

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ESTUDO CLÍNICO, HEMOGASOMÉTRICO E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E
PORTADORES DE PNEUMONIA**

ANDREZA AMARAL DA SILVA

**Botucatu – SP
Fevereiro de 2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ESTUDO CLÍNICO, HEMOGASOMÉTRICO E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E
PORTADORES DE PNEUMONIA**

ANDREZA AMARAL DA SILVA

Tese 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 Doutor 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**

Silva, Andreza Amaral da.

Estudo clínico, hemogasométrico e do estresse oxidativo em ovinos clinicamente saudáveis e portadores de pneumonia / Andreza Amaral da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Capes: 50501062

1. Ovino. 2. Pneumonia - Diagnóstico. 3. Stress oxidativo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Exame clínico; Hemogasometria; Ovino; Pneumonia.

Nome do Autor: Andreza Amaral da Silva

Título: ESTUDO CLÍNICO, HEMOGASOMÉTRICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E PORTADORES DE PNEUMONIA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Simone Biagio Chiacchio

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Raimundo DE SOUZA Lopes

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Fernando José Benesi

Membro

Departamento de Clínica Médica

FMVZ – USP – São Paulo

Prof. Dra. Débora Cristina Damasceno

Membro

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

FMB – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 9 de Fevereiro de 2012

Dedicatória

Aos meus exemplos de vida, **Carlos e Clarice**, que sempre estiveram ao meu lado, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais e minha maior fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

“O verdadeiro amor nunca se desgasta. Quanto mais se dá mais se tem.”

Antoine de Saint-Exupéry

Ao meu noivo **João Paulo**, por trazer tanto encanto e felicidade à minha
vida, como nunca antes! Amo-te!

"Somente quando encontramos o amor, é que descobrimos o que nos faltava na vida."

John Ruskin

Agradecimientos

***D**epois de três anos de caminhada, algumas pessoas muito especiais percorreram esse caminho ao meu lado e é com muita alegria e carinho que as menciono.*

Diante da beleza do universo, de seus mistérios, sua grandeza e complexidade, como não acreditar? Existe amor maior que esse? Obrigada por sua infinita bondade. Serei eternamente grata a você por tudo em minha vida.

Aos animais, por tudo aquilo que serve de cenário para o meu dia-a-dia. Pelas noites mal dormidas dedicadas a vocês, por aumentarem, à sua maneira, meus conhecimentos e por nunca me deixarem esquecer de que enquanto há vida há esperança.

Aos meus pais, Carlos e Clarice, se não fosse por vocês eu certamente não chegaria até aqui. Obrigada por terem feito tudo que estava ao alcance para me ajudar sempre, por me encaminharem na vida com tanto afeto, paciência, respeito e valores. Agradeço-os por me ensinarem, me corrigirem, me incentivarem e, principalmente, me acalmarem. Obrigada pelas palavras incansáveis de carinho e apoio, pela compreensão em função das minhas ausências no dia-a-dia da família, enquanto me debruçava em livros e na pesquisa e, principalmente, por ter clareza das renúncias que vocês fizeram para priorizar a minha vida e educação. Amo vocês demais!

A vida às vezes é engraçada. Nunca beijei um sapo, não dormi por cem anos, nem mordi uma maçã envenenada, mas ganhei um príncipe!! Você acompanhou cada passo dessa caminhada, foi paciente com minhas ausências, falta de tempo, ansiedades e medos, sempre incentivando minha busca por mais conhecimento e maiores possibilidades de crescer na vida. Obrigada por sonhar todos os meus sonhos junto comigo e ajudar a concretizá-los, por me permitir fazer parte de sua vida, por aceitar a mim do jeito que sou e por você ser tudo o que sempre sonhei. A você, João Paulo, entreguei sem hesitar o mais valioso e sublime dos meus sentimentos: o amor!

Agradeço também, de forma muito especial, ao prof. Roberto Calderon Gonçalves, por que a ele devo, não apenas a conclusão dessa tese, mas, sobretudo, o fato de sempre ter sido um incansável e atencioso mestre. Como pesquisador que entende do ofício, que tem paixão pelo conhecimento e que permanentemente acompanha os passos de seus aprendizes, o senhor foi o grande incentivador de minha vontade de pesquisar e aprender. Sou imensamente grata pelo senhor apostar na minha capacidade, desafiar meus limites e por fazer sempre o possível para me oferecer todos os meios e recursos necessários para o desenvolvimento desse trabalho do início ao fim. Obrigada por permitir que durante minha trajetória na pós-graduação eu pudesse desfrutar das faculdades acadêmicas que todos lhe reconhecem: paixão pelo que faz, conhecimento profundo, objetividade e sentido pedagógico. Serei eternamente grata por essa orientação que, felizmente, amadureceu e ultrapassou a tese, transformando-se em uma linda amizade. Não me esqueço aqui da sua esposa, Prof.^a Iracema de Mattos Paranhos Calderon, que sempre ofereceu conselhos e ajuda sendo, mesmo inconscientemente, co-orientadora dos meus passos durante essa jornada. A vocês meu sincero obrigada.

