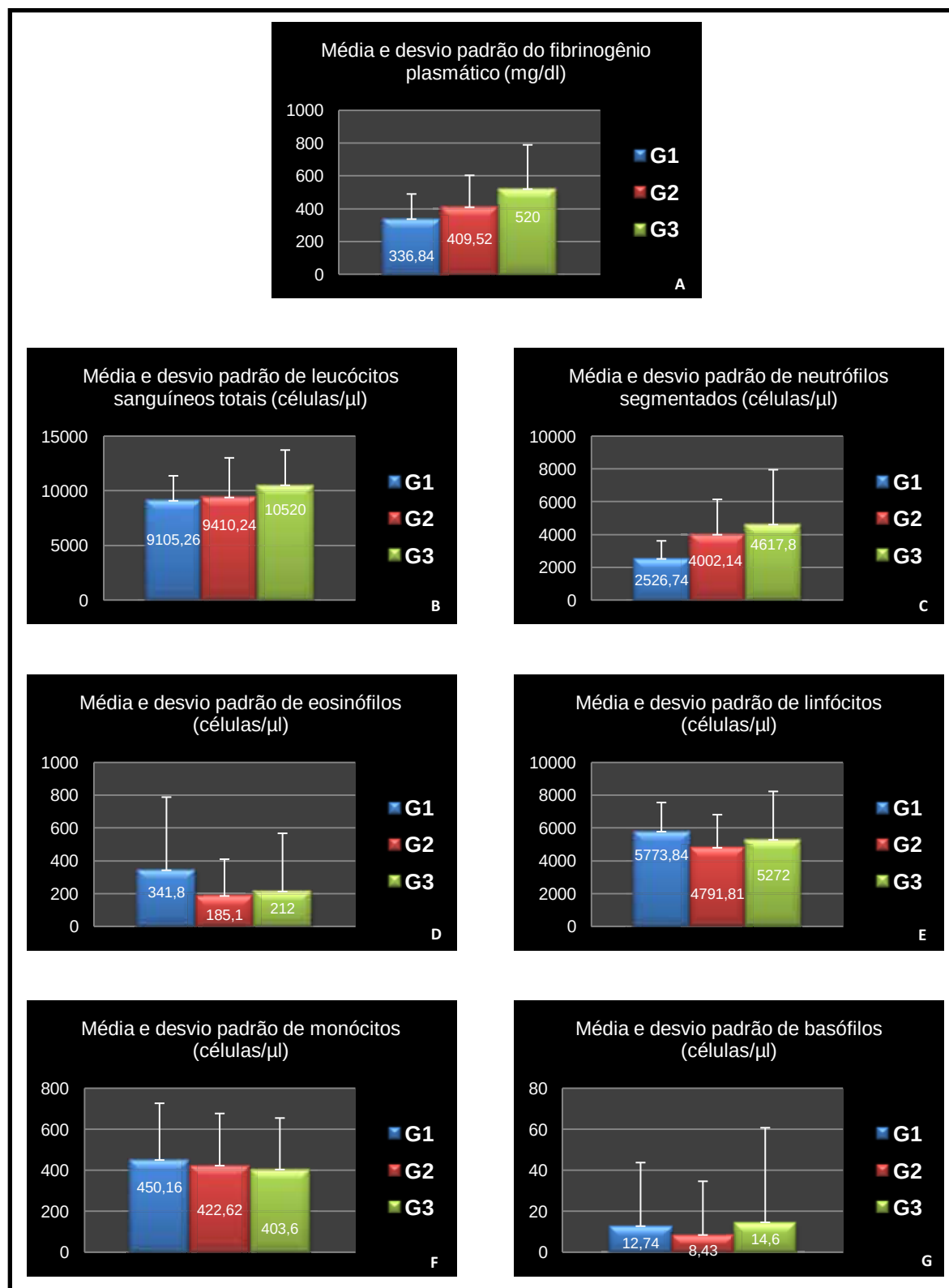


FIGURA 9. Médias e desvios-padrão das variáveis do fibrinogênio plasmático e leucograma dos ovinos dos grupos: G1, animais saudáveis; G2, animais portadores de broncopneumonia moderada; e G3, animais portadores de broncopneumonia grave. A: Fibrinogênio plasmático; B: Contagem total de leucócitos; C: Neutrófilos segmentados; D: Eosinófilos; E: Linfócitos; F: Monócitos; G: Basófilos.

TABELA 6: Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=19)</i>	<i>G2 (n=21)</i>	<i>G3 (n=10)</i>
Contagem de células nucleadas totais (céls x10³/mL)			
<i>Média ± sd¹</i>	62,47 ± 47,70	97,08 ± 61,02 ^a	302,39 ± 267,12 ^{ab}
<i>Mediana</i>	49,5	77	160,05
<i>Máximo</i>	212,3	246,4	804,1
<i>Mínimo</i>	13,2	6,6	49,5
Células epiteliais ciliadas (%)			
<i>Média ± sd</i>	0,11 ± 0,26	0,14 ± 0,32	0,1 ± 0,32
<i>Mediana</i>	0	0	0
<i>Máximo</i>	1	1	1
<i>Mínimo</i>	0	0	0
Células epiteliais cilíndricas (%)			
<i>Média ± sd</i>	0,71 ± 0,90	0,33 ± 0,36	0,1 ± 0,32 ^{ab}
<i>Mediana</i>	0,5	0,5	0
<i>Máximo</i>	2,5	1	1
<i>Mínimo</i>	0	0	0
Macrófagos (%)			
<i>Média ± sd</i>	93,87 ± 5,33	93,90 ± 21,54	52,6 ± 35,33 ^{ab}
<i>Mediana</i>	98	99	45,5
<i>Máximo</i>	100	100	98
<i>Mínimo</i>	75,5	0	3
Neutrófilos (%)			
<i>Média ± sd</i>	0,63 ± 0,74	5,11 ± 20,61	38,9 ± 37,96 ^{ab}
<i>Mediana</i>	0,5	0,5	34,5
<i>Máximo</i>	3	95	97
<i>Mínimo</i>	0	0	0,5
Linfócitos (%)			
<i>Média ± sd</i>	1,66 ± 5,33	0,5 ± 1,36	7,55 ± 14,97
<i>Mediana</i>	0	0	0
<i>Máximo</i>	23,5	5	44
<i>Mínimo</i>	0	0	0
Eosinófilos			
<i>Média ± sd</i>	0,03 ± 0,11	0 ± 0	0,55 ± 1,57 ^b
<i>Mediana</i>	0	0	0
<i>Máximo</i>	0,5	0	5
<i>Mínimo</i>	0	0	0

^a Significativo ao Teste de Mann-Whitney (p<0,05), quando comparado ao grupo dos animais sadios.

^b Significativo ao Teste de Mann-Whitney (p<0,05), quando comparado com o grupo dos animais portadores de broncopneumonia moderada.

¹ Desvio padrão

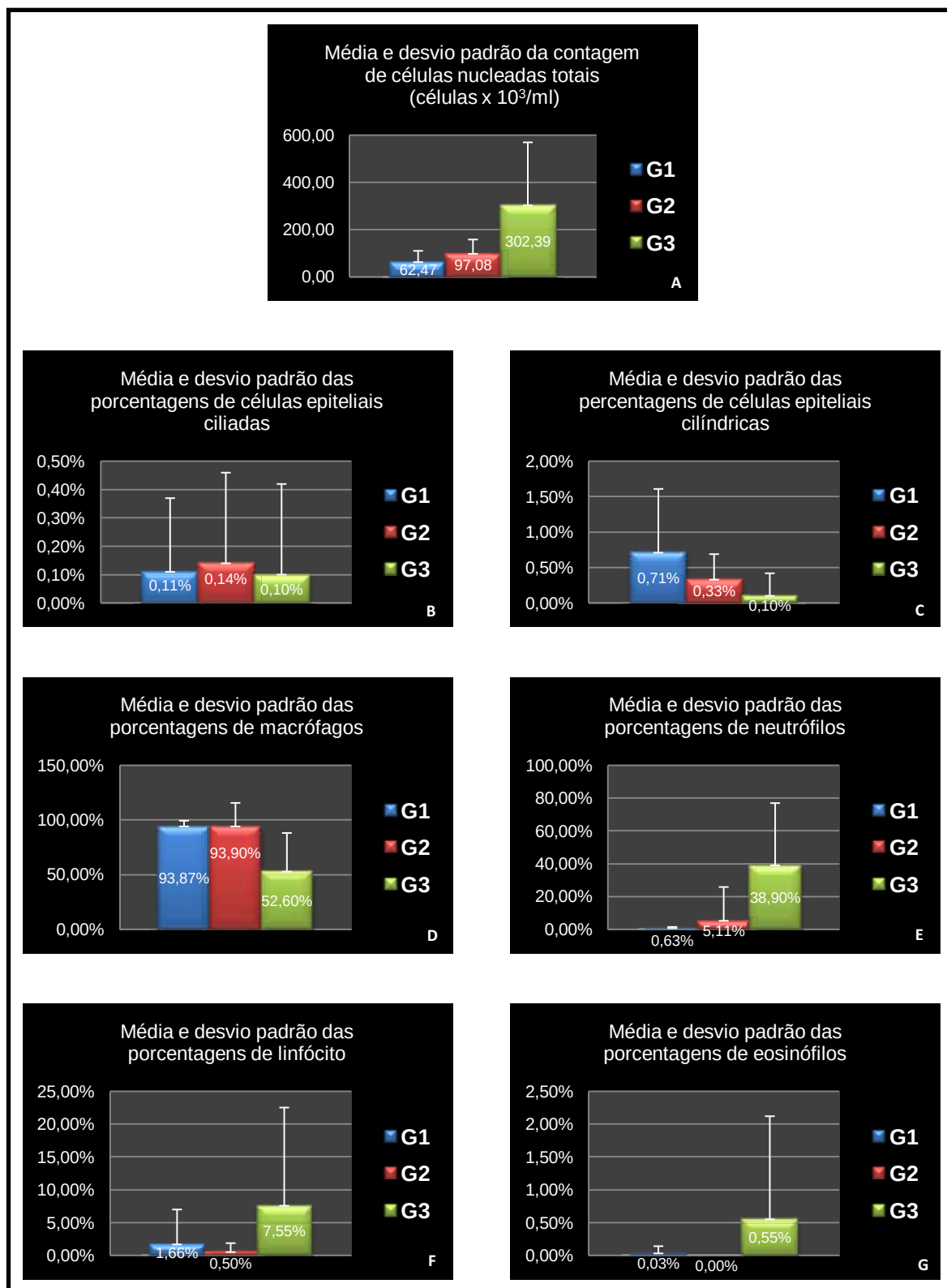


FIGURA 10. Médias e desvios-padrão das variáveis dos lavados traqueobrônquicos dos ovinos dos grupos: G1, animais saudáveis; G2, animais portadores de broncopneumonia moderada; e G3, animais portadores de broncopneumonia grave. A: Contagem de células nucleadas totais; B: Células epiteliais ciliadas; C: Células epiteliais cilíndricas; D: Macrófagos; E: Neutrófilos; F: Linfócitos; G: Eosinófilos.

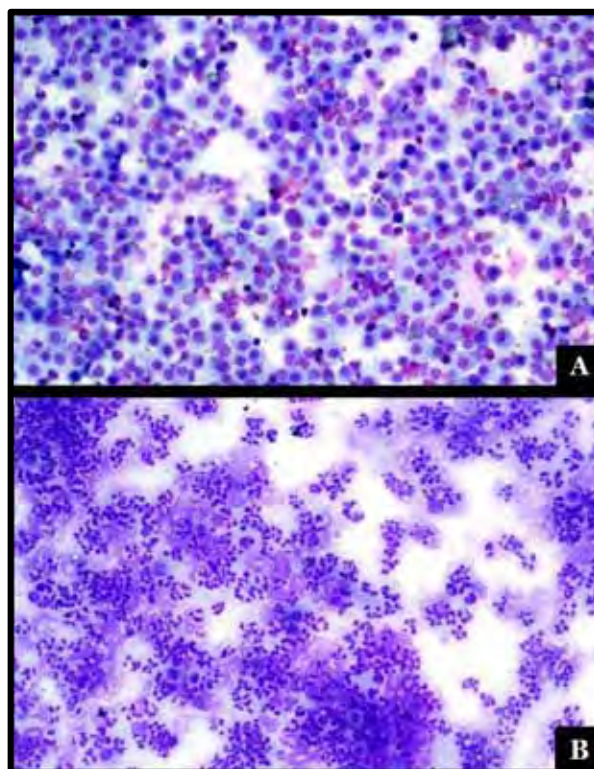


Figura 11: Avaliação citológica do lavado traqueobrônquico de ovinos. A = animal do G1 com predominância de macrófagos; B = animal do G3 com predominância de neutrófilos. Coloração: Panótico rápido. Aumento de 400x.

Os resultados dos testes com o Tetrazólio Nitroazul da atividade dos neutrófilos sanguíneos e do lavado traqueobrônquico estão dispostos na Tabela 7. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) somente quando comparado o G3 aos grupos G1 e G2, das porcentagens de neutrófilos ativos do lavado traqueobrônquico em ambos os testes, com ou sem estimulante.

A Tabela 8 apresenta as correlações entre a porcentagem de neutrófilos sanguíneos ativos e a contagem total de neutrófilos dos diferentes grupos experimentais. Apesar de nenhuma correlação mostrar-se estatisticamente significativa, nota-se tendência à variação em sentido contrário, ou seja, quanto maior a quantidade de neutrófilos circulantes, menor a quantidade dessas células ativas na corrente sanguínea.

TABELA 7: Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis dos testes de atividade de neutrófilos com Tetrazólio Nitroazul, no sangue periférico e no lavado traqueobrônquico de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=19)</i>	<i>G2 (n=21)</i>	<i>G3 (n=10)</i>
Neutrófilos sanguíneos ativos ao teste do NBT-NE (%)			
<i>Média ± sd¹</i>	12 ± 10,61	8,86 ± 8,19	9,70 ± 6,91
<i>Mediana</i>	10	6	10
<i>Máximo</i>	38	34	22
<i>Mínimo</i>	0	1	1
Neutrófilos sanguíneos ativos ao teste do NBT-E (%)			
<i>Média ± sd</i>	27,05 ± 17,49	19,76 ± 15,03	19,20 ± 12,76
<i>Mediana</i>	29	14	16
<i>Máximo</i>	55	47	42
<i>Mínimo</i>	2	2	4
Neutrófilos do LTB ativos ao teste do NBT-NE (%)			
<i>Média ± sd</i>	0 ± 0	0 ± 0	2,20 ± 1,62 ^{ab}
<i>Mediana</i>	0	0	1,5
<i>Máximo</i>	0	0	4
<i>Mínimo</i>	0	0	0
Neutrófilos do LTB ativos ao teste do NBT-E (%)			
<i>Média ± sd</i>	0 ± 0	0 ± 0	0,70 ± 0,82 ^{ab}
<i>Mediana</i>	0	0	0,5
<i>Máximo</i>	0	0	2
<i>Mínimo</i>	0	0	0

^a Significativo ao Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo dos animais sadios.

^b Significativo ao Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo dos animais portadores de broncopneumonia moderada.

¹ Desvio padrão

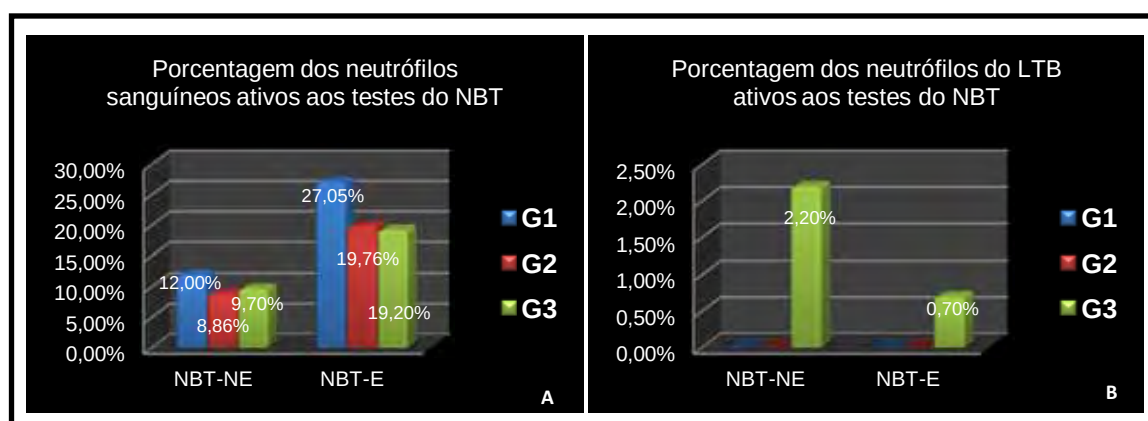


FIGURA 12. Porcentagens médias da atividade dos neutrófilos através dos testes de NBT, estimulado (NBT-E) ou não (NBT-NE), dos animais sadios (G1), portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3). A: Neutrófilos sanguíneos. B: Neutrófilos presentes no lavado traqueobrônquico

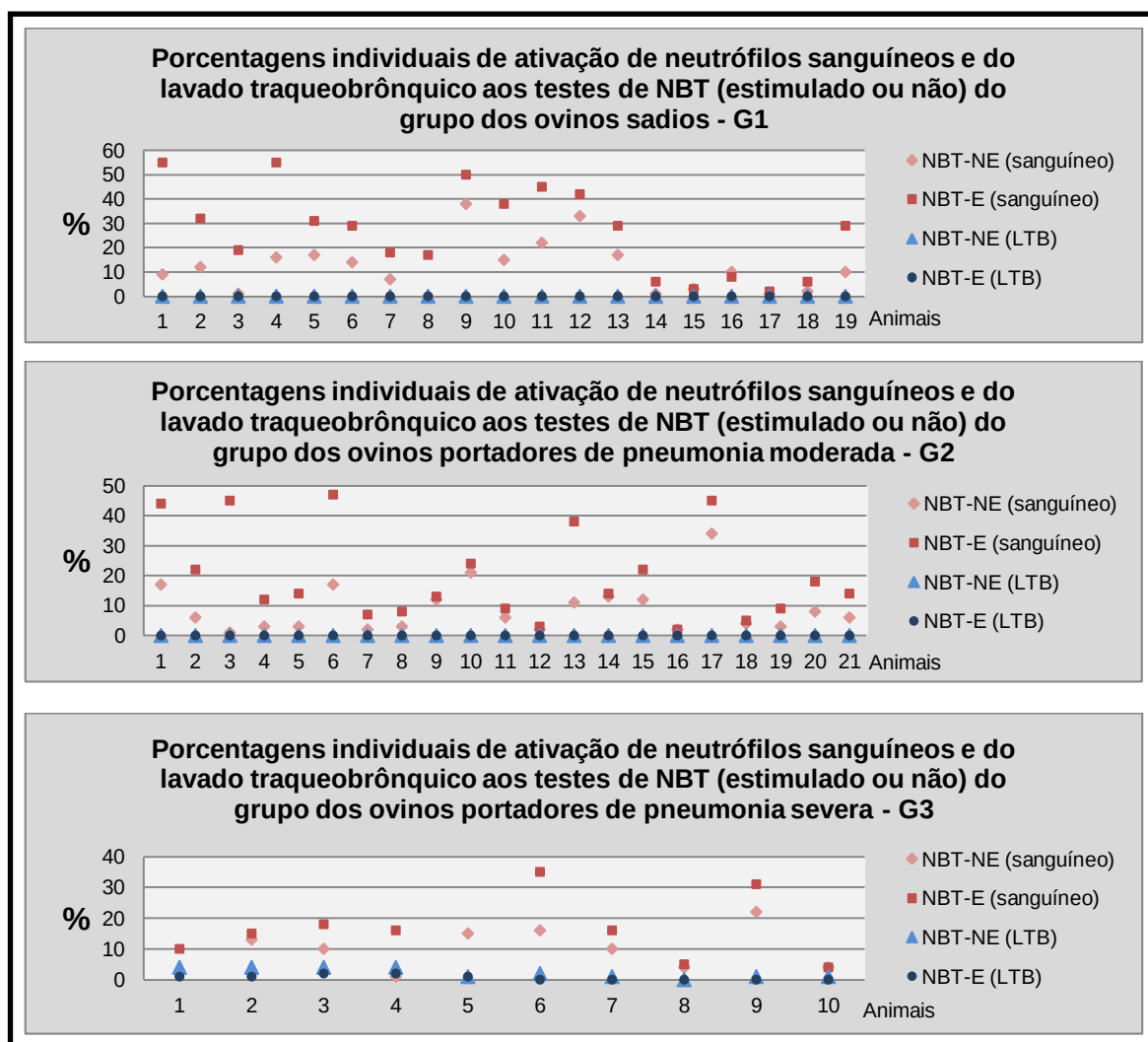


FIGURA 13. Porcentagens individuais dos neutrófilos ativos no sangue e no lavado traqueobrônquico dos ovinos (n=50) pertencentes aos três grupos experimentais (G1, G2 e G3), através dos testes com Tetrazólio Nitroazul, estimulado (NBT-E) ou não (NBT-NE).

TABELA 8. Coeficientes de correlações e valores de p, através do teste Ró de Spearman (ρ) entre as porcentagens de neutrófilos ativos e os totais de neutrófilos sanguíneos (μL) de ovinos sadios (G1) e portadores de broncopneumonia moderada (G2) e grave (G3) da região de Botucatu/SP.

GRUPOS	TOTAL DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS (μL) X NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS ATIVOS (%)	
	Coeficientes de correlações	Valores de p
G1	0,122	0,618
G2	-0,337	0,136
G3	-0,445	0,197

Discussão

6. Discussão

A broncopneumonia nos ovinos tem caráter multifatorial e os agentes, bactérias, vírus e micoplasmas, podem ou não estar associados. A combinação de condições ambientais desfavoráveis e práticas de manejo inadequadas favorecem as falhas nos mecanismos de defesa e os pulmões ficam mais susceptíveis aos patógenos (BROGDEN et al., 1998). Uma vez que os pulmões são acometidos, há intensa reação inflamatória parenquimatosa, que frequentemente se estende à pleura, brônquios e bronquíolos. As alterações locais e sistêmicas desencadeiam mudanças clínicas características de comprometimento do trato respiratório posterior que podem ser identificadas visualmente pela dispneia, tosse, anorexia, apatia e emagrecimento; à mensuração dos parâmetros, por hipertemia ou síndrome febre, taquicardia e taquipneia; e à auscultação pulmonar e traqueal, ruídos anormais e exacerbados (GONÇALVES et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002). Estas manifestações clínicas foram algumas das usadas para a diferenciação dos grupos experimentais, os demais critérios estão detalhados no Anexo 1 (ficha de avaliação individual).

Os animais considerados sadios aos exames físicos geral e específico compuseram o grupo G1, justamente por não apresentaram sinais clínicos compatíveis com doença respiratória. Entretanto, três animais deste grupo apresentaram a frequência respiratória (FR) acima do considerado, por Feitosa (2008), normal para a espécie. Este fato foi relacionado ao comportamento dos

ovinos, que são animais mais susceptíveis ao estresse pela manipulação, contenção física e separação do rebanho (BALDOCK & SIBLY, 1990; HARGREAVES & HUTSON, 1990; SILVA et al., 2010). Este comportamento de fuga pode levar ao aumento fisiológico das frequências cardíaca e respiratória (CUNNINGHAM, 1999), justificando estes dados.

Ainda assim, quando associada a outras manifestações como: secreção nasal mucopurulenta ou purulenta, dispneia e aumento dos ruídos, a elevação da FR é sugestiva de doença do trato respiratório (GONÇALVES, 2008). Dentre os animais, quatro (19%) do G2 e cinco (50%) do G3 apresentaram taquipneia, sem diferença significativa quando comparadas as médias de ambos os grupos ao G1. A observação deste sinal clínico nos grupos dos animais enfermos, em maior proporção e associada às outras manifestações de comprometimento respiratório, corrobora com a literatura que afirma que a taquipneia é um dos importantes sinais de afecções respiratórias (STÖBER, 1993, GARCIA et al., 1996; GONÇALVES, 2008).

As trocas gasosas de animais com afecções pulmonares estão prejudicadas proporcionalmente à gravidade da doença (HINCHCLIFF & BYRNE, 1991; ANDREWS, 1992; PRINGLE, 1992; RADOSTITS et al., 2002). Como mecanismo de compensação pulmonar há aumento da frequência respiratória na tentativa de manter a eficiência da hematose (GONÇALVES, 1997; RADOSTITIS et al., 2007).

O aumento da frequência cardíaca está presente em diversas alterações fisiológicas ou patológicas. A taquicardia, nas doenças do trato respiratório posterior, está diretamente relacionada à falta de tecido pulmonar funcional, o que leva ao aumento das contrações cardíacas com a finalidade de manutenção das trocas gasosas, à semelhança do que acontece com os movimentos respiratórios (CASTRO, 1926). O aumento da frequência cardíaca não foi observado em nenhum animal do G1, mas esteve presente em seis (20,6%) do G2 e apenas em um do G3. Este achado provavelmente deve-se ao fato dos animais portadores de broncopneumonia moderada ainda apresentarem-se ativos e sem prejuízo da resposta de fuga, diferentemente dos animais portadores de broncopneumonia grave, que se apresentavam apáticos, alheios e pouco responsivos à manipulação. Houve diferença estatística entre os grupos G1 e G2 (Tabela 1).

A hipertermia esteve presente em aproximadamente 20% dos animais de ambos os grupos doentes (G2 e G3), variando de 0,2 até 2°C (Tabelas 3 e 4). Apesar de não mostrarem diferenças estatísticas, os animais que manifestaram aumento da temperatura corpórea, apresentaram também taquicardia e/ou taquipneia. A associação destes achados foi relacionada à manifestação da “síndrome febre” (RADOSTITS et al., 2002; FEITOSA, 2008). A febre é uma alteração sistêmica, desencadeada durante a inflamação, em resposta à ação das citocinas e estimulada pelos lipopolissacarídeos bacterianos (ROBBINS et al., 2005). Tem a ação benéfica de estimular reações de defesa, como a mobilidade e atividades bactericida e fagocítica de leucócitos, produção de anticorpos e inibição do crescimento de alguns microorganismos (FEITOSA, 2008).

A análise dos sinais clínicos relacionados às vias aéreas posteriores e parênquima pulmonar são fundamentais para a definição do diagnóstico da broncopneumonia (BREEZE, 1985; RADOSTITS et al., 2002; MOHAMED & ABDELSALAM, 2008) e estimativa da gravidade do processo (GONÇALVES, 1997).

Os sinais clínicos específicos determinantes para a diferenciação entre animais sadios e doentes, que ocorreram de forma estatisticamente significativa no grupo de animais portadores de broncopneumonia moderada (G2) foram: dispneia (95,2% - 20/21), secreção nasal mucopurulenta (66,7% - 14/21), reflexo de tosse com tosse produtiva (66,7% - 14/21), ruído laringotraqueal aumentado (19% - 4/21), propagação do ruído cardíaco (42,9% - 9/21), crepitações fina (66,7% - 14/21) e grossa (33,3% - 7/21); e no grupo de animais portadores de broncopneumonia grave (G3) foram: dispneia (100% - 10/10), secreção nasal mucopurulenta (50% - 5/10) e purulenta (30% - 3/10), reflexo de tosse com tosse produtiva (70% - 7/10), ruído laringotraqueal aumentado (40% - 4/10), propagação do ruído cardíaco (50% - 5/10), crepitações fina (60% - 6/10) e grossa (80% - 8/10) e aumentos dos ruídos traqueobrônquico (70% - 7/10) e broncobronquiolar (50% - 5/10) (Tabela 2). Esses dados corroboram com os achados clínicos de outros autores no diagnóstico das afecções respiratórias (GONÇALVES, 1997; MARCONDES et al., 2011; GONÇALVES et al., 2011).

A dispneia foi uma manifestação indicadora da presença da doença, já que esteve presente somente nos animais portadores de broncopneumonia frequentemente associada à postura ortopneica. Com exceção de um animal do G2, todos os demais doentes (29/30) apresentaram dificuldade respiratória, acometendo 100% dos animais com broncopneumonia grave, corroborando com a literatura (GONÇALVES et al., 2001; MARCONDES et al., 2011; SILVA, 2012). A dispneia indica que houve consolidação pulmonar e comprometimento grave das trocas gasosas (PRINGLE, 1992; RADOSTITS et al., 2002). No presente estudo, a associação com a consolidação pulmonar não foi possível porque a lâ e o temperamento inquieto de alguns animais impossibilitou a realização da percussão torácica.

A presença de secreção nasal está relacionada à inflamação do trato respiratório (BELKNAP, 1993; CRANDELL, 1993; GONÇALVES, 2008) e nos casos em que é bilateral, ao comprometimento brônquico e pulmonar (STÖBER, 1993; GONÇALVES, 2008). Alguns animais do G1 apresentaram-na isoladamente e de característica serosa, o que é pouco específica, já que rações pulverulentas frequentemente causam essa manifestação clínica. Portanto, não foi interpretada como alteração respiratória. Já nos animais do G2 e G3, por apresentarem-na de característica mucopurulenta ou purulenta associada à dispneia e demais alterações compatíveis com quadro de comprometimento respiratório, a secreção nasal foi utilizada na diferenciação e localização dos processos respiratórios.

A tosse e o reflexo de tosse positivo estão relacionados ao diagnóstico de broncopneumonia (HINCHCLIFF & BYRNE, 1991; PRINGLE, 1992). O reflexo de tosse positivo esteve presente em cerca de 70% dos animais de ambos os grupos pneumônicos (G2: 14/21 – 66,7% e G3: 7/10 – 70%), associados à tosse produtiva espontânea, e em quatro (21%) dos animais sadios, porém com manifestação de tosse seca. Essa associação entre reflexo e característica da tosse foi utilizada neste estudo como método auxiliar para atestar sanidade ou não do animal e diferenciar os processos inflamatórios.

O ruído laringotraqueal refere-se à vibração das paredes da laringe e da traqueia no momento da passagem do ar. Quando patológico, são audíveis o estridor traqueal associado à estenose de laringe ou traqueia, e as crepitações, provocadas pelo acúmulo de líquido ou muco na traqueia (GONÇALVES,

2008), que foram descritos neste estudo como aumento do ruído laringotraqueal. Este sinal clínico esteve presente em 19% dos animais do G2 e em 40% dos animais do G3, confirmando a presença de secreção ou indicando reação inflamatória local, compatíveis com quadros pneumônicos.

O frêmito torácico é palpável quando há grande quantidade de líquido inflamatório nas vias aéreas posteriores próximas à parede torácica (BRAZ, 1981; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993). Este sinal foi palpado em apenas um animal do G3, associado ao aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar, e às crepitações fina e grossa, fazendo fidedigna a classificação desse animal como portador de broncopneumonia grave.

A propagação do ruído cardíaco à auscultação esteve presente nos dois grupos portadores de broncopneumonia (G2 e G3) acometendo em média 50% desses animais. A congestão pulmonar acontece devido ao preenchimento do interstício pulmonar por líquido, inflamatório ou não, que exacerba e propaga mais facilmente os sons cardíacos e ruídos pulmonares quando aumentados (GONÇALVES, 2008). A associação do aumento dos ruídos traqueobrônquico e bronquiobronquiolar ao aumento da propagação do ruído cardíaco estiveram presentes no grupo G2 em aproximadamente 10% dos animais (2/21) e no G3, em 40% (4/10) (Tabelas 3 e 4).