As minhas irmãs, Amanda e Amália, que sempre acreditaram, e continuam acreditando, nos meus sonhos. Obrigada pelo apoio, confiança e valorização do meu trabalho! Saudades de nossas “picuinhas” eternas. Amo você de todo o meu ser!

Agradeço também o afeto, solidariedade e compreensão dos meus familiares. Meu muito obrigada pela compreensão quanto ao afastamento e ausência em momentos especiais em família. Um reconhecimento especial ao meu primo/irmão Bruno da Silva Mendes, sempre presente desde que ingressei na pós-graduação e grande incentivador dos meus sonhos.

Agradeço as pós-graduandas Mayra Teixeira Alas Martins e Carla Maria Vela Ulian, que caminharam junto comigo, aprendendo, errando, fazendo de novo, estabelecendo junto a mim uma passagem significativa de minha vida. Obrigado pelo apoio tanto nos momentos de alegria quanto nos momentos de dificuldades. Durante esses três anos nossas vidas se transformaram, cada uma de nós passou por diferentes tempestades, mas uma sempre foi o alicerce da outra. Dividimos e somamos tudo e o resultado foi nossa bela amizade! Adoro vocês!

Ao time Feminino de Rugby de Botucatu, as eternas “Sanguenuzóio”. Agradeço a acolhida quando todos me deram as costas. Por sempre me arrancarem sorrisos nos maus momentos e me ampararem nas vezes em que fraquejei. Os momentos difíceis que passei em Botucatu foram, sem dúvida, suavizados pela alegria, amizade, carinho e apoio de todas vocês. Muito obrigada!

Aos pós-graduandos Mayra Teixeira Alas Martins e Danilo Otávio Laurenti Ferreira pela ajuda na fase de colheitas de amostras, pelos momentos de descontração a campo e na “salinha” e por fazerem parte da minha história na pós-graduação. Sem a ajuda de vocês a conclusão desse trabalho seria impossível.

Ao Prof. Adriano Dias, meus agradecimentos pela disposição em discutir o projeto, bem como por sua contribuição na análise estatística dos resultados.

Meu agradecimento vai também aos Docentes do Departamento de Clínica Veterinária desta faculdade, em especial aos professores Alexandre Secorun Borges, Rogério Martins Amorim, Roberto Calderon Gonçalves e Simone Biagio Chiacchio. Obrigada pela acolhida, convivência, oportunidade e pelos saberes que me foram transmitidos.

Por gentilmente ter cedido o seu laboratório para que eu pudesse colocar os equipamentos utilizados em meu experimento e realizar a análise bioquímica de minhas amostras, meu sincero obrigada vai, mais uma vez, ao prof. Alexandre Secorun Borges.

A Profa. Débora Cristina Damasceno, pela disposição em me ajudar sempre que solicitada e pelos valiosos conhecimentos transmitidos sobre metabolismo oxidativo. Meu sincero obrigada.

As professoras Maria Lúcia Gomes Lourenço e Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães, duas agradáveis e inesperadas surpresas no meu último ano de Doutorado. Quando me aproximei de vocês não achava que encontraria tanto carinho aliado a tanto conhecimento e desejo de compartilhá-lo. Obrigada pelo afeto, incentivo e entusiasmo com que me receberam no Departamento de Clínica Veterinária. Nosso convívio foi muito especial e sei que, mesmo involuntariamente, vocês me ajudaram muito a concluir mais esta etapa da minha vida.

Aos alunos de graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP das disciplinas de Semiologia e Clínica das Intoxicações e Plantas Tóxicas. Obrigada por reafirmarem meu gosto pela Docência, me fazerem perceber que estou no rumo certo e ela compreensão de ter uma professora em término de doutorado.

Ao Marco Antônio Simão da Silva e César Leme da Silva, funcionários do Serviço de Clínica de Grandes Animais desta Faculdade, pelo imprescindível auxílio sempre que solicitado.