A crepitação é outro sinal de aumento de líquido inflamatório, embora dentro da luz das vias aéreas, que dependendo da quantidade e da sua localização na árvore brônquica, produz sons diferentes à auscultação. Quando em grande quantidade e nos brônquios de maior calibre, manifesta-se a crepitação grossa, quando em brônquios menores, a crepitação fina (STÖBER, 1993; GONÇALVES et al., 2001; GONÇALVES, 2008). À auscultação pulmonar, 100% dos animais que compunham os grupos G2 e G3 apresentaram sons de crepitação, sendo que: no G2, 66,7% crepitação fina e 33,3% crepitação grossa; e no G3: 20% crepitação fina, 40% crepitação grossa e 40% ambas.

Frente à broncopneumonia, dentre os achados pulmonares mais frequentes de outros autores (GONÇALVES, 1997; MARCONDES et al., 2011; GONÇALVES et al., 2001; GONÇALVES et al., 2011; SILVA, 2012) destaca-se a crepitação grossa. Porém, no presente estudo, a crepitação grossa foi observada em 45,2% dos animais doentes (15/31), contudo acometendo 80%

dos animais portadores de broncopneumonia grave (G3). Sabe-se que a manifestação deste sinal clínico indica comprometimento brônquico e, portanto, maior severidade da doença (GONÇALVES et al., 2011).

Já a crepitação fina, que também é um ruído patológico, está relacionada aos estágios iniciais da broncopneumonia e edema pulmonar (STÖBER, 1993; GONÇALVES, 2008). Apesar da dificuldade de auscultação que alguns autores relatam, seja pela espécie ou por associação deste sinal a outros ruídos de maior intensidade (GONÇALVES, 1997; GONÇALVES, 2008), neste estudo, se fez presente em 64,5% dos animais pneumônicos (20/31), sendo sua maior porcentagem no grupo de animais com broncopneumonia moderada (G2), logicamente associado às demais alterações, demonstra a fidedignidade da divisão dos grupos.

Roncos e sibilos estão associados às inflamações, mais frequentemente às bronquites (WILSON & LOFSTEDT, 1990; HINCHCLIFF & BYRNE, 1991; STÖBER, 1993) e correspondem a ruídos gerados pela vibração do ar durante sua passagem pelas vias aéreas posteriores dificultadas pelas secreções presentes. Os tons graves são chamados de roncos (MAREK & MÓCSY, 1965; KOTLIKOFF & GILLESPIE, 1983 e 1984) e os mais agudos chamados de sibilos (LEHRER, 1990; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993). Somente um animal do estudo, portador de broncopneumonia grave, manifestou ambas as alterações à auscultação.

Apresentaram ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar aumentados no G2, 19% dos animais (4/21). O G3 apresentou 40% (4/10) dos animais com ambos os ruídos aumentados e 20% (2/10) somente o ruído traqueobrônquico aumentado, destes, todos apresentaram também crepitações fina ou grossa e cinco, propagação do ruído cardíaco. A auscultação desses ruídos é facilitada e exacerbada na inflamação, decorrente do aumento na produção de líquido intersticial, que conduz melhor os sons produzidos durante a respiração (PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES, 2008).

Dentro do que foi exposto, um exame criterioso foi fundamental para a diferenciação de animais sadios e doentes, delimitação do segmento do trato respiratório acometido e seleção dos animais que eram portadores de broncopneumonia e, principalmente, para a graduação da severidade desse

processo. A quantidade de associações foi determinante para a divisão dos grupos experimentais.

Dentre os exames complementares comumente usados nos casos de ovinos com alterações respiratórias estão o hemograma, lavado traqueobrônquico, exames radiográfico e ultrassonográfico e centese de tórax, trepanação de seios paranasais, gasometria, biopsia pulmonar, endoscopia, suabe nasal, exame parasitológico e titulação de anticorpos (GONÇALVES, 2004; PUGH, 2005). Neste estudo, foram utilizados os exames hematológico e o citológico do lavado traqueobrônquico.

O perfil hematológico e bioquímico é bastante útil no diagnóstico de diversas enfermidades (CAMPBELL, 2004). Para as alterações respiratórias, o hemograma fornece informações esclarecedoras, principalmente no sentido de indicar se é infecciosa ou não (GONÇALVES, 2008).

O leucograma faz parte do hemograma (KERR, 2003) e consiste nas análises quantitativa (contagem) e qualitativa (análise diferencial e morfológica) dos leucócitos do sangue periférico (SMITH, 2006). Apesar de fornecer informações valiosas sobre o estado geral e momentâneo da produção, distribuição e fisiopatologia leucocitária, raramente é patognomônico em determinada doença (LATIMER & MEYER, 1992). Na Medicina Veterinária é o recurso laboratorial mais comumente utilizado para avaliação dos processos inflamatórios (McSHERRY et al., 1970; EK, 1972). Porém, como o número de leucócitos circulantes apresenta variações entre as espécies (KERR, 2003) valores de referência para cada uma delas devem ser considerados ao interpretar esse exame. Os valores considerados normais para ovinos estão dispostos na Tabela 9.

As médias leucocitárias dos três grupos experimentais mantiveram-se dentro do intervalo de variação dos valores de referência. Porém observa-se aumento das médias e medianas, entre os grupos, de acordo com a presença e severidade da doença ($G1 < G2 < G3$).

Tabela 9. Valores de referência do leucograma de ovinos adultos.

Parâmetro	Relativo (%)	Absoluto (μL)
Contagem de leucócitos	-	4000 a 12000
Neutrófilos segmentados	10 a 50	700 a 6000
Neutrófilos bastonetes	Raro	Raro
Linfócitos	40 a 75	2000 a 9000
Monócitos	0 a 6	0 a 750
Eosinófilos	0 a 10	0 a 1000
Basófilos	0 a 3	0 a 300

Adaptado de Jain, 1996

As médias da contagem de neutrófilos nos animais portadores de broncopneumonia (G2 e G3) foram significativamente maiores que dos ovinos sadios (Tabela 5). A inflamação desencadeada pela enfermidade induziu uma típica resposta de fase aguda, com liberação de catecolaminas, mediadores celulares e humorais e fatores quimiotáticos séricos responsáveis pelo acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, especialmente neutrófilos (RADOSTITS et al., 2002; MOHAMED & ABDELSALAM, 2008), justificando a tendência à neutrofilia observada nos grupos dos animais pneumônicos (G2 e G3).

O fato de não terem apresentado leucocitose, resposta comum em ruminantes, confronta os dados de autores que demonstraram que a broncopneumonia provoca essa alteração (MOHAMED & ABDELSALAM, 2008; AL-QUDAH, 2009; SILVA, 2012). A leucocitose reativa foi observada por Silva (2012) em ovinos com comprometimento respiratório, que apresentaram contagem média de leucócitos de 15.365 células/ μL , relacionada ao aumento do número absoluto de segmentados, eosinófilos e monócitos. Entretanto, são escassos os dados literários sobre o leucograma de ovinos com broncopneumonia.

Vale ressaltar que os bovinos e os ovinos apresentam fisiologicamente número de linfócitos maior que de neutrófilos (SMITH, 2006) e a relação neutrófilo:linfócito varia de 0,4 (KERR, 2003) a 0,5 (TAYLOR, 2000). Nos quadros de inflamação aguda em ruminantes a leucocitose neutrofílica é geralmente acompanhada de linfopenia, alterando essa proporção. O grupo G1 manteve a relação neutrófilo:linfócito em média de 0,43, corroborando com a literatura. Apesar dos animais doentes não terem manifestado linfopenia (Tabela 5), houve redução das contagens médias do G2 e G3, comparadas ao G1. A menor média foi a dos animais com broncopneumonia moderada (G2) e nesse contexto, sabe-se que o estresse da resposta inflamatória,

principalmente aguda, aumenta a produção de glicocorticoide, que leva ao sequestro de linfócitos da corrente sanguínea e sua destruição no tecido linfóide (KIDD, 1991; JAIN, 1993; SCHULTZE, 2000). As proporções médias neutrófilo:linfócito dos grupos de animais doentes foram maiores que no G1. No G2, a relação foi de 0,83 e no G3 de 0,87, o que demonstra o aumento relativo do número de neutrófilos com redução de linfócitos.

Jain (1993) descreve que em ruminantes, a leucocitose com aumento do número de monócitos indica maior severidade e duração do processo inflamatório instalado, caracterizando cronificação da broncopneumonia. No presente estudo nenhum animal apresentou valores absolutos acima da normalidade e nem diferença estatística entre os grupos.

A eosinofilia pode ser indicativa de intensa parasitose (BUDDLE et al., 1992), porém, quando descartada esta hipótese nos animais com comprometimento respiratório, o aumento discreto desse tipo celular é associado à sua ativação e degranulação mediada por imunocomplexos de IgE ou pela ativação do sistema complemento (SACHER & McPHERSON, 2002; KERR 2003; SILVA, 2012), compatível com processos alérgicos e cronificação da doença. As médias dos três grupos experimentais permaneceram dentro dos parâmetros e não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A contagem de basófilos também permaneceu dentro dos valores de referência para a espécie em todos os animais do experimento. O basófilo possui substâncias intragranulares estocadas que mediam sua participação nos processos alérgicos e inflamatórios. Tem como principal função iniciar a reação de hipersensibilidade imediata por meio da secreção de mediadores vasoativos, incluindo histamina, leucotrienos e fator de ativação de plaquetas (SMITH, 2006).

As proteínas de fase aguda (PFAs) são assim chamadas porque suas concentrações plasmáticas são alteradas rapidamente em processos inflamatórios, traumas cirúrgicos e estresse (JAIN, 1993). Nos ruminantes, é um excelente indicador devido à grande capacidade de produção desta espécie frente às enfermidades, sendo considerada melhor que a leucometria como indicador da inflamação (JAIN, 1993). O fibrinogênio é a proteína mais utilizada na avaliação das reações inflamatórias agudas devido à facilidade de mensuração e produção em maior quantidade (KANEKO, 1997;

HORADAGODA et al., 1999) em quadros infecciosos (McSHERRY et al., 1970; SCHALM, 1977). Neste estudo não houve diferença estatística significativa entre as concentrações plasmáticas de fibrinogênio entre os grupos, mas mostrou tendência ao aumento de acordo com a presença e severidade da doença, à semelhança das contagens leucocitárias. Mesmo as médias dos três grupos dentro dos valores de normalidade para a espécie (JAIN, 1993), os grupos G2 e G3, apresentaram valores máximos de 800 e 1000mg/dL, respectivamente, sendo estes 200 a 400mg/dL acima do valor máximo (600mg/dL) encontrado no G1. O aumento dos valores do fibrinogênio nos grupos portadores de broncopneumonia corrobora com os achados de outros autores (PFEFFER & ROBERS, 1989; VESTWEBER et al., 1990; GANHEIM et al., 2003; AL-QUDAH, 2009; SILVA, 2012), porém, a ausência de diferença estatística quando comparados ao G1, foi relacionada ao fato de alguns animais manterem o valor do fibrinogênio dentro da normalidade, embora outros apresentassem o valor elevado. Isto provavelmente se deva a evolução da doença, pois a PFA mostra-se aumentada especialmente no início do processo ou quando existem agudizações repetidas na evolução da enfermidade.

A análise citológica do lavado traqueobrônquico ou broncoalveolar teve seu início em meados de 1970 (MANSMANN & KNIGHT, 1972) e desde então tem sido amplamente utilizada para o acompanhamento e diagnóstico das afecções do trato respiratório posterior, uma vez que a resposta imune local cursa com ativação de células endoteliais, epiteliais e macrófagos alveolares, e recrutamento e ativação de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. A dimensão da migração e o tipo celular predominante dependem da doença instalada (VAN DER VLIET & CROSS, 2000; DUFLOO et al., 2002) e o lavado traqueobrônquico é extremamente valioso na diferenciação de processos infecciosos, alérgicos, parasitários e neoplásicos (BEECH, 1975; WHITWELL & GREET, 1984; STÖBER, 1993). As pneumonias, por exemplo, têm como característica o influxo de células fagocíticas (BIRCAN et al., 2008), principalmente os neutrófilos.

O diagnóstico citológico é realizado pela contagem global associado à avaliação dos tipos celulares (BEECH, 1975; WHITWELL & GREET, 1984; STÖBER, 1993). No presente estudo, a citologia traqueobrônquica

correlacionou aumento da celularidade em função do quadro clínico. A média do número total de células se elevou gradativamente com a intensidade do quadro, à semelhança de estudos feitos em bovinos por Gonçalves (1997) e em ovinos, por Marcondes e colaboradores (2011). Esse aumento de acordo com a severidade da doença apresentou diferença estatística entre os grupos: G1 e G2; G1 e G3; e G2 e G3 (Tabela 6).

As concentrações individuais do lavado traqueobrônquico dos ovinos do grupo controle (G1) variou de 13.200 a 212.300 células/mL e a média do grupo foi de 62.470 células. Já no grupo de animais portadores de broncopneumonia moderada (G2) a variação foi de 6.600 a 246.400 células/mL, apresentando em média 97.080 células. O G3, composto pelos animais diagnosticados com broncopneumonia grave teve como valor médio 302.390 células, com mínimo de 49.500 e máximo de 804.100 células/mL (Tabela 6 e Figura 10).

Neste estudo, observando as porcentagens médias dos tipos celulares dos animais sadios (G1), houve predomínio massivo de macrófagos ($93,87\% \pm 5,33\%$), corroborando com os demais autores (COHEN & ROSSI, 1983; REYNOLDS, 1983; WALKER et al., 1985; LEID & POTTER, 1985; MARCONDES et al., 2011). Na sequência vieram os linfócitos ($1,66\% \pm 5,33\%$), células epiteliais cilíndricas ($0,71\% \pm 0,90\%$), neutrófilos ($0,63\% \pm 0,74\%$), células epiteliais cilíndricas ciliadas ($0,11\% \pm 0,26\%$) e eosinófilos ($0,03\% \pm 0,11\%$) (Tabela 6 e Figura 10). A distribuição desses tipos celulares foi diferente, tanto no predomínio das populações celulares, quanto em porcentagens, quando comparadas com as de Marcondes e colaboradores (2011), que relataram 20% de neutrófilos, 15% de células epiteliais cilíndricas, 1,4% de linfócitos e 0,77% de eosinófilos.

Os agentes infecciosos podem diminuir o número de macrófagos no lavado traqueobrônquico (SLAUSON et al., 1987) passando a haver predomínio de células envolvidas com mecanismos secundários de defesa pulmonar (COHEN & ROSSI, 1983; REYNOLDS, 1983; WALKER et al., 1985; LEID & POTTER, 1985). Os neutrófilos são os primeiros a sofrerem migração quimiotática para o segmento pulmonar acometido, durante a reação inflamatória local (GONÇALVES, 1997; MARCONDES et al., 2011).

As alterações de celularidade notadas nos animais portadores de broncopneumonia moderada foram estatisticamente diferentes do G1 na

contagem de células nucleadas totais ($G2 = 97,08 \times 10^3$). As demais mudanças mostraram tendência ao aumento discreto de células epiteliais cilíndricas ciliadas ($0,14\% \pm 0,32$), macrófagos ($93,90\% \pm 21,54\%$) e neutrófilos ($5,11\% \pm 20,61\%$), e redução de células epiteliais cilíndricas ($0,33\% \pm 0,36\%$), linfócitos ($0,5\% \pm 1,36\%$) e eosinófilos (0%).

Quando comparado o grupo de animais portadores de broncopneumonia grave ($G3$) ao grupo dos sadios ($G1$) houve diferenças significativamente maiores no grupo pneumônico na contagem de células nucleadas totais ($302,39 \times 10^3 \pm 266,12$) e neutrófilos ($38,9\% \pm 37,96$), e menores, das porcentagens de células epiteliais cilíndricas ($0,1\% \pm 0,32\%$) e macrófagos ($52,6\% \pm 35,33\%$) (Tabela 6).

Estas diferenças foram associadas ao aumento do número de neutrófilos no lavado em casos de inflamação brônquica (VIEL, 1997) e à redução das contagens de macrófagos proporcional à intensidade do processo, traduzindo agressão ao pulmão (DERKSEN et al., 1989). A resposta caracterizada pelo aumento da população local de neutrófilos também foi evidenciada pela formação de aglomerados dessas células nos animais mais gravemente acometidos, à semelhança dos descritos por Beech (1975) e Marcondes e colaboradores (2011).

As contagens de células epiteliais cilíndricas ciliadas entre os três grupos apresentaram a mediana e valores mínimos e máximos iguais. As médias variaram de 0,1 a 0,14%, não apresentando diferença estatística. As contagens de linfócitos e eosinófilos também não se apresentaram diferentes estatisticamente mesmo com o agravamento da doença (Tabela 6).

O estudo da inflamação é essencial para um correto e eficiente entendimento da doença, porém os dados literários sobre a fisiopatologia das enfermidades respiratórias em ovinos são escassos. O desenvolvimento dessa área de pesquisa com o intuito de correlacionar as alterações sistêmicas e locais, proporcionando melhor compreensão destes mecanismos, bem como melhores práticas em conter as respostas indesejáveis do organismo é importante. Por isso, sugeriu-se o estudo da atividade de neutrófilos no pulmão, uma vez que já era de domínio a utilização dos testes com Tetrazólio Nitroazul para verificar a atividade neutrofílica no sangue.

A fagocitose realizada pelo neutrófilo é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra a invasão de microorganismos. O aumento da produção de substâncias oxidativas no interior do neutrófilo, que ocorre por meio do aumento da atividade respiratória desta célula, é fundamental para a adequada eficiência deste processo de defesa (TIZARD, 2009).

O teste da redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT) foi um método desenvolvido para a determinação dessa atividade oxidativa, bem como a detecção de anormalidades do metabolismo fagocítico. Se há redução do NBT no interior dos neutrófilos e consequentes depósitos de formazan intracitoplasmáticos, indicam normalidade na ingestão e capacidade bactericida celular (BAEHNER & NATHAN, 1968). Bohland e colaboradores (2008) em seu estudo sobre influência do tempo de processamento e resultados do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares bovino, concluíram que o tempo máximo ideal é de 2 horas após a coleta, permanecendo as amostras sanguíneas sob baixas temperaturas. O presente estudo respeitou os preceitos retrocitados.

Park e Good (1970) desenvolveram o teste estimulado com extrato bacteriano inativado para diferenciar reações negativas por defeitos metabólicos da ausência de infecção bacteriana ativa. Os animais do G1 apresentaram ao teste estimulado (NBT-E) variação de 2 a 55% de respostas neutrofílicas positivas e média de 27%. Comparando-se as porcentagens dos testes, houve aumento dos neutrófilos ativos à presença do extrato bacteriano inativado de aproximadamente 15%.

Poli e Mantelli (1974) estudaram, em animais clinicamente sadios de diversas espécies, a capacidade dos neutrófilos reduzirem o NBT. Os valores medianos, para ovinos, do percentual de neutrófilos sanguíneos redutores de NBT, encontrado por esses autores, foi de 14%. A média das porcentagens, ao teste não estimulado (NBT-NE), do G1 foi de 12%, portanto, dentro do valor de referência. Entretanto as porcentagens variaram de 0 a 38% de neutrófilos positivos ao teste. Em experimento com metodologia bastante semelhante, Afonso e colaboradores (2002), encontraram valores medianos de atividade de neutrófilos sanguíneos positivos ao teste de NBT em ovinos de 6% e 10%, sem e com tratamento com monensina sódica, respectivamente. Ciarlini (1998) observou a variação de positividade ao mesmo teste de 0 a 56% em ovinos das

raças Suffolk e Ideal em diferentes momentos durante a gestação. Camargo e colaboradores (2010) relataram neutrófilos ativos de ovinos sadios entre $8,40\% \pm 4,56\%$ à $11,60\% \pm 3,28\%$ para o teste não estimulado e $9\% \pm 4,35\%$ à $12,8\% \pm 4,14\%$ para o teste estimulado, submetidos à diferentes dietas. Dentre os animais sem suplementação, no início do experimento apresentavam valores médios de $8,6\% \pm 3,28\%$ (NBT-NE) e $9\% \pm 4,3\%$ (NBT-E). Quando infectados com *Haemonchus contortus*, os ovinos mostraram valores médios de $9,8\% \pm 3,63\%$ (NBT-NE) e $10,80\% \pm 5,35\%$ (NBT-E) (CAMARGO et al., 2010).

As porcentagens mínimas e máximas encontradas nos testes sanguíneos NBT-NE e NBT-E do grupo portador de broncopneumonia moderada (G2) foram 1 a 34% e 2 a 47%, respectivamente e, as médias de redução do NBT, de 8,86 e 19,76%, diferiram aproximadamente 10% quando comparadas.

Os animais do grupo com broncopneumonia grave (G3), tiveram como porcentagens médias de 9,70% para o NBT-NE e de 19,20% para o NBT-E, com diferença que girou em torno de 9,5%. Os mínimos e máximos foram respectivamente 1 a 22% e 4 a 42% de neutrófilos redutores de NBT.

Esta observação difere de estudos realizados em outras espécies animais que sugerem a possibilidade de infecções aumentarem a capacidade de os neutrófilos sanguíneos reduzirem o NBT "in vitro" (LEVENTHAL & SOULSBY, 1972; MACKENZIE et al., 1981) e "in vivo" (DENNIS et al., 1988; JEFFERIES et al., 1996), mas corroboram com autores que também verificaram redução da atividade neutrofílica ou valores normais em diversas doenças e diferentes espécies estudadas (RESTREPO et al., 1977; STRASSER et al., 2003; CARDOSO, 2007; SILVA et al., 2009).

Cardoso (2007) observou diminuição dos depósitos de formazan em fagócitos de crianças portadoras de Leishmaniose visceral. Em bovinos, Silva e colaboradores (2009) observaram que animais com diarreia apresentaram o metabolismo oxidativo comparados aos de animais sadios. A diminuição da atividade neutrofílica dos animais doentes, comparada aos animais controle que tiveram média de 70% de neutrófilos positivos, variou de 14% no início da doença sem tratamento antimicrobiano e de 10% ao término do tratamento e remissão dos sinais clínicos. Neste estudo, os autores concluíram que animais

saudáveis possuem maior poder de reação dos neutrófilos por apresentarem maiores porcentagens de células metabolicamente ativas.

Animais com tristeza parasitária, ou seja, infecção por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* (ALMEIDA et al., 2006), também apresentam porcentagens reduzidas de atividade neutrofílica, aos testes de NBT (SILVA et al., 2009).

Restrepo e colaboradores (1977) concluíram que doenças febris, como infecções generalizadas não piogênicas, tuberculose, malária e abscesso hepático, cursam com testes de NBT dentro dos valores de normalidade, em humanos. A média de atividade dos pacientes portadores de tuberculose pulmonar ativa e não tratada (n=18) foi de 6,8% de neutrófilos sanguíneos ativos. Observaram também que pacientes mesmo em sepse, com comprovada bacteremia, apresentaram o teste dentro dos limites de normalidade, porém geralmente estas respostas reduzidas estão associadas às infecções localizadas.

Strasser e colaboradores (2003) observaram que após a vacinação, os cães apresentavam diminuição da intensidade da redução do NBT e concomitante aumento significativo das IL-1, IL-2, interferon- γ e TNF- α . Este fato não pode ser explicado, já que estas citocinas estão correlacionadas diretamente à atividade de fagocitose e metabolismo celular de neutrófilos.

Costa e colaboradores (2008) avaliaram a atividade neutrofílica de bezerros desde o nascimento até os 150 dias de idade, os quais apresentaram grandes variações nas porcentagens de neutrófilos positivos aos testes NBT-NE e NBT-E, com tendência ao aumento das porcentagens compatível com desenvolvimento do animal, ainda assim, individualmente essas respostas apresentaram-se de forma irregular e dentro do grupo, heterogênea. Como possíveis explicações, associaram as falhas do mecanismo à anormalidade de ativação da NADPH-oxidase, deficiência de glicose e da proteína C-kinase e às diferenças nos tamanhos celulares. A resposta neutrofílica reduzida em animais jovens corrobora com a literatura consultada (PEIXOTO et al., 2002; COSTA et al., 2004; JULIANO, 2006). Juliano (2006) ainda sugere que a fagocitose normal ou comprometida dos PMNs, ou especificamente do neutrófilo, está relacionada a fatores externos e sujeita às interferências na expressão dos receptores, entre elas as endotoxinas bacterianas, associados

aos fatores intrínsecos como idade e capacidade neutrofílica individual, para justificar a grande diversidade de valores encontrados nos bovinos dos grupos estudados.

Visto que houve diferença das porcentagens dos neutrófilos ativos dos animais portadores de broncopneumonia (G2 e G3) aos testes NBT-NE e NBT-E, maior no teste estimulado, pode-se afirmar que o número de neutrófilos com potencial de ativação do metabolismo oxidativo é superior ao dos realmente ativos frente à doença. Pressupõe-se que a carga infectante do animal pneumônico define a porcentagem de neutrófilos ativos circulantes, proporcional à quantidade de patógenos.

Vale ressaltar que as porcentagens médias dos neutrófilos NBT-positivos no teste estimulado foram superiores aproximadamente 15% no G1, 10% no G2 e 9,5% no G3, do que as porcentagens do teste espontâneo. É esperado, que os valores obtidos para a prova estimulada sejam sempre superiores aos obtidos na não estimulada (NBT-NE) (COSTA et al., 2009). Portanto, presume-se que a severidade da doença, mesmo desencadeando neutrofilia, cursa com diminuição da quantidade de neutrófilos na corrente sanguínea com potencial de ativação do metabolismo oxidativo, bem como com a quantidade real circulante na corrente sanguínea.

Nos testes de atividade fagocitária, NBT-NE e NBT-E, no LTB, observou-se positividade apenas no G3. Ciarlini e colaboradores (2004), afirmam que nos testes colorimétricos de redução do NBT, o processo de lavagem para isolamento dos neutrófilos pode alterar os receptores de membrana responsáveis pela ativação do metabolismo oxidativo, além de tornar a célula isolada isenta da influência de importantes componentes celulares e plasmáticos contidos no sangue total. Muniz-Junqueira e colaboradores (2003) também relatam que o manuseio das células pode interferir diretamente na resposta dos fagócitos frente aos testes de fagocitose ou produção de superóxido. Uma vez que, no presente estudo, as células recuperadas pelo LTB foram manipuladas com o intuito de aumentar a concentração do LTB, ou seja, maior quantidade de células por microlitro, podem ter sofrido alterações na expressão dos receptores na membrana. Porém, todas as amostras, independentemente do grupo, foram submetidas aos mesmos procedimentos, com o intuito de minimizar os prejuízos decorrentes da manipulação, e somente

os neutrófilos dos animais portadores de broncopneumonia grave, do G3, foram capazes de reduzir o NBT e apresentar em seu citoplasma ou com íntimo contato com a membrana celular, depósitos de formazan.

Houve menor porcentagem de neutrófilos do lavado traqueobrônquico ativos no teste estimulado (NBT-E) do que no teste não estimulado (NBT-NE). Este resultado é de difícil explicação uma vez que na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos com metodologia semelhante a que foi utilizada nesta pesquisa. Porém as porcentagens diminuídas nos testes NBT-E no presente estudo podem estar relacionadas à quantidade excessiva de partículas a serem fagocitadas, corroborando com Juliano (2006), que afirmou que em situações críticas de exposição ao patógeno, há uma queda na capacidade fagocitária dos bovinos.

As pesquisas sobre metabolismo oxidativo de neutrófilos pelo uso dos testes de redução do NBT além de escassas e contraditórias, especialmente na espécie ovina, apresentam diferentes particularidades metodológicas, culminando com divergências de resultados.

Conclusões

7. Conclusões

Este estudo possibilitou as seguintes conclusões:

- A presença e a associação dos sinais clínicos compatíveis com distúrbios respiratórios das vias aéreas posteriores e parênquima pulmonar confirmaram o diagnóstico de broncopneumonia e proporcionaram a diferenciação da severidade da doença.
- A frequência dos sinais clínicos nos animais pneumônicos obedeceu a seguinte ordem decrescente: reflexo da tosse positivo, aumento do ruído laringotraqueal, secreção nasal, tosse, aumento das frequências cardíaca e respiratória, crepitação grossa, crepitação fina, ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar aumentados, frêmito torácico, roncos e sibilos, que estiveram presentes e associados nos ovinos portadores de broncopneumonia.
- A severidade da doença cursa com redução do número de neutrófilos ativos na corrente sanguínea.
- O NBT é um teste pouco eficiente para verificar a ativação dos neutrófilos em ovinos.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

AFONSO, J.A.B.; CIARLINI, P.C.; KUCHEMBUCK, M.R.G.; KOHAYAGAWA, A.; FELTRIN, L.P.Z.; CIARLINI, L.D.R.P.; LAPOSY, C.B.; MENDONÇA, C.L.; TAKAHIRA, R.K. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de ovinos tratados com monensina sódica e experimentalmente submetidos à acidose ruminal. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, n.4, p.129-134, 2002.

ALMEIDA, M.B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B. FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P.; FARIA, N.A.R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo. **Pesq. Vet. Bras.**, v.26, n.4, p.237-242, 2006.

AL-QUDAH, K. M. Oxidative stress in calves with acute chronic bronchopneumonia. **Rev. Med. Vet.**, v.160, n.5, p.231-236, 2009.

AMORIM, R.M. **Valores séricos e hepáticos de elementos minerais, atividade sérica da ceruloplasmina, hemograma, proteinograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos em bezerros da raça nelore, nascidos de mães com nutrição adequada ou inadequada em cobre e zinco.** 2002. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 158p.

ANDREWS, A.H. Calf respiratory disease. In: ANDREWS, A.H., BLOWEY, R.W., BOYD, R.G., EDDY, R.G. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle.** Oxford: Blackwell, 1992. 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. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, n.4, p.431-436, 2004.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n.1, p.42-47, 2004.

BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **The New England Journal of Medicine**, v.298, n.13, March, p.721-5, 1978.

BAEHNER, R. L.; NATHAN, D. G. Chronic granulomatous disease. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 278, p. 1972-4, 1968.

BALDOCK, N.M.; SIBLY, R.M. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v.28, n.1-2, p.15-39, 1990.

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. Zootec.**, v.46, p.41-49, 1994.

BASS, D.A.; PARCE, J.W.; DECHATELET, L.R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **J. Immunol.**, v.130, n. 4, p. 1910 - 1917, 1983.

BEECH, J. Cytology of tracheobronchial aspirates in horse. **Vet. Pathol.**, v.12, n.3, p.157-164, 1975.

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

BEISEL, W.R. Neutrophile alkaline phosphatase changes in tularemia, sandfly fever, Q fever and noninfectious fever. **Blood**, v.29, p.257-268, 1967.

BELKNAP, E.B. Recognizing the clinical signs of BRSV infection. **Vet. Med.**, v.88, n.9, p.886-887, 1993.

BEVINS, C.L. Scratching the surface. Inroads to a better understanding of airway host defense. **Am. J. Cell. Mol. Biol.**, v.20, p.861-863, 1999.

BİRCAN, A.; SUTCU, R.; GOKIRMAK, M.; HİCYILMAZ, H.; AKKAYA, A.; OZTURK, O. Total Antioxidant Capacity and C-Reactive Protein Levels in Patients with Community-Acquired Pneumonia. **Turk. J. Med. Sci.**, v.38, n.6, p.537-544, 2008.