Aos residentes do Serviço de Clínica de Grandes Animais desta Faculdade pela ajuda prestada em diversos momentos e pelas horas de descontração, principalmente durante o almoço.

Meu reconhecimento, feito com amizade, vai também para Marlene Dias Camargo e Izabel Cristina Castro, secretárias do Departamento de Clínica Veterinária. Com simpatia e atenção, vocês sempre

estiveram à disposição para me ajudar, sendo imprescindíveis para a conclusão desse projeto. Meu sincero obrigada.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP, seus professores e toda equipe pela oportunidade de aprendizados e experiências. Um agradecimento especial ao supervisor da Seção de pós-graduação José Roberto de Lala Júnior, pela gentileza e por sempre responder prontamente às minhas dúvidas.

Ao Departamento de Clínica Veterinária e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP, que me receberam de forma acolhedora tornando-se a extensão de minha casa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio Financeiro à Pesquisa e pela Bolsa de Estudos concedida, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta história, mas que minha memória pouco privilegiada me impediu de lembrar.

Epígrafe

"No semblante de um animal que não fala, há todo um discurso que somente um espírito sábio pode realmente entender."

Mahatma Gandhi

Lista de Tabelas, Figuras e Abreviaturas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Idade, sexo e peso de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) (média e desvio padrão).....	31
Tabela 2	Médias (M), desvios padrão (sd), medianas e valores máximos e mínimos das variáveis temperatura (°C), frequência respiratória e frequência cardíaca de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....	32
Tabela 3	Frequências, percentuais e valores de p dos sinais clínicos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....	33
Tabela 4	Ocorrência dos sinais clínicos nos portadores de pneumonia do grupo G2.....	34
Tabela 5	Resultado da análise das variáveis hematológicas no sangue periférico de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) (média, desvio padrão e valor de p).....	35
Tabela 6	Resultado da análise das variáveis Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Total (GSH-t), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) (mediana, máximo, mínimo e valor de p).....	36

Tabela 7	Resultado da análise das variáveis hemogasométricas pressão arterial de oxigênio (PaO ₂), pressão arterial de gás carbônico (PaCO ₂), pressão do hidrogênio (pH), bicarbonato (HCO ₃ ⁻), dióxido de carbono total (TCO ₂), excesso de bases (EB) e saturação de oxigênio (SO ₂) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) (mediana, máximo, mínimo e valor de p).....	37
-----------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Mediana e valores máximo e mínimo da variável Superóxido Dismutase (SOD) em eritrócitos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....38
- Figura 2** Mediana e valores máximo e mínimo da variável Glutathione Total (GSH-t) em eritrócitos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....38
- Figura 3** Mediana e valores máximo e mínimo da variável Glutathione Peroxidase (GSH-Px) em eritrócitos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....39
- Figura 4** Mediana e valores máximo e mínimo da variável Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em eritrócitos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....39
- Figura 5** Mediana e valores máximo e mínimo da variável pH no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).40
- Figura 6** Mediana e valores máximo e mínimo da variável Pressão Arterial do Oxigênio (PaO₂) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....40
- Figura 7** Mediana e valores máximo e mínimo da variável Pressão Arterial do Gás Carbônico (PaCO₂) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....41

Figura 8	Mediana e valores máximo e mínimo da variável Bicarbonato (HCO_3^-) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....	41
Figura 9	Mediana e valores máximo e mínimo da variável Dióxido de Carbono Total (TCO_2) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....	42
Figura 10	Mediana e valores máximo e mínimo da variável Excesso de Bases (BE) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....	42
Figura 11	Mediana e valores máximo e mínimo da variável Saturação de Oxigênio (SO_2) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

bpm	Batimentos por Minuto
°C	Graus Celsius
CAT	Catalase
CO₂	Dióxido de Carbono
CuZnSOD	Cobre-Zinco Superóxido Dismutase
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EB	Excesso de Bases
ECSOD	Superóxido Dismutase Extracelular
EDTA	Ácido Etilenodiamida Tetracético
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
FB	Fibrinogênio
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
G1	Grupo Um
G2	Grupo Dois
GSH	Glutathiona Reduzida
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GSH-Rd	Glutathiona Redutase
GSH-t	Glutathiona Total
GSSG	Glutathiona Oxidada
HCO₃⁻	Bicarbonato
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IL-1	Interleucina Um
IL-1β	Interleucina Um beta
IL-6	Interleucina Seis
MDA	Malonaldeído
MnSOD	Manganês Superóxido Dismutase
mpm	Movimentos por Minuto