BOHLAND, E.; SÁ-ROCHA, V.M.; CYRILLO, F.C.; BENESI, F.J. et al. Efeito do tempo de conservação de polimorfonucleares do sangue de bezerros sobre o metabolismo oxidativo e a atividade de fagocitose de *Escherichia coli*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 45, n. 1, p. 48-56, 2008.

BORGES, A.S. **Valores séricos e hepáticos de elementos minerais, determinação da ceruloplasmina sérica, hemograma e metabolismo oxidativo de neutrófilos em novilhas nelore suplementadas com diferentes níveis nutricionais de cobre e zinco**. 2001. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 141p.

BOWLAND, S.L.; SHEWEN, P.E. Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada. **Can. Vet. J.**, v.41, n.1, p.33-48, 2000.

BOYTON, R.J.; OPENSHAW, P.J. Pulmonary defences to acute respiratory infection. **Br. Med. Bull.**, v.61, p.1–12, 2002.

BRAZ, M.P. **Semiologia Médica Animal**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. 644p.

BREEZE, R. Structure, function, and metabolism in the lung. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, n. 2, p.219-35, 1985.

BROGDEN, K.A.; LEHMKULHL, H.D.; CUTLIP, R.C. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. **Vet. Res.**, v.29, n.3-4, p.233-254, 1998.

BUDDLE, B.M.; JOWETT, R.S.; GREEN, P.G.C.; DOUCH, P.L. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. **International Journal for Parasitology**, v.22, p.955-960. 1992.

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

CAMARGO, E.V.; LOPES, S.T.A; COSTA, M.M.; PAIM, F.; BARBOSA, C.S.; LEAL, M.L.R. Neutrophil oxidative metabolism and haemogram of sheep

Experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, p.e1-e6, 2010.

CAMPBELL, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M.A. **Veterinary Hematology and clinical chemistry**. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. p. 479-49.

CARDOSO, V.V. **Manifestações clínicas, laboratoriais e a função dos fagócitos em crianças com leishmaniose visceral tratadas com glucantime**. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. 124p.

CARLTON, W.W.; McGAVIN, M. **Patologia Veterinária Especial**. 2.ed. Porto Alegre: ArtMed. 1998. 672p.

CASTRO, I.J.V. **A caverna na tuberculose pulmonar**. 1926. Tese (Doutorado). Faculdade de medicina do Porto. 90p.

CIARLINI, P.C. **Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos em ovelhas (*Ovis aries* Linnaeus, 1758) naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais ao final da gestação, durante a lactação e após desmame: influência de fatores raciais e hormonais**. 1998. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 204p.

CIARLINI, P.C., BARROS, C. M. Q., LOPES, M. D., KOHAYAGAWA, A., KRAUSE, A., LAPOSY, C. B. Leucograma, fibrinogênio plasmático e capacidade bactericida dos neutrófilos de éguas susceptíveis e resistentes as endometrites. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Anais do I Forum Nacional de Equideocultura, Belo Horizonte, v. 21, n. 03, p.123-125, 1997.

CIARLINI, P.C.; PATRÍCIO, R.F.; COUTO, R.; BONELLO, F.L. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. **Arq. Inst. Biol.**, v.71, n.3, p.323-327, 2004.

CLASTER, S. et al. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. **Blood**, v.64, n.5, p.1079-1084, 1984.

COELHO, H.E. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2002. 234p.

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

COHN, L.A.; REINERO, C.R. Respiratory Defenses in Health and Disease. **Vet. Clin. Small Anim.**, v.37, p.845-860, 2007.

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

COSTA, J.N.; PEIXOTO, A.P.C.; KOHAYAGAWA, A.; FERREIRA, A.F.M.S.C.; CASSETARI, M.L.; CROCCI, A.J. Influência do desenvolvimento etário e da suplementação com vitamina E (acetato de DL-alfatocoferol) no metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.41, p.293-298, 2004.

COSTA, M.C.; FLAIBAN, K.K.M.C.; CONEGLIAN, M.M.; DOGNANI, R.; VETTORATO, E.D.; BALARIN, M.R.S.; LISBÔA, J.A.N. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros das raças Nelore e Limousin nos primeiros quatro meses de vida. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.9, p.431-436, 2008.

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.417-419.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 763p.

DeLONG, P.A.; KOTLOFF, R.M. An Overview of Pulmonary Host Defense. **Semin. Roentgenol.**, v.35, n.2, p.118-123, 2000.

DEMARTINI, J.C.; DAVIES, R.B. An epizootic of pneumonia in captive bighorn sheep infected with *Muellerius* sp. **J. Wildl. Dis.**, v.13, n.2, p.117-124, 1977.

DENNIS, V.A.; KLEI, T.R.; CHAPMAN, M.R. et al. *In vivo* activation of equine eosinophils and neutrophils by experimental *Strongylus vulgaris* infections. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.20, p.61-74, 1988.

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

DUFLO, F.; DEBON, R.; GOUBADLE, J.; CHASSARD, D.; ALLAOUCHICHE, B. Alveolar and serum oxidative stress in ventilator-associated pneumonia. **Br. J. Anaesth.**, v.89, n.2, p.231-236, 2002.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, p.23-27. 2010

EK, N. The quantitative determination of fibrinogen in normal bovine plasma and in cow with inflammatory conditions. **Acta Vet. Scand.**, v.13, n.2, p.174-184, 1972.

FEIGIN, R.D.; SHACKELFORD, P.G.; CHOI, S.C.; FLAKE, K.K.; FRANKLIN, F.A.; EISENBERG, C.S. Nitroblue tetrazolium dye test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. **J. Pediatr.**, v.78, p.230-7, 1971.

FEITOSA, F.L. **Semiologia Veterinária – A Arte do Diagnóstico**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. 424p.

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

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

FRANCO, L.; PASSOS, A. **Fundamentos da Epidemiologia**. 1ª ed., São Paulo: Editora Manole, 2005, 308p.

GANHEIM, C.; HULTÉN, C.; CARLSSON, U.; KINDAHL, H.; NISKANEN, R.; WALLER, K.P. The acute response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. **J. Vet. Med. Series B**, v.50, n.4, p.183-190, 2003.

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

GILLES, L.; AZEVEDO NETO, R.S. Mecanismos de defesa do Aparelho Respiratório. **J. Bras. Pneumol.**, v.13, supl.3, p.1-6, 1987.

GOLDSTEIN, I.M.; SHAK, S. Host defenses in the lung: neutrophils, complement and other humoral mediators. In: MURRAY, J.F. & NADEL, Y.A. **Textbook of respiratory medicine**, 2.ed., Philadelphia: W.B. Saunders, v. 1, p. 402-18, 1994.

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. 87p.

GONÇALVES, R.C. Semiologia do sistema respiratório. In: FEITOSA F.L. **Semiologia Veterinária – A Arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2008, p.313 - 331.

GONÇALVES, R.C.; KUCHEMBUCK, M.R.; CURI, P.R.; CHIACCHIO, S.B.; ALMEIDA, C.T.; BORGES, A.S. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. **Revista Ciência Rural**, v.31, n.2, p.263-269, 2001.

GONÇALVES, R.C.; KUCHEMBUCK, M.R.G.; ALMEIDA, C.T. Lavagem traqueobrônquica por traqueocentese em bovinos. **Vet. Zootec. São Paulo**, v.2, p.17-25, 1990.

GONÇALVES, R.C.; MATTOS, M.C.F.I.; KUCHEMBUCK, M.R.G.; LOPES, S.R.; BORGES, A.S. Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.3, p.307-11, 2004.

GONÇALVES, R.C.; SILVA, A.A.; FERREIRA, D.O.L.; MARCONDES, J.S.; PITUCO, E.M.; DIAS, A.D. Detection of serum antibodies to parainfluenza type 3 virus, respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhea virus, and herpes virus type 1 in sheep in the Region of Botucatu, São Paulo. **Braz. J. Vet. Med. Anim. Health**, v.3, n.4, p. 1-5, 2011.

GONZÁLEZ, F.H.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J.J. Haptoglobulina em ruminantes: generalidades Y posibles aplicaciones clínicas. **Anales de Veterinária Murcia**, v.23, p.5-17, 2007.

GOODWIN-RAY, K.A.; STEVENSON, M.A.; HEUER, C.; COGGER, N. Economic effect of pneumonia and pleurisy in lambs in New Zealand. **New Zealan. Vet. J.**, v.56, n.3, p.107-114, 2008.

GORDON, A.M.; ROWAN, R.M.; BROWN, T. et al. Routine application of the nitroblue-tetrazolium test in the clinical laboratory. **J. Clin. Pathol.**, v.26, n.1, p. 52-56, 1973.

GORDON, P.A.; STUART, J.; LEE, T.R; et al. The citocentrifuge NBT test. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.28, p.674, 1975.

HAPPEL, K.I.; BAGBY, G.J.; NELSON, S. Host Defense and Bacterial Pneumonia. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v.25, n.1, p.43-52, 2004.

HARADA, R.N.; REPINE, J.E. Pulmonary host defense mechanisms. **Chest**, v.87, p.247-252, 1985.

HARGREAVES, A.L.; HUTSON, G.D. Changes in heart, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v.26, n.1-2, p.91-101, 1990.

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), 2002.

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

HORADAGODA, N.U; KNOX, K.M.G.; GIBBS, S.W.; REDI, S.W.J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S.E.R.; ECKERSALL, P.D. Acute phase protein in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Vet. Rec.**, v.144, n.16, p.437-441, 1999.

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

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap.2. p.37-48.

JEFFERIES, J.R.; CORBETT, E.; BARRETT, J. et al. Polarization and chemokinesis of ovine and human neutrophils in response to *Fasciola hepatica* excretory - secretory products. **Int. J. Parasitol.** v.26, p.409-414, 1996.

JULIANO, R.A. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça curraleiro**. 2006. Tese (Doutorado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 115p.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. New York: Academic Press, 1997. 932p.

KANNAN, K.; JAIN, S. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7, n. 3, p. 153–163, 2000.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária. Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.

KIDD, R. Interpreting neutrophil numbers. **Vet. Med.**, v. 86, n.10, p. 975-982, 1991.

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

KOTLIKOFF, M.I., GILLESPIE, J.R. Lung sounds in veterinary medicine: Part I. Terminology and mechanisms of sound production. **Compendium Continuing Education Practicing Veterinarian**, v.5, p.634-644, 1983.

KOTLIKOFF, M.I.; GILLESPIE, J.R. Lung sounds in veterinary medicine: Part II. Deriving clinical information from lung sounds. **Compendium Continuing Education Practicing Veterinarian**, v.6, p.462-467, 1984.

LACASTA, D.; FERRER, L.M.; RAMOS, J.J.; GONZÁLEZ, M.; HERAS, M.D. Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. **Small Rumin. Res.**, v.80, n.1, p.28-32, 2008.

LAPOSY, C.B.; LOPES, R.S.; BALARTIN, M.R.S.; ATAÍDE, D.F.; TAKAHIRA, R.K.; SOUZA, C. Avaliação hematológica e metabolismo oxidativo dos

neutrófilos de equinos atletas entre 12 e 16 meses de idade. **Veterinária Notícias**, v. 6, n.2, p. 25-29, 2000

LARSON, V. L., BUSCH, R.H. Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.144-146, 1985.

LATIMER, K.S.; MEYER, D.J. Os leucócitos na Saúde e na Moléstia. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. v. 4, p. 2616-2664.

LEHMKUHL, H. D.; CUTLIP, R.C. Characterization of parainfluenza type 3 virus isolated from the lung of a lamb with pneumonia. **Am. J. Vet. Res.**, v.43, n.4, p.626-628, 1981.

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

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.

LEVENTHAL, R.; SOULSBY, E.J.L. Nitroblue tetrazolium dye reduction as an indicator of lysosomal activity at a larval surface. **J. Parasitol.**, v.58, p.1016-1017, 1972.

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

LOPES, S.T.A.; PAES, P.R.O.; KOHAYAGAWA, A.; LOPES, R.S.; LANGONI, H., BULLA, C., LANGREFE, L. Atividade funcional neutrofílica em cabras com mastite induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetato DL- α -tocoferol). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, n.5, 2003.

MACKENZIE, C.D.; JUNGERY, M.; TAYLOR, P.M. et al. The *in-vitro* interaction of eosinophils, neutrophils, macrophages and mast cells with nematode surfaces in the presence of complement or antibodies. **J. Pathol.**, v.133, p.161-175, 1981.

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

MALAZDREWICH, C.; AMES, T.R.; ABRAHAMSEN, M.S.; MAHESWARAN, S.K. Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. **Vet. Pathol.**, v.38, n.3, p.297-310, 2001.

MANSMANN, R.A.; KNIGHT, H.D. Transtracheal aspiration in the horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.160, p.1527, 1972.

MANSMANN, R.A.; KNIGHT, H.D. Transtracheal aspiration in the horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.160, p.1527, 1972.

MARCONDES, J.S.; MARTINS, M.T.A.; SILVA, A.A.; RODRIGUES, M.M.P.; FERREIRA, D.O.L.; AMORIM, R.L.; DIAS, A.; GONÇALVES, R.C. Lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal como metodologia de colheita de células do trato respiratório de ovinos sadios e portadores de afecções pulmonares. **Pesq. Vet. Bras.**, v.31, n.4, p.281-286, 2011.

MASON, C.M.; NELSON, S. Pulmonary Host Defenses - Implications for Therapy. **Clin. Chest Med.**, v.20, n.3, p.475-488, 1999.

MASON, C.M.; NELSON, S. Pulmonary Host Defenses and Factors Predisposing to Lung Infection. **Clin. Chest Med.**, v.26, p.11-17, 2005.

McSHERRY, B.J.; HORNEY, F.D.; DEGROOT, J.J. Plasma fibrinogen in normal and sick cows. **Cand. J. Comp. Med.**, v.34, n.3, p.191-197, 1970.

MEDRONHO, R.A. **Epidemiologia**. 2^a ed., Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2004, 517p.

METCALF, J.A.; GALLIN, J.I.; NAUSEEF, W.M. **Laboratory manual of neutrophil function**. New York: Raven Press, 1986. 191p.

MILLER, D.R.; KAPLAN, H.G. Decreased Nitroblue Tetrazolium Dye Reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. **Pediatrics**, v.45, p.861, 1970.

MOHAMED, R.A.; ABDELSALAM, E.B. A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory mannheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. **Bulg. J. Vet. Med.**, v.11, n.3, p.139-160, 2008.

MOREIRA, J.S.; LEITE, M.R. Mecanismos de defesa do aparelho respiratório. In: SILVA, L.C.C. **Compêndio de Pneumologia**. São Paulo: Fundação FYK, 1991. pp. 148-153.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; PEÇANHA, L.M.F.; SILVA-FILHO, V.L.; CARDOSO, M.C.A.; TOSTA, C.E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes, **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.6, p.1096-1102, 2003.

MURPHY, S.; FLORMAN, A.L. Lung defenses against infection: a clinical correlation. **Pediatrics**, v. 72, p. 1-15, 1983.

NATHAN, D.G. NBT reduction by human phagocytes. **New England of journal medicine**, Schaumburg, v.290, n.5, p.280-1, 1974.

NELSON, S.; SUMMER, W.R. Innate immunity, cytokines, and pulmonary host defense. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.12, n.3, p.555-567, 1998.

NICOD, L.P. Pulmonary Defence Mechanisms. *Respiration*, v.66, p.2-11, 1999.

PARK, B.H.; GOOD, R.A. Nitroblue tetrazolium test stimulated. **Lancet**, v.19, p.616, 1970.

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

PEIXOTO, A.P.C.; COSTA, J.N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K.; SAITO, M.E. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca - Influência dos fatores etários. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.3, n.1, p.16-20, 2002.

PFAFFEROTT, C.; MEISELMAN, H.J.; HOCHSTEIN, P. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. **Blood**, v.59, n.1, p.12-15, 1982.

PFEFFER, A.; ROGERS, K.M. Acute phase response of sheep: changes in the concentrations of ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin and the major blood

cell types associated with pulmonary damage. **Res. Vet. Sci.**, v.46, n.1, p.118-124, 1989.

PILETTE, C.; DURHAM, S.R.; VAERMAN, J.; SIBILLE, Y. Mucosal Immunity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease A Role for Immunoglobulin A. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v.1, p. 125–135, 2004.

POLI, G., MANTELLI, F. Il “test” N.B.T. negli animali domestici: valori normali. **Clinica Veterinaria (Milan)**, Milan, v.97, p.241-7, 1974.

POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. **Folia Vet. Lat.**, v.3, p.215-239, 1973.

PRINGLE, J.K. Ancillary testing for the ruminant system. **Vet. Clin. North Am.**, v.8, n.2, p.243-256, 1992.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 513p.

PUSTERLA, N.; WATSON, J.L.; WILSON, W.D. Diagnostic Approach to Infectious Respiratory Disorders. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.5, p.174-186, 2006.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 2065p.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **Eur. Respir. J.**, v.16, N.3, p.534-554, 2000.

RAKICH P. L.; LATIMER K. S. Cytology of the Respiratory Tract. Clinical Pathology: Part II. **Vet Clin North Am Small Animal Practice**. v.19, n.5, p. 823-50, 1989.

RAPHEL, C.F.; GUNSON, D.E. Percutaneous lung biopsy in the horse. **Cornell Vet.**, v.71, p.349-348, 1981.

REAGAN, W.J.; SANDERS, T.G.; DeNICOLA, D.B. **Veterinary Hematology – Atlas of common domestic species**. Iowa: Blackwell, 1998. 75p.

REBAR, A.H.; MACWILLIAMS, P.S.; FELDMAN, B.F.; METZGER, F.L.; ROCHE, J. **Guia Hematologia para Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003. 291p.

RESTREPO, M.; AGUDELLO, C.; MOLINA, J.; ARISTIZÁBAL, L. Aplicacion diagnostica del nitroazul de tetrazolium. **Acta Médica Colombiana**, v.2, n.3, p.159-165, 1977.

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

ROBBINS, S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K. **Robins e Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p.

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

ROTH, J.A.; KAEBERLE, M.L.; APPEL, L.H. Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. **American journal o veterinary research**, Shaumburg, v.44, n.2, p.247-53, 1983.

RUSVAI, M.; FODOR, L. Occurrence of same viruses and bacteria involved in respiratory diseases of ruminants in Hungary. **Acta Vet. Hung.**, v.46, n.4, p.405-414, 1998.

SACHER, R.A.; McPHERSON, R.A. Hematologia. In: SACHER, R.A.; McPHERSON, R.A. **Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais**. 11.ed. São Paulo: Manole, p.431-441, 2002.

SARA, I.S.; DWARAKNATH, P.K. A note on nitroblue tetrazolium test in normal and diseased animals. **Indian journal animal science**, v.47, n.6, p.362-364, 1977.

SCHALM, O.W. Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.170, n.10, p.1137-1140, 1977.

SCHULTZE, A.E. Interpretation of Canine Leucocyte Responses. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.p.366-381.

SCHUTTE, B.C.; McCARY, P.B. Beta-defensins in lung host defense. *Annu. Rev. Physiol.*, v.64, p.709–48, 2002.

SILVA, A.A. **Estudo clínico, hemogasométrico e do estresse oxidativo em ovinos clinicamente sadios e portadores de pneumonia**. 2012. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 124p.

SILVA, A.A.; FERREIRA, D.O.L.; PORTO, C.D.; SEQUEIRA, J.L.; GONÇALVES, R.C. Segurança e eficácia da técnica de biopsia pulmonar transtorácica percutânea para avaliação histopatológica do parênquima pulmonar de ovinos clinicamente sadios. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, n.4, 2010.

SILVA, N.C.M.; ASSIS, T.S.; FERREIRA, M.R.A.; MOREIRA, C.N. Influência da síndrome diarreia no metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros da raça girolando. **Ciência Animal Brasileira**, s.1, 2009.

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

SMITH, B. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3ª ed. São Paulo: Manole. 2006. 1728p.

SPEIRS, V. C. **Exame Clínico dos Equinos**, Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 1994, 300p.

STANDIFORD, T.J.; KUNKEL, S.L.; GREENBERGER, L.L.L.; STRIETER, R.M. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. **J. Leukoc. Biol.**, v.59, n.1, p.24-28, 1996.

STÖBER, M. Aparelho respiratório. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.139-165.

STRASSER, A.;MAY, B.; TELTSCHER, A.; WISTRELA, E.; NIEDERMULLER, H. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.94, p.113-121, 2003.

STYRT, B. Species variation in neutrophil biochemistry and function. **Journal of Leukocyte biology**, New York, v.46, p.63-74, 1989.

TAYLOR, J.A. Leukocyte response in Ruminants. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.391-404.

THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução**. 8.ed. São Paulo: Elsevier, 2009. 520p.

TRAVIS, S.M.; SINGH, P.K.; WELSH, M.J. Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. **Curr. Opin. Immunol.**, v.13, p.89-95, 2001.

TRIGO, F.J. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. **Ciencia Veterinaria**, v.4, p.1-36, 1987.

VALDIVIA-ARENAS, M.A.; AMER, A.; HENNING, L.N.; WEWERS, M.D.; SCHLESINGER, L.S. Lung infections and innate host defense. **Drug Discov. Today Dis. Mech.**, v.4, n.2, p.73-81, 2007.

VAN DER VLIET, A.; CROSS, C.E. Oxidants, Nitrosants, and the Lung. **Am. J. Med.**, v.109, n.5, p.398-421, 2000.

VENGE, P. The human eosinophil in inflammation. **Agents Actions**, v.29, p.122-126, 1990.

VESTWEBER, J.G.; KLEMM, R.D.; LEIPOLD, H.W.; JOHNSON, D.E.; BAILIE, W.E. Clinical and pathologic studies of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia in calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, n.11, p.1792-1798, 1990.

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

VIEIRA, 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 com lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. **Vet. Méx.**, v.27, 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.

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.

WEISS, D.J.; KLAUSNER, J.S. Neutrophil-induced erythrocyte injury: a potential cause of erythrocyte destruction in the anemia associated with inflammatory disease. **Veterinary Pathology**, v.25, n.6, p.450-455, 1988.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 6ª ed. Iwoa: Wiley-Blackwell, 2010. 1206p.

WEISS, S.J.; LOBUGLIO, A.F. Phagocytic generated oxygen metabolites and cellular injury. **Lab. Invest.**, v.47, n.1, p.5-18, 1982.

WELLER, P.F. Eosinophilia. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.73, p.1-10, 1984.

WELLER, P.F. Immunobiology of eosinophils. **The New England Journal Medicine**, v.324, p.1110-1118, 1991.

WELSH, D.A.; MASON, C.M. Host defense in respiratory infections. **Med. Clin. N. Am.**, v.85, n.6, p.1329-1347, 2001.

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

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.

WILSON, J.H.; LOFSTEDT, J. Alterations in respiratory function. In: SMITH, B. **Large Animal internal medicine: diseases of horse, cattle, sheep and goats**. St; Louis: C.V. Company, 1990, v.1, p.47-99.

WINTROBE, M.M. Diagnostic significance of changes in leukocytes. **Bulletin of the New York academy of medicine**, p.223-239, 1939.

ZAAS, A.K.; SCHWARTZ, D.A. Innate Immunity and the Lung: Defense at the Interface Between Host and Environment. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.15, n.6, p.195-202, 2005.

ZHANG, P.; SUMMER, W.R.; BAGBY, G.J.; NELSON, S. Innate Immunity and pulmonary host defense. **Immunol. Rev.**, v.173, p.39-51, 2000.

ZINKL, J.G. In: COWEL, R.L.; TYLER, R.D. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 2ª ed. St. Luis: Mosby, p.73-75, 2002.

ZINKL, J.G.; KABBUR, M.B. Neutrophil function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5ª ed. San Diego: Academic Press, p.285-302, 1997.

Artigo Científico

Artigo: Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos sanguíneos e do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios.

A ser enviado para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

ISSN: 0100-736X

Normas para publicação disponível em:

<http://www.pvb.com.br/br/instructions.pdf>

**Normas Para Publicação
INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes.

ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das

convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto auto explicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Trabalho.....**Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos sanguíneos e do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios pelos testes de redução do Tetrazólio Nitroazul¹**

Mayra T. A. Martins^{2*}, Naiana S. Branchini², Bianca P. Santarosa², Carolina K. Mori², Hugo E. O. Beserra², Adriano Dias³, Roberto C. Gonçalves²

ABSTRACT.- Martins, M.T.A., Branchini, N.S., Santarosa, B.P., Mori, C.K., Beserra, H.E.O., Dias, A., Gonçalves, R.C. 2012. [Evaluation of neutrophil oxidative metabolism and blood bronchoalveolar lavage from healthy sheep tests by nitroblue tetrazolium reduction.] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brasil. E-mail: mayra.tam@gmail.com

The aim of this study was to analyze the oxidative metabolism of neutrophils in the blood and tracheobronchial lavage (TBL) of healthy sheep (n=19). The animals were subjected to clinical examination, blood count and cytological evaluation of TBL. The neutrophil oxidative metabolism of blood and TBL was assessed by counting the positives cells positives of Tetrazolium Nitoblue (NBT) reduction test spontaneous (NS-NBT) and stimulated with inactivated bacterial extract (S-NBT). The absense of pulmonary and systemic inflammatory response was assessed by the white blood cells (WBC) counts, plasma fibrinogen and total and differential counts of cells in the TBL. The animals in the experimental group showed all variables of hemogram within normal values. Cytological anysis of TBL releaved averages of 62.470 cells/mL, 93,87% $\pm$ 5,33% of macrophages, 1,66 $\pm$ 5,33% of lymphocytes, 0,71 $\pm$ 0,9% of cylindrical epithelial cells, 0,63 $\pm$ 0,74% of neutrophils, 0,11 $\pm$ 0,26% of ciliated epithelial cells and 0,03 $\pm$ 0,11% of eosinophils. These results demonstrate the occurrence of lipid peroxidation and oxidative stress in sheep carrying bronchopneumonia associated with inflammatory responses and the accumulation of phagocytic cells. The mean percentages of blood neutrophils with intracytoplasmic deposits of formazan were 12 $\pm$ 10,61% to NS-NBT and to 27,05 $\pm$ 17,49 to S-NBT. Of the few neutrophils present in TBL, showed no NBT reduction in both tests. In this study, it was concluded that healthy animals do not possess neutrophil reducing NBT in LTB.

INDEX TERMS: Sheep, tracheobronchial lavage, neutrophil activity.

RESUMO.- O objetivo deste estudo foi analisar o metabolismo oxidativo de neutrófilos sanguíneos e no lavado traqueobrônquico (LTB) de ovinos sadios (n=19). Os animais foram submetidos ao exame clínico, hemograma e avaliação citológica do LTB. O metabolismo oxidativo dos neutrófilos sanguíneos e do LTB foi avaliado pela contagem de células positivas aos testes de redução do Tetrazólio Nitroazul espontâneo (NBT-NE) e estimulado com extrato bacteriano inativado (NBT-E). A ausência de resposta inflamatória sistêmica e pulmonar foi avaliada pelo leucograma, fibrinogênio plasmático e contagens total e diferencial das células do LTB. Os animais que compuseram o grupo experimental apresentaram todas as variáveis do hemograma dentro dos valores de normalidade. A análise citológica do LTB demonstrou médias de 62.470 células/mL, 93,87% $\pm$ 5,33% de macrófagos, 1,66% $\pm$ 5,33 de linfócitos, 0,71% $\pm$ 0,90% de células epiteliais cilíndricas, 0,63% $\pm$ 0,74% de neutrófilos, 0,11% $\pm$ 0,26% de células epiteliais cilíndricas ciliadas e 0,03% $\pm$ 0,11% de eosinófilos. As médias de porcentagens de neutrófilos sanguíneos com depósitos de formazan intracitoplasmático foram de 12 $\pm$ 10,61 para o teste NBT-NE e de 27,05 $\pm$ 17,49 para o NBT-E. Dos poucos neutrófilos presentes no LTB, nenhum demonstrou redução do NBT em ambos os testes. Nas condições deste estudo, concluiu-se que, animais sadios não possuem neutrófilos redutores de NBT no LTB.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ovinos, lavado traqueobrônquico, atividade neutrofílica.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Auxílio financeiro (Proc. 2011/09743-0) e bolsa de mestrado (Proc. 2010/04254-9) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

¹ Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

*Autor para correspondência: mayra.tam@gmail.com

¹ Grupo de Apoio à Pesquisa, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os mecanismos antibacterianos dos neutrófilos são classificados em dependentes e independentes de oxigênio (Styrt 1989). Durante a fagocitose ocorre a ativação do metabolismo oxidativo que leva a um aumento no consumo de oxigênio pelos neutrófilos, gerando substâncias altamente oxidantes (radical superóxido e peróxidos). Esses produtos oxigenados gerados são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e possuem papel fundamental na destruição do tecido inflamatório, uma vez que essas formas reativas de oxigênio provocam reações secundárias capazes de destruir bactérias e outras células (Babior 1978, Zinkl & Kabbur 1997). Embora metabólitos de oxigênio gerados pelos neutrófilos sejam necessários para o mecanismo de defesa antimicrobiano, estes radicais livres produzidos podem lesar o neutrófilo e o tecido ao seu redor (Weiss & Lobuglio 1982).

Existem vários métodos de avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, dentre eles estão: a determinação do consumo de oxigênio, habilidade de iodinação, quimioluminescência, redução do ferricitocromo C, determinação da atividade da mieloperoxidase, determinação da 2,7-diclorofluoresceína por citometria de fluxo (Baehner & Nathan 1968) e teste de redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT) à formazan (Miller & Kaplan 1970).

O teste de redução do NBT é um dos mais indicados (Baehner & Nathan 1968) por ser um método rápido, simples, de baixo custo e que não requer isolamento celular (Gordon et al. 1973). Utilizado amplamente na triagem em hospitais (Sara & Dwaraknath 1977) principalmente para o diagnóstico de doença granulomatosa crônica em crianças (Miller & Kaplan 1970), malária, micoplasmose e meningite viral (Babior 1978). É também extremamente útil na determinação de defeitos na explosão respiratória em pacientes com infecções crônicas recorrentes (Babior 1978) e na avaliação da atividade bactericida do neutrófilo (Roth et al. 1983).

O teste do NBT pode ser considerado como mensuração indireta da atividade microbicida dependente de oxigênio dos neutrófilos (Gordon et al. 1975) e pode ser avaliado por meio da microscopia óptica ou por espectrofotometria (Metcalf et al. 1986). O NBT é um corante amarelo claro que quando adicionado a uma suspensão de neutrófilos entra no vacúolo fagocítico junto com a partícula ingerida, onde é reduzido pelo ânion superóxido ao formazan (Nathan 1974). A redução do corante pode ser avaliada à microscopia óptica, e assim determinar o percentual de positivas, pelas células reductoras apresentarem um precipitado intracitoplasmático de azul escuro a enegrecido (Ciarlini 1998), de localização heterogênea, podendo apresentar-se ligado à membrana da célula ou no interior dos fagócitos (Nathan 1974).