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Radical Superóxido
OH[•]	Radical Hidroxila
ORVA	Obstrução Recorrente das Vias Aéres
PaCO₂	Pressão Arterial de Dióxido de Carbono
PaO₂	Pressão Arterial de Oxigênio
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
pH	Hidrogeniônico
PT	Proteína Total
PPT:FB	Relação Proteína Total:Fibrinogênio
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao ácido Tiobarbitúrico
TCO₂	Dióxido de Carbono Total
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
SO₂	Saturação de Oxigênio

Sumário

SUMÁRIO

	Páginas
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>xii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>xiv</i>
<i>Lista de Siglas e Abreviaturas</i>	<i>xvi</i>
<i>Resumo</i>	<i>xxi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xxiii</i>
1. Introdução	2
2. Revisão de Literatura	6
2.1. <i>Pneumonia em ovinos</i>	<i>6</i>
2.2. <i>Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) e estresse oxidativo</i>	<i>9</i>
2.3. <i>Resposta inflamatória, estresse oxidativo e injúria pulmonar</i>	<i>12</i>
2.4. <i>Avaliação da função pulmonar</i>	<i>14</i>
3. Objetivos	18
4. Material e Métodos	20
4.1. <i>Animais e grupos experimentais</i>	<i>20</i>
4.2. <i>Exame clínico</i>	<i>20</i>
4.3. <i>Colheita das amostras de sangue</i>	<i>21</i>
4.4. <i>Análises laboratoriais</i>	<i>22</i>
4.4.1. <i>Avaliação hematológica</i>	<i>22</i>
4.4.2. <i>Biomarcadores do metabolismo oxidativo</i>	<i>22</i>
4.4.2.1. <i>Processamento das amostras de sangue</i>	<i>22</i>
4.4.2.2. <i>Análise bioquímica</i>	<i>23</i>
4.4.3. <i>Hemogasometria</i>	<i>25</i>
4.5. <i>Análise estatística</i>	<i>25</i>
5. Resultados	27
6. Discussão	45
7. Conclusão	66
8. Referências Bibliográficas	68
9. Artigo Científico	91

Resumo e Abstract

SILVA, A.A. **Estudo clínico, hemogasométrico e do estresse oxidativo em ovinos clinicamente sadios e portadores de pneumonia.** Botucatu, 2012. 124p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RESUMO

Nas espécies domésticas as pneumonias cursam com intensa resposta inflamatória e acúmulo de células fagocíticas nos pulmões, levando a danos expressivos das estruturas do trato respiratório e à função pulmonar devido ao estresse oxidativo decorrente da liberação de grandes quantidades de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) durante a explosão respiratória. O objetivo deste estudo foi analisar o *status* oxidativo, a resposta inflamatória e a gasometria arterial, de ovinos sadios (n=20) e com diagnóstico clínico de pneumonia (n=20). Inicialmente os animais foram submetidos ao exame clínico e divididos em dois grupos: I) G1/controle, composto pelos animais clinicamente sadios e II) G2, composto pelos animais portadores de pneumonia. O *status* oxidativo foi avaliado por determinação indireta da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e das concentrações de Glutathione total (GSH-t) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no sangue periférico por método colorimétrico. A resposta inflamatória foi avaliada pelo hemograma e proteína total e fibrinogênio plasmáticos e a função pulmonar pela determinação das variáveis hemogasométricas Pressão Arterial de Oxigênio (PaO₂), Pressão Arterial de Gás Carbônico (PaCO₂), Hidrogeniônico (pH), Saturação de Oxigênio (SO₂), Bicarbonato (HCO₃⁻), Dióxido de Carbono Total (TCO₂) e Excesso de Bases (EB), avaliados em sangue arterial. O leucograma revelou leucocitose com neutrofilia, eosinofilia, monocitose e linfopenia nos animais doentes (p<0,05). Com relação aos parâmetros bioquímicos, os ovinos portadores de pneumonia apresentaram aumento significativo (p>0,05) da concentração de fibrinogênio e proteína plasmática total. Os animais portadores de pneumonia apresentaram diminuição estatisticamente significativa (p<0,05) na atividade enzimática da SOD e GSH-Px e na concentração GSH-t, enquanto que a concentração de TBARS mostrou-se

significativamente elevada ($p<0,05$). Com relação à gasometria arterial houve aumento significativo ($p<0,05$) das variáveis PaCO_2 , HCO_3^- , TCO_2 e BE e diminuição significativa do pH ($p<0,05$) nos animais portadores de pneumonia. Estes resultados demonstram a ocorrência de estresse oxidativo e peroxidação lipídica em ovinos portadores pneumonia associados à reação inflamatória, sem, contudo, causar danos significativos à função de oxigenação pulmonar.

Palavras-chave: pneumonia, ovino, exame clínico, hemogasometria, estresse oxidativo

SILVA, A.A. **Clinical, homogasometric and oxidative stress evaluation of healthy and pneumonic sheep**. Botucatu, 2011. 124p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

ABSTRACT

In domestic species, pneumonia is accompanied by intense inflammatory response and accumulation of phagocytic cells in the lungs, causing structural damage of the respiratory tract due to oxidative stress resulting from the release of large amounts of Reactive Oxygen Species (ROS) during the respiratory burst. The aim of this study was to analyze the oxidative status, inflammatory response and arterial blood gases values in healthy sheep (n=20) and animals with a clinically diagnosed pneumonia (n = 20). After physical examination the animals were divided into two groups: i) G1/control, composed of clinically healthy animals and ii) G2, composed of animals with pneumonia. The oxidative status was assessed by indirect determinations of enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and concentrations of total glutathione (GSH-t) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in peripheral blood by a colorimetric method. The inflammatory response was evaluated by complete blood count and total protein and plasma fibrinogen. The lung function was evaluated by determinations of blood gas parameters in arterial blood: Oxygen Pressure (PaO₂) Pressure of Carbon Dioxide (PaCO₂), Pressure Hydrogen (pH), Oxygen Saturation (SO₂), Bicarbonate (HCO₃⁻), Total Carbon Dioxide (TCO₂) and Base Excess (EB). The leucogram results showed Leukocytosis with neutrophilia, eosinophilia, monocytosis and lymphopenia in sick animals (p<0,05). With regard to biochemical parameters, sheep with pneumonia showed a significant increase (p<0,05) of fibrinogen and total plasma protein concentrations. The animals from group G2 had a statistically significant reduction (p<0,05) in SOD and GSH-Px enzymatic activity and GSH-t concentration, while TBARS concentration was significantly higher (p<0,05). Arterial blood gas analysis showed significant increase (p<0,05) of PaCO₂, HCO₃⁻, TCO₂ and BE, and significant pH decreased (p<0.05) in sheep with pneumonia. These results

demonstrate the occurrence of oxidative stress and lipid peroxidation in pneumonic sheep associated with inflammation, however, without causing significant damage to lung function.

Key words: pneumonia, sheep, clinical examination, blood gas analysis, oxidative stress

Introdução

1. Introdução

O estado de São Paulo vem ganhando evidência no cenário do agronegócio nacional como grande pólo da cadeia produtiva ovina, onde esta atividade ressurgiu como solução econômica para os pecuaristas de pequeno e médio porte. Nos últimos anos o que tem se verificado é não só o aumento do efetivo de rebanhos, mas também da qualidade genética dos animais e número de produtores envolvidos com essa atividade. A causa principal desse entusiasmo é que o brasileiro começa a descobrir a carne de cordeiro e o aumento do consumo viabiliza a modernização dos sistemas produtivos com enfoque na produção de carnes de qualidade. Nesse contexto, a busca do produtor por ganhos rápidos de produtividade acaba acarretando em acréscimo do número de animais mantidos em confinamento e maior trânsito entre as propriedades, gerando aumento dos índices de doenças, especialmente as respiratórias, nesta espécie.

As doenças respiratórias são comuns na espécie ovina e consideradas um sério problema de sanidade na ovinocultura. A ocorrência destas enfermidades, geralmente está associada à perdas econômicas significativas devido à menor conversão alimentar, retardo no ganho de peso e despesas com diagnóstico e tratamento (AL-SULTAN e AITKEN, 1984; KIMBERLING, 1988; RAO et al., 1993; DIMRI et al., 1994; GONÇALVES et al., 2011). Além disso, os índices de mortalidade são elevados, chegando a 40% e 17% em animais adultos e durante o período neonatal, respectivamente (ROOK et al., 1990; BLANCO et al., 1993).

Nos ovinos a doença respiratória parece ser precedida por desequilíbrio na tríade de interação entre um ou mais agentes infecciosos, especialmente vírus e bactérias, o sistema de defesa do hospedeiro e o ambiente, e é caracterizada por intensa resposta inflamatória frente à infecção instalada (BOWLAND e SHEWEN, 2000; GONÇALVES et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002). Entre as enfermidades respiratórias que acometem a espécie ovina, as pneumonias são as mais freqüentes e de maior importância (RADOSTITS et al., 2002).

A resposta inflamatória ocorrida durante a pneumonia é fundamental para a efetiva eliminação dos agentes infecciosos. No entanto, o controle da inflamação é igualmente importante para a prevenção de lesão tecidual excessiva mediada pelos leucócitos (STANDIFORD et al., 1996). A migração e ativação dos leucócitos em tecidos inflamados são reguladas por uma complexa rede de interações entre as citocinas, leucócitos, endotélio vascular, moléculas de adesão celular e fatores quimiotáticos circulantes (MALAZDREWICH et al., 2001). O combate dos agentes infecciosos pelos macrófagos e neutrófilos após a fagocitose se dá, principalmente, por ação das proteases e Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) liberadas durante a explosão respiratória, sendo que as ERO são determinantes para o potencial germicida dessas células (MARRIOT et al., 2008).

O aumento excessivo na produção de ERO desencadeado pela reação inflamatória durante a pneumonia, acompanhado da insuficiência do sistema de defesa antioxidante levam ao estresse oxidativo e, consequentemente, injúria tecidual e celular (FARKHUTDINOV e FARKHUTDINOV, 2000). As células do trato respiratório, em especial os pneumócitos tipo II, são particularmente sensíveis aos efeitos deletérios das ERO, e passam a liberar mediadores inflamatórios em resposta à exposição excessiva. Vale ressaltar ainda que as ERO atuam também como mediadores inflamatórios, potencializando a resposta inflamatória (RAHMAN e MACNEE, 2000). Isso se perpetua em um ciclo vicioso, com recrutamento de novas células inflamatórias que produzem mais ERO e mediadores inflamatórios, levando a profundos prejuízos ao trato respiratório, se esse processo não for adequadamente controlado (CHOW et al., 2003; ACKERMANN et al., 2004).

Em geral, os prejuízos provocados pelas ERO são resultado de sua ação direta sobre as estruturas pulmonares, particularmente células epiteliais, endotélio vascular e membrana alvéolo-capilar, culminando com severo comprometimento da função pulmonar, refletido principalmente na restrição das trocas gasosas (MILLS e HIGGINS, 1997). Portanto, as ERO não só favorecem a manutenção do processo inflamatório no trato respiratório durante a pneumonia como também contribuem para o declínio das funções fisiológicas normais do aparelho respiratório, favorecendo a ocorrência da doença clínica.

A pneumonia está intimamente associada à intensidade da resposta inflamatória e aos danos, diretos e indiretos, ao trato respiratório decorrentes da liberação de ERO (FARKHUTDINOV e FARKHUTDINOV, 2000). Admitindo-se que as ERO também atuam como mediadores da resposta inflamatória, é possível que a manutenção do estresse oxidativo nas vias aéreas contribua para o agravamento da inflamação e, conseqüentemente, para o maior comprometimento da função pulmonar. Apesar disso, pouquíssimos são os estudos na literatura que relacionam estresse oxidativo e animais portadores de pneumonia, todos eles limitados à espécie bovina (LEDWOZYW e STOLARCZYK, 1992; AL-QUDAH, 2009).

Monitorar os efeitos do estresse oxidativo na modulação/regulação da resposta inflamatória e função pulmonar contribuirá para o entendimento da patogênese da doença nesta espécie, pré-requisito necessário para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas que amenizem ou evitem lesões pulmonares durante a pneumonia. Vale destacar ainda a possibilidade de se estudar marcadores biológicos que poderão contribuir para avaliar melhor os efeitos dos procedimentos terapêuticos e estabelecer prognósticos mais precisos.

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1. Pneumonia em ovinos

Nas espécies domésticas a pneumonia é uma doença multifatorial, ocorrendo sempre que existe uma determinada combinação de fatores de risco, ou seja, todas as vezes que condições ambientais desfavoráveis e práticas de manejo inadequadas se somem para, simultaneamente, provocar falhas nos mecanismos de defesa dos animais e sobrecarregar os pulmões com agentes infecciosos (bactérias, vírus e micoplasmas) (BROGDEN et al., 1998; LACASTA et al., 2008). Na ovinocultura, as pneumonias podem resultar em prejuízos econômicos significativos devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, conversão alimentar ineficiente, retardo no crescimento e ganho de peso, condenações de carcaças e custos com medicamentos e assistência veterinária (RUSVAI e FODOR, 1998). Um estudo realizado na Nova Zelândia mostrou que perdas devido à pneumonia giram em torno de US\$ 32,4 milhões, e o custo médio com a doença por cordeiro seria da ordem de US\$1,36 a 3,31 (GOODWIN-RAY et al., 2008).