Segundo Wintrobe (1939), o teste do NBT é mais confiável que a contagem total de leucócitos como indicativo de infecção bacteriana, uma vez que, condições de estresse também podem levar a um quadro de leucocitose. Já as modificações enzimáticas detectadas na reação do teste NBT, que aparecem durante as infecções, são independentes de leucocitose (Beisel 1967, Feigin et al. 1971). Em um trabalho publicado por Feigin e colaboradores (1971), pacientes com infecções bacterianas tiveram depósitos de formazan aumentados quando comparados com indivíduos sadios ou com outras enfermidades de origem não bacteriana, o que faz do teste do NBT um método simples para avaliar a capacidade bactericida dos neutrófilos. Além disso, auxilia no prognóstico das doenças infecciosas, através da avaliação e acompanhamento da eficiência da terapia antimicrobiana (Feigin et al. 1971).

Park e Good (1970) com o objetivo de evitar resultados falsos negativos, desenvolveram uma técnica que avalia a capacidade do neutrófilo em reduzir o NBT na presença de um estimulante à base de extrato bacteriano inativado, conhecido como teste estimulado de redução do NBT (NBT-E). O teste do NBT-E distingue os resultados falsos negativos devido a defeitos metabólicos dos resultados verdadeiramente negativos associados com a ausência de infecção bacteriana ativa. A extensão da produção do formazan pelo fagócito em repouso é muito menor do que aquela observada durante a fagocitose.

Na medicina veterinária, Poli e colaboradores (1973) foram os primeiros a utilizarem o teste de NBT em cães com doenças bacterianas e desde então, o teste foi utilizado em diversas situações e diferentes espécies de animais de grande porte, por Ciarlini e colaboradores (1997) e Laposy e colaboradores (2000) em equinos, Borges (1998), Amorim (2002) em bovinos, Lopes e colaboradores (2003) em caprinos e Ciarlini (1998) em ovinos.

Dentro deste contexto, sabe-se que a broncopneumonia é a doença respiratória mais comum em ovinos, de caráter inflamatório sistêmico e local, acompanhada de leucocitose com neutrofilia e substituição do predomínio das células residentes nos pulmões (macrófagos alveolares) pelas envolvidas nos mecanismos secundários de defesa pulmonar (Cohen & Rossi 1983, Reynolds 1983, Walker et al. 1985, Leid & Potter 1985), principalmente os neutrófilos (Gonçalves 1997, Marcondes et al. 2011).

As análises do lavado traqueobrônquico (LTB) fornecem dados dos agentes infecciosos, alterações no número de macrófagos alveolares (Slauson et al. 1987), bem como informações sobre a resposta inflamatória local (Gonçalves 1997, Marcondes et al. 2011) de acordo com o patógeno envolvido.

Segundo Gonçalves (1997), os métodos de colheita do lavado traqueobrônquico devem obedecer a alguns preceitos metodológicos, tanto na realização, quanto no processamento do líquido obtido. A técnica não

pode ser de difícil execução, deve ser barata, segura e desenvolvida de tal maneira, que permita o emprego a campo pelos médicos veterinários. O líquido do lavado tem que ser rico em células e ser representativo das regiões mais profundas do pulmão (Zinkl 2002). A sondagem nasotraqueal surgiu como método alternativo, com custo menor que a endoscopia (Gonçalves 1997) e menos traumática que a traqueocentese.

O LTB por via nasotraqueal pode ser realizado com o animal em posição quadrupedal e a cabeça e pescoço estendidos. A sondagem é realizada com tubo guia siliconizado, introduzido através da narina e direcionado até a porção mais baixa da traqueia. Por dentro desse tubo, destinada à infusão e aspiração do conteúdo, uma sonda de polietileno é introduzida (Gonçalves 2004). Fernandes e colaboradores (2000) e Hewson e Viel (2002) descrevem infusões de alíquotas estéreis de 60 mL de solução salina 0,9% ou solução fosfatada salina tamponada (PBS).

Esta técnica foi utilizada em bezerros e mais indicada para realização de citologia, tendo em vista a possibilidade de contaminação do material com secreções do trato respiratório anterior (Gonçalves 2004). Apesar de não muito explorada em ovinos, Marcondes e colaboradores (2011) provaram que a metodologia descrita anteriormente mostrou-se eficiente na obtenção de amostras das vias aéreas distais, com representatividade celular da região broncopulmonar à semelhança das demais espécies estudadas (Gonçalves 1997, Fernandes et al. 2000, Gonçalves et al. 2004).

O estudo de animais hígidos é pré-requisito para o entendimento de qualquer alteração patológica. Sugeriu-se então, mensurar os neutrófilos ativos presentes no sangue periférico e nas vias aéreas de ovinos sadios para o conhecimento da resposta normal dos neutrófilos frente aos testes de redução do NBT e posterior comparação em animais portadores de broncopneumonia, com o intuito de aprofundar os estudos da inflamação tecidual para melhorar a efetividade dos procedimentos terapêuticos e prognóstico. Para isso objetivou-se padronizar a técnica de redução do Tetrazólio Nitroazul em formazan pelos neutrófilos sanguíneos e dos recuperados pelo LTB de ovinos sadios.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O trabalho foi desenvolvido no município de Botucatu, São Paulo – Brasil (latitude 22°51'S e longitude 48°27'W. Grw.). Foram selecionados 19 ovinos com idade máxima de um ano, independentemente de raça e sexo, provenientes de propriedades do município e região. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (protocolo nº 153/2010 – CEUA).

Exame Clínico

Os animais incluídos no estudo foram submetidos aos exames físico, hematológico e citológico do LTB, sem manifestarem qualquer alteração clínica ou laboratorial, apresentando todas as variáveis dentro dos valores considerados de referência para a espécie (Jain 1993, Feitosa 2008).

Colheita e Processamento das Amostras

Durante a realização das colheitas, os animais foram contidos manualmente e mantidos na posição quadrupedal. A colheita de sangue foi realizada de forma asséptica, pela venopunção da veia Jugular com sistema à vácuo, em um total aproximado de 8mL: 5mL em tubo plástico contendo EDTA, para a realização do hemograma, e 3mL em tubo plástico contendo heparina, para a realização dos teste de redução do NBT. As amostras com EDTA foram mantidas em temperatura ambiente até seu processamento e as para o NBT sob refrigeração em caixa isotérmica com gelo.

A contagem total de leucócitos e hemácias foi realizada em contador semi-automático (Celm SB-190) e a contagem diferencial dos leucócitos ao microscópio óptico, em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Para a dosagem da hemoglobina foi utilizado o método da cianometahemoglobina (Kit Comercial Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda., Brasil), a mensuração da proteína total e do fibrinogênio plasmáticos por refratometria (Refratômetro RTP-20ATC) e o volume globular pelo método do micro hematócrito (Weiss e Wardrop 2010).

A colheita do lavado traqueobrônquico foi realizada pela via nasotraqueal. Para tal, a antisepsia da área externa das narinas com álcool iodado foi realizada e uma sonda guia siliconizada com 65cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro, com a extremidade lubrificada com Lidocaína gel, foi introduzida pelo vestíbulo nasal e meato nasal médio até a orofaringe. Ao tocar a epiglote, a sonda foi direcionada para a laringe e traqueia progredida até a região da Carina. A presença da sonda no trato respiratório foi confirmada por sinais clínicos como: desconforto, meneios de cabeça, saída de ar pela extremidade da sonda guia e tosse. Então, a sonda guia foi fixada manualmente e introduzida uma sonda de polietileno, com 85cm de comprimento e 0,3cm de diâmetro, acoplada a uma agulha 40X16 sem bisel. Com uma seringa estéril de capacidade de 60mL, acoplada à sonda de polietileno, foram infundidos de 25 a 40mL de solução salina isotônica comercial estéril e apirogênica e imediatamente aspirados. As aspirações foram realizadas de forma progressiva e repetidamente à medida que a

sonda era retirada. Após a obtenção do lavado, a sonda de polietileno era tracionada para que permanecesse dentro da sonda guia e então, o conjunto removido. O líquido do lavado traqueobrônquico obtido foi acondicionado em tubos de ensaio de polipropileno, com capacidade de 15 ou 50mL, devidamente identificado e armazenado em caixa isotérmica com gelo por no máximo duas horas até o seu processamento.

Avaliação citológica do lavado traqueobrônquico

O líquido do lavado traqueobrônquico foi processado no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, campus de Botucatu, e a realização dos estudos citológicos. O LTB foi centrifugado em tubos de polipropileno tipo Falcon de 14mL, a 3500 rpm, por 6 minutos a 5°C. O sobrenadante foi desprezado até que permanecessem no tubo apenas 0,5mL, composto principalmente pelo *pellet* celular, ressuspenso em volume fixo de 2mL de solução salina isotônica comercial estéril e apirrogênica. A impressão celular de 6 mm de diâmetro em lâminas histológicas de vidro com extremidade fosca foi obtida por meio de citocentrifugação de 200µL do lavado traqueobrônquico a 89xG por cinco minutos. Imediatamente após a citocentrifugação, as lâminas foram fixadas e coradas pelos métodos de Shorr e Panótico rápido, para identificação e contagem celular (Koss 1992). A contagem do número total celular foi realizada em câmara de Neubauer, sem a utilização de corantes. Para isso, o lavado traqueobrônquico acondicionado em tubo de ensaio de polipropileno foi homogeneizado em agitador de tubos, por 10 segundos e a câmara preenchida em seguida. Foram utilizados todos 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) e esse valor encontrado, multiplicado por 10³ para obtenção do valor em células/mL. Foram analisados, para cada animal porcentagens de células epiteliais cilíndricas, células epiteliais ciliadas, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em um total de 200 células contadas em microscópio óptico comum, em aumento de 400 vezes.

Testes de redução do Tetrazólio Nitroazul

Para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos foram empregados os testes de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) estimulado (NBT-E) e o não estimulado (NBT-NE) no máximo duas horas após a colheita, pelo método citotímico descrito por Park e Good (1970), utilizando-se reativo comercial (NBT vial, catalog No. 840-10, Sigma Diagnostic, St. Louis, USA).

Para tal, foram transferidas a tubos eppendorff com capacidade de 0,5mL, partes iguais de sangue e da solução de NBT, sendo 25µL para o teste não estimulado (NBT-NE) e, para o teste estimulado (NBT-E) 25µL acrescidos de 2,5µL de estimulante (extrato bacteriano inativado). Após homogeneização por pipetagem da amostra e reagentes, os frascos foram incubados por dez minutos a 37°C em banho-maria e à temperatura ambiente por outros dez minutos. Imediatamente após, os esfregaços eram confeccionados e corados com Panótico rápido. Para a leitura, foram contados 100 neutrófilos por amostra, em microscópio com aumento de 1000X para ambos os testes, discriminando-se o percentual de células NBT positivas e negativas, conforme a apresentação ou não de formazan intracitoplasmático (NBT reduzido).

Os testes realizados no LBT seguiram mesmo protocolo, porém sendo 50µL para o teste não estimulado (NBT-NE) e, para o teste estimulado (NBT-E) 50µL acrescidos de 5µL de estimulante (extrato bacteriano inativado). Após o término do protocolo, as lâminas eram confeccionadas por citocentrifugação à semelhança do supramencionado e coradas com Panótico rápido.

RESULTADOS

No exame clínico dos animais sadios, as médias da temperatura retal (°C), frequência respiratória (mpm) e frequência cardíaca (bpm) apresentaram-se todas dentro dos valores de referência para a espécie, sendo seus valores respectivamente de $39,2 \pm 0,42$, $36,2 \pm 9,93$ e $74,3 \pm 12,81$.

Os componentes do hemograma: contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular e plaquetas serviram como critérios de seleção dos animais para o experimento. As médias das demais variáveis foram: $336,84 \pm 153,52$ mg/dL de fibrinogênio, $9105,26 \pm 2289,22$ leucócitos totais/µL, $2526,74 \pm 1103,22$ segmentados/µL, $341,80 \pm 446,17$ eosinófilos/µL, $5773,84 \pm 1776,06$ linfócitos/µL, $450,16 \pm 276,81$ monócitos/µL e $12,74 \pm 31,04$ basófilos/µL (Quadro 1).

Os animais submetidos à sondagem nasotraqueal demonstraram resistência ao procedimento, meneios de cabeça, desconforto à passagem da sonda mesmo lubrificada com lidocaína gel, saltos e tentativas de coices e como complicações decorrentes do procedimento e exclusão do experimento, o sangramento nasal e recuperação de volume insuficiente de amostras traqueobrônquicas para processamento. As concentrações individuais do lavado traqueobrônquico variaram de 13.200 a 212.300 células/mL e a média do grupo foi de 62.470 células. Houve predomínio massivo de macrófagos ($93,87\% \pm 5,33\%$), corroborando com os demais autores (Cohen & Rossi 1983, Reynolds 1983, Walker et al. 1985, Leid & Potter 1985, Marcondes et al. 2011). Na

sequência vieram os linfócitos ($1,66\% \pm 5,33$), células epiteliais cilíndricas ($0,71\% \pm 0,90\%$), neutrófilos ($0,63\% \pm 0,74\%$), células epiteliais cilíndricas ciliadas ($0,11\% \pm 0,26\%$) e eosinófilos ($0,03\% \pm 0,11\%$) (Quadro 2).

As porcentagens médias de redução do NBT sanguíneo foram de $12 \pm 10,61\%$ no teste não estimulado e $27,05 \pm 17,49\%$ no teste estimulado. Não foram observados neutrófilos ativos no LTB para ambos os testes (NBT-NE e NBT-E) (Quadro 3).

DISCUSSÃO

Os animais do presente estudo não apresentaram sinais clínicos compatíveis com doenças sistêmicas (Feitosa 2008).

O perfil hematológico e bioquímico do sangue costuma ser utilizado para acessar o estado fisiológico dos animais (Campbell 2004). No presente estudo a realização do hemograma associado à determinação da proteína total e de fibrinogênio plasmático foi útil para confirmação da higidez do grupo, uma vez que todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados mantiveram-se dentro dos valores de referência para a espécie (Jain 1993).

O leucograma é o recurso laboratorial mais comumente utilizado para avaliação dos processos inflamatórios (McSherry et al. 1970, Ek 1972). As médias das variáveis confirmaram a ausência de doença inflamatória sistêmica no grupo.

O teste da redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT) foi um método desenvolvido para a determinação da atividade oxidativa, bem como a detecção de anormalidades do metabolismo fagocítico. Se há redução do NBT no interior dos neutrófilos e consequentes depósitos de formazan intracitoplasmáticos, indica normalidade na ingestão e capacidade bactericida celular (Baehner & Nathan 1968). Bohland e colaboradores (2008) em seu estudo sobre influência do tempo de processamento e resultados do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares bovino, concluíram que o tempo máximo ideal é de 2 horas após a coleta, permanecendo as amostras sanguíneas sob baixas temperaturas. O presente estudo respeitou os preceitos supracitados.

Park e Good (1970) desenvolveram o teste estimulado com extrato bacteriano inativado para diferenciar reações negativas por defeitos metabólicos da ausência de infecção bacteriana ativa. Os animais apresentaram ao teste estimulado (NBT-E) variação de 2 a 55% de respostas neutrofílicas positivas e média de 27%. Comparando-se as porcentagens dos testes, houve aumento dos neutrófilos ativos à presença do extrato bacteriano inativado de aproximadamente 15%. Poli e Mantelli (1974) estudaram, em animais clinicamente sadios de diversas espécies, a capacidade dos neutrófilos reduzirem o NBT. Os valores medianos, para ovinos, do percentual de neutrófilos sanguíneos redutores de NBT encontrado por esses autores foi de 14%. As porcentagens de neutrófilos positivos ao teste não estimulado dos animais do presente estudo variaram de 0 a 38%, sendo a média de 12%, portanto dentro do valor de referência. Entretanto, em experimento com metodologia bastante semelhante, Afonso et al. (2002) encontrou valores medianos de atividade de neutrófilos sanguíneos positivos ao teste de NBT em ovinos de 6% e 10%, sem e com tratamento com monensina sódica respectivamente. Ciarlini (1998) observou a variação de positividade ao mesmo teste de 0 a 56% em ovinos das raças Suffolk e Ideal em diferentes momentos. Camargo e colaboradores (2010) relataram neutrófilos ativos de ovinos sadios entre $8,40\% \pm 4,56\%$ a $11,60\% \pm 3,28\%$ para o teste não estimulado e $9\% \pm 4,35\%$ a $12,8\% \pm 4,14\%$ para o teste estimulado, submetidos à diferentes dietas.