As pneumonias de origem infecciosa são as mais freqüentes em ovinos (PUGH, 2005). As bactérias *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*; os micoplasmas *Mycoplasma ovipneumoniae* e *M. arginini* (PUGH, 2005; RADOSTITS et al, 2002); e os Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Vírus da Parainfluenza tipo 3 (PI-3) (LEHMKUHL e CUTLIP, 1981), Adenovírus Ovino 6 (AVO-6), Herpes Vírus Ovino e o Lentivírus não-oncogênico da família

retroviridae, também, conhecido como Maedi (PUGH, 2005) são os principais microrganismos encontrados, muitas vezes em sinergismo.

Nos animais domésticos as pneumonias podem ser classificadas em quatro tipos morfológicos distintos: pneumonia embólica, pneumonia granulomatosa, pneumonia intersticial e broncopneumonia, sendo que as duas últimas perfazem a maioria dos casos da doença na espécie ovina. Os critérios usados para classificação são baseados nas alterações morfológicas, incluindo distribuição, textura, cor e aspecto do pulmão afetado. Usando essa classificação, é possível prever com algum grau de segurança a possível etiologia (vírus, bactéria, fungos, parasitas), porta de entrada (aerógena *versus* hematógena) e, caso o animal sobreviva, possíveis seqüelas para cada um desses tipos. No entanto, sobreposições desses quatro tipos de pneumonia são possíveis, e dois tipos morfológicos distintos podem estar presentes no mesmo pulmão (CARLTON e McGAVIN, 1998).

Basicamente, as pneumonias são provocadas pela reação inflamatória decorrente da penetração do agente infeccioso no trato respiratório posterior. O processo pelo qual a doença se desenvolve varia entre os agentes e sua virulência, bem como a porta de entrada da infecção. Quando bactérias são introduzidas por via aerógena provocam bronquite/bronquiolite primária aguda que se dissemina até envolver o parênquima pulmonar circundante. A disseminação da lesão inflamatória pelos pulmões ocorre por contiguidade, mas também pela passagem de material infeccioso por bronquíolos e vasos linfáticos. A propagação nas vias aéreas, por sua vez, é favorecida pela tosse. O resultado final de todo esse processo é a ocorrência de lesões pulmonares com características que podem variar de fibrinosas a necrosantes, caseosas e/ou granulomatosas. Quando a infecção bacteriana ocorre por via hematógena resulta em vários focos sépticos que podem evoluir para abscessos pulmonares. A pneumonia ocorre quando os abscessos se rompem no interior das vias aéreas, disseminando-se como broncopneumonia secundária (RADOSTITS et al., 2002).

Geralmente introduzidos por inalação, os vírus causam bronquiolite primária, disseminação para os alvéolos, hipertrofia e proliferação do epitélio alveolar e edema, culminando com espessamento do tecido intersticial e agregados linfocíticos ao redor de alvéolos, vasos sanguíneos e bronquíolos

(VALARCHER e HÄGGLUND, 2006). A fisiopatologia da pneumonia, independente do modo como se desenvolve a lesão, está embasada na interferência das trocas gasosas entre o ar alveolar e o sangue, levando a hipóxia e hipercapnia, o que provoca taquipnéia ou dispnéia na dependência da quantidade de tecido respiratório lesado (REBHUN, 2000; RADOSTITS et al., 2002).

Os sinais clínicos variam em função do grau de comprometimento pulmonar. A broncopneumonia é acompanhada por tosse úmida e dolorosa. Na pneumonia intersticial, a tosse é freqüentemente seca, estridente e curta. A auscultação do tórax antes e após a tosse pode revelar sons crepitantes e áspero sugerindo a presença de exsudato nas vias aéreas (HINCHCLIFF e BYRNE, 1991; GONÇALVES et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002). A observação de taquipnéia, dispnéia mista, sons submaciços ou maciços à percussão e a auscultação de áreas aumentadas de ruído traqueobrônquico, broncobronquiolar rude e área de silêncio são sinais mais específicos de comprometimento do parênquima pulmonar (BELKNAP, 1993; CRANDELL, 1993; GONÇALVES et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002). A deposição de secreções espessas nas vias aéreas determina modificações no fluxo de ar, que provocam vibrações que geram tons mais graves, denominadas roncosp (KOTTLIKOFF e GILLESPIE, 1984; GONÇALVES et al., 2001), ou mais agudos, nomeados sibilos (KOTTLIKOFF e GILLESPIE, 1984; STÖBER, 1993; GONÇALVES et al., 2001), identificando as bronquites (STÖBER, 1993). Secreção nasal pode ou não estar presente conforme a quantidade de exsudato nos brônquios e a existência ou não de inflamação do trato respiratório superior (WILSON e LOFSTEDT, 1990; STÖBER, 1993; GONÇALVES et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002). O odor do ar expirado respiração pode ser fétido (ou pútrido) devido ao cheiro de pus e tecidos em decomposição em grandes quantidades nas vias aéreas. Os achados clínicos incluem ainda inapetência, depressão, febre, relutância em se movimentar e evidência de dor torácica que pode estar associada à pleurite concomitante (RADOSTITS et al., 2002).

O diagnóstico das pneumonias é baseado principalmente no exame físico, associado ou não a exames auxiliares, como radiológico, ultrassonográfico, endoscópico, histopatológico, citológico, microbiológico,

imunológico e hematológico (RADOSTITIS et al., 2002; ROCHA, 2006, GONÇALVES e FEITOSA, 2008). O tratamento por sua vez é baseado no controle da infecção com terapia antimicrobiana, na manutenção da pressão intrapleurar, do fluxo de ar nas vias aéreas e dos mecanismos de limpeza traqueobrônquicos, além da conservação das trocas gasosas e a remoção de agentes irritantes. Vários recursos podem ser utilizados na tentativa de aumentar os índices de cura e reduzir os prejuízos, normalmente associando medicamentos para aliviar os sintomas, diminuir a inflamação e combater as infecções (MAZZUCHELLI et al., 1995).

2.2. Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) e estresse oxidativo

As espécies reativas do oxigênio (ERO) são compostos altamente reativos derivados do metabolismo do oxigênio molecular, representados principalmente pelo radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; MOLINA, 2003; SORDILHO e AITKEN, 2009; SILVA e GONÇALVES, 2010). A principal via de metabolismo do oxigênio no organismo envolve a sua completa redução em água, incorporando quatro elétrons ao final da cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria. Se houver, ao longo da cadeia respiratória, redução do oxigênio com número menor de elétrons haverá produção de ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; SILVA e GONÇALVES 2010). Embora a cadeia de transporte de elétrons seja reconhecidamente o principal sítio de produção de ERO, outras diferentes fontes podem produzir estes agentes oxidantes, como por exemplo as células fagocíticas, os peroxissomas e as enzimas do sistema Citocromo P450 (WRIGHT et al., 1994; ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

Sob condições normais, o balanço entre os antioxidantes e as ERO é suficiente para garantir o bom funcionamento do organismo. Entretanto, um acréscimo nos agentes oxidantes ou um decréscimo no sistema antioxidante pode destruir este equilíbrio. Esse estado de desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo, condição em que são afetadas moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, e que está associado a diversas enfermidades das vias aéreas (WRIGHT et al., 1994;

HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; KIRSCHIVINK e LEUKEUX, 2005; VALKO et al., 2007; SILVA e GONÇALVES, 2010).

A oxidação de proteínas funcionais e/ou estruturais, lipídios e carboidratos pelas ERO pode provocar mudanças físicas nesses compostos, o que consequentemente levará a uma série de alterações nas funções celulares. O transporte de substâncias nas membranas plasmáticas e intracelulares, o controle de vias metabólicas e o reconhecimento de substâncias nos receptores de membrana podem ficar comprometidos (WRIGHT et al., 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; KIRSCHIVINK e LEUKEUX, 2005; VALKO et al., 2007; SILVA e GONÇALVES, 2010). Além disso, as ERO podem danificar o ácido desoxirribonucleico (DNA), causando quebra e modificações nas bases purínicas e pirimidínicas e também nos açúcares desoxirribose, levando a alterações na expressão gênica, mutação e apoptose celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; VALKO et al., 2007; SILVA e GONÇALVES, 2010).

De todas as ações deletérias associadas ao estresse oxidativo, a oxidação das membranas celulares talvez seja a que tenha maior impacto. As ERO quando geradas próximas de membranas celulares podem provocar a oxidação de seus ácidos graxos, evento conhecido como peroxidação lipídica, acarretando em inativação de receptores, perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas à célula no espaço extracelular, lesando tecidos adjacentes (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; SORDILLO e AITKEN, 2009; SILVA