Nos testes de atividade fagocitária, NBT-NE e NBT-E, no LTB, não houve redução do NBT em nenhum dos animais. Ciarlini e colaboradores (2004), afirmam que nos testes colorimétricos de redução do NBT, o processo de lavagem para isolamento dos neutrófilos pode alterar os receptores de membrana responsáveis pela ativação do metabolismo oxidativo, além de tornar a célula isolada isenta da influência de importantes componentes celulares e plasmáticos contidos no sangue total. Muniz-Junqueira e colaboradores (2003) também relatam que o manuseio das células pode interferir diretamente na resposta dos fagócitos frente aos testes de fagocitose ou produção de superóxido. Uma vez que, no presente estudo, as células recuperadas pelo LTB foram manipuladas com o intuito de aumentar a concentração do LTB, ou seja, maior quantidade de células por microlitro, podem ter sofrido alterações na expressão dos receptores na membrana. Porém, a ausência de neutrófilos NBT-redutores era esperada uma vez que os animais além de apresentarem poucas dessas células no recuperado, não manifestavam quaisquer sinais de comprometimento do trato respiratório.

As pesquisas sobre metabolismo oxidativo de neutrófilos pelo uso dos testes de redução do NBT além de escassas e contraditórias, especialmente na espécie ovina, apresentam diferentes particularidades metodológicas, culminando com divergências de resultados.

Concluiu-se que animais sadios apresentam os valores de neutrófilos redutores de NBT, tanto no teste estimulado quanto no espontâneo, dentro dos valores de referência já descritos para a espécie e que não há atividade neutrofílica no LTB de animais que não apresentam comprometimento pulmonar.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao auxílio financeiro (Proc. 2011/09743-0) e a bolsa de estudos de mestrado (Proc. 2010/04254-9) concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

- Afonso, J.A.B.; Ciarlini, P.C.; Kuchembuck, M.R.G.; Kohayagawa, A.; Feltrin, L.P.Z.; Ciarlini, L.D.R.P.; Laposy, C.B.; Mendonça, C.L.; Takahira, R.K. 2002. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de ovinos tratados com monensina sódica e experimentalmente submetidos à acidose ruminal. *Pesq. Vet. Bras.*, 22(4):129-34.
- Amorim, R.M. 2002. Valores séricos e hepáticos de elementos minerais, atividade sérica da ceruloplasmina, hemograma, proteinograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos em bezerros da raça nelore, nascidos de mães com nutrição adequada ou inadequada em cobre e zinco. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 158p.
- Babior, B.M. 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *The New England Journal of Medicine*, 298(13):721-5.
- Baehner, R.L.; Nathan, D.G. 1968. Chronic granulomatous disease. *New England of Journal of Medicine*, Massachussetts, 278:1972-4.
- Beisel, W.R. 1967. Neutrophile alkaline phosphatase changes in tularemia, sandfly fever, Q fever and noninfectious fever. *Blood*, 29:257-68.
- Bohland, E., Sá-Rocha, V.M., Cyrillo, F.C., Benesi, F.J. et al. 2008. Efeito do tempo de conservação de polimorfonucleares do sangue de bezerros sobre o metabolismo oxidativo e a atividade de fagocitose de *Escherichia coli*. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, 45(1):48-56.
- Borges, A.S. 2001. Valores séricos e hepáticos de elementos minerais, determinação da ceruloplasmina sérica, hemograma e metabolismo oxidativo de neutrófilos em novilhas nelore suplementadas com diferentes níveis nutricionais de cobre e zinco. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 141p.
- Camargo, E.V.; Lopes, S.T.A.; Costa, M.M.; Paim, F.; Barbosa, C.S.; Leal, M.L.R. 2010. Neutrophil oxidative metabolism and haemogram of sheep Experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94:e1-6.
- Campbell, T.W. 2004. Clinical Chemistry of Birds, p449-479. In: Thrall, M.A. *Veterinary Hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Ciarlini, P.C. 1998. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos em ovelhas (*Ovis aries* Linnaeus, 1758) naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais ao final da gestação, durante a lactação e após desmame: influência de fatores raciais e hormonais. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista - Botucatu. 204p.
- Ciarlini, P.C., Barros, C. M. Q., Lopes, M. D., Kohayagawa, A., Krause, A., Laposy, C. B. 1997. Leucograma, fibrinogênio plasmático e capacidade bactericida dos neutrófilos de éguas susceptíveis e resistentes as endometrites. *Revista Brasileira de Reprodução Animal, Anais do I Forum Nacional de Equideocultura*, Belo Horizonte, 21(3):123-125.
- Cohen, A.B., Rossi, M. 1983. Neutrophils in normal lungs. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 127:83-9.
- Coles, E.H. 1984. *Patologia Clínica Veterinária*. 3.ed. Manole: São Paulo, p.390-426.
- Ek, N. 1972. The quantitative determination of fibrinogen in normal bovine plasma and in cow with inflammatory conditions. *Acta Vet. Scand.*, 13(2):174-184.
- Feigin, R.D.; Shackelford, P.G.; Choi, S.C.; Flake, K.K.; Franklin, F.A.; Eisnberg, C.S. 1971. Nitroblue tetrazolium die test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. *J. Pediatr.*, 78:230-7.
- Feitosa, F.L. 2008. *Semiologia Veterinária – A Arte do Diagnóstico*. 2.ed. São Paulo: Roca, 424p.
- Fernandes, W.R.; Mori, E.; Sanches, A. 2000. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. *Arq. Bras. Med. Vet.* 52(6).
- Gonçalves, R.C. 1997. Estudo clínico e citológico em bezerros clinicamente sadios e portadores de broncopneumonia moderada e grave - O lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico. Tese de Doutorado em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Botucatu, SP. 87p.
- Gonçalves, R.C.; Mattos, M.C.F.I.; Kuchembuck, M.R.G.; Lopes, S.R.; Borges, A.S. 2004. Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 56(3):307-11.
- Gordon, A.M.; Rowan, R.M.; Beown, T. et al. 1973. Routine application of the nitroblue-tetrazolium test in the clinical laboratory. *J. Clin. Pathol.*, 26(1):52-6.
- Gordon, P.A.; Stuart, J.; Lee, T.R; et al. 1975. The citocentrifuge NBT test. *Journal of Clinical Pathology*, London, 28:674.
- Hewson, J.; Viel, L. 2002. Sampling, Microbiology and Cytology of the Respiratory Tract. In: LEKEUX P. *Equine Respiratory Diseases*. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).
- Jain, N.C. 1993. *Essentials of veterinary hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia 417p.
- Koss, L.G. 1992. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 4. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott.

- Lapossy, C.B.; Lopes, R.S.; Balartin, M.R.S.; Ataíde, D.F.; Takahira, R.K.; Souza, C. 2000. Avaliação hematológica e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de equinos atletas entre 12 e 16 meses de idade. *Veterinária Notícias*, 6(2):25-9.
- Leid, R.W., Potter, K.A. Inflammation and mediators of lung injury. 1985. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 1:377-400.
- Lopes, S.T.A.; Paes, P.R.O.; Kohayagawa, A.; Lopes, R.S.; Langoni, H., Bulla, C., Langrefe, L. 2003. Atividade funcional neutrofílica em cabras com mastite induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetato DL-a-tocoferol). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 55(5).
- Marcondes, J.S.; Martins, M.T.A.; Silva, A.A.; Rodrigues, M.M.P.; Ferreira, D.O.L.; Amorim, R.L.; Dias, A.; Gonçalves, R.C. 2011. Lavado traqueobrônquico por via nasotraqueal como metodologia de colheita de células do trato respiratório de ovinos sadios e portadores de afecções pulmonares. *Pesq. Vet. Bras.*, 31(4):281-286.
- McSherry, B.J., Horney, F.D., Degroot, J.J. 1970. Plasma fibrinogen in normal and sick cows. *Cand. J. Comp. Med.* 34(3):191-197.
- Metcalf, J.A.; Gallin, J.I.; Nauseef, W.M. 1986. Laboratory manual of neutrophil function. New York: Raven Press, 191p.
- Miller, D.R.; Kaplan, H.G. 1970. Decreased Nitroblue Tetrazolium Dye Reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. *Pediatrics*, 45:861.
- Muniz-Junqueira, M.I.; Peçanha, L.M.F.; Silva-Filho, V.L.; Cardoso, M.C.A.; Tosta, C.E. 2003. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(6):1096-102.
- Nathan, D.G. 1974. NBT reduction by human phagocytes. *New England of journal medicine*, Schaumburg, 290(5):280-1.
- Park, B.H.; Good, R.A. 1970. Nitroblue tetrazolium test stimulated. *Lancet*, 19:616.
- Poli, G., Mantelli, F. 1974. II "test" N.B.T. negli animali domestici: valori normali. *Clinica Veterinaria (Milan)*, Milan, 97:241-7.
- Poli, G.; Nicoletti, G.; Faravelli, G. 1973. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. *Folia Vet. Lat.*, 3:215-39.
- Reynolds, H.Y. 1983. Lung inflammation: role of endogenous chemotactic factors in attracting polymorphonuclear granulocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 127:816-24.
- Roth, J.A.; Kaeberle, M.L.; Appel, L.H. Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. 1983. *American journal of veterinary research*, Schaumburg, 44(2):247-53.
- Sara, I.S.; Dwaraknath, P.K. 1977. A note on nitroblue tetrazolium test in normal and diseased animals. *Indian journal animal science*, 47(6):362-4.
- Slauson, D.O.; Lay, J.C.; Castleman, W.L.; Neilsen, N.R. Alveolar macrophage phagocytic kinetics following pulmonary parainfluenza-3 virus infection. 1987. *Journal of Leukocyte biology*, New York, 41:412-20.
- Styrt, B. Species variation in neutrophil biochemistry and function. 1989. *Journal of Leukocyte biology*, New York, 46:63-74.
- Walker, R.D.; Hopkins, F.M.; Schultz, T.W.; McCracken, M.D. 1985. Changes in leukocytes populations in pulmonary lavage fluids after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 46:2429-33.
- Weiss, S.J.; Lobuglio, A.F. 1982. Phagocytic generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Invest.*, 47(1):5-18.
- Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6ª ed. Iwoa: Wiley-Blackwell, 2010. 1206p.
- Wintrobe, M.M. 1939. Diagnostic significance of changes in leukocytes. p.223-39. *Bulletin of the New York academy of medicine*.
- Zinkl, J.G.; Kabbur, M.B. 1997. Neutrophil function. p.285-302. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ª ed. San Diego: Academic Press.
- Zinkl, J.G. In: Cowell, R.L.; Tyler, R.D. 2002. *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2ª ed. St. Luis: Mosby, p.73-75.

Quadro 1 Variáveis leucométricas e fibrinogênio plasmático no sangue periférico de ovinos sadios Botucatu/SP, 2012 (média, desvio padrão, mediana e valores mínimos e máximos)

<i>Variáveis</i>	<i>Fibrinogênio (mg/dL)</i>	<i>Leucócitos totais/μL</i>	<i>Segmentados (μL)</i>	<i>Eosinófilos (μL)</i>	<i>Linfócitos (μL)</i>	<i>Monócitos (μL)</i>	<i>Basófilos (μL)</i>
<i>Média $\pm$ sd¹</i>	336,84 $\pm$ 153,52	9105,26 $\pm$ 2289,22	2526,74 $\pm$ 1103,22	341,80 $\pm$ 446,17	5773,84 $\pm$ 1776,06	450,16 $\pm$ 276,81	12,74 $\pm$ 31,04
<i>Mediana</i>	400	8800	2376	116	5544	414	0
<i>Máximo</i>	600	12400	5390	1776	9394	1023	98
<i>Mínimo</i>	100	4600	1334	0	2852	0	0

¹Sd: Desvio padrão**Quadro 2** Variáveis do lavado traqueobrônquico de ovinos sadios Botucatu/SP, 2012 (média, desvio padrão, mediana e valores mínimos e máximos)

<i>Variáveis</i>	<i>Total de células nucleadas ($\times 10^3$/mL)</i>	<i>Células epiteliais ciliadas (%)</i>	<i>Células epiteliais cilíndricas (%)</i>	<i>Macrófagos (%)</i>	<i>Neutrófilos (%)</i>	<i>Linfócitos (%)</i>	<i>Eosinófilos (%)</i>
<i>Média $\pm$ sd¹</i>	62,47 $\pm$ 47,70	0,11 $\pm$ 0,26	0,71 $\pm$ 0,90	93,87 $\pm$ 5,33	0,63 $\pm$ 0,74	1,66 $\pm$ 5,33	0,03 $\pm$ 0,11
<i>Mediana</i>	49,5	0	0,5	98	0,5	0	0
<i>Máximo</i>	212,3	1	2,5	100	3	23,5	0,5
<i>Mínimo</i>	13,2	0	0	75,5	0	0	0

¹Sd: Desvio padrão**Quadro 3** Valores de atividades neutrofílicas aos testes, estimulado (NBT-E) ou não (NBT-NE), com Tetrazólio Nitroazul no sangue periférico e no lavado traqueobrônquico (LTB) de ovinos sadios Botucatu/SP, 2012 (média, desvio padrão, mediana e valores mínimos e máximos)

<i>Variáveis</i>	<i>NBT-NE sanguíneo</i>	<i>NBT-E sanguíneo</i>	<i>NBT-NE e NBT-E LTB</i>
<i>Média $\pm$ sd¹</i>	12 $\pm$ 10,61	27,05 $\pm$ 17,49	0 $\pm$ 0
<i>Mediana</i>	10	29	0
<i>Máximo</i>	38	55	0
<i>Mínimo</i>	0	2	0

¹Sd: Desvio padrão

Anexo

Anexo – Protocolo de Exame Clínico (ficha individual)

Identificação:				
Raça:	Sexo:	Idade	Escore corporal:	
Parâmetros vitais:	FC: bpm	FR: mpm	Temp: °C	
Atitude:	Mucosas:	Linfonodos:	Estado Nutricional:	
Sistema Respiratório:				
INSPEÇÃO				
Muflo	normal	ressecado		
Narinas	NDN	hiperêmicas		
Secreção nasal	ausente	presente	unilateral	bilateral
	Cor	Aspecto		odor
Ar expirado	unilateral	bilateral		
	normal	diminuído		
Laringe	NDN	hiperêmica	paralisia	ruído laringotraqueal aumentado
Traqueia	NDN	crepitação		
	Reflexo da Tosse:	negativo	positivo	tosse seca
				tosse produtiva
Pulmão	Tipo respiratório:	eupneia	dispneia	inspiratória expiratória mista
Postura	normal	ortopneica		
AUSCULTAÇÃO	Crepitação fina	ausente presente	lado direito 	lado esquerdo 
	Crepitação grossa	ausente presente	lado direito 	lado esquerdo 
	Ronco	ausente	presente	
	Sibilo	ausente presente	lado direito 	lado esquerdo 
	Ruído traqueobrônquico	NDN aumentado	lado direito 	lado esquerdo 
	Ruído broncobronquiolar	NDN aumentado	lado direito 	lado esquerdo 
	Propagação cardíaca	NDN aumentado	lado direito 	lado esquerdo 
	Área de silêncio:	presente ausente	lado direito 	lado esquerdo 
	Roce Pleural	presente ausente	lado direito 	lado esquerdo 
Observações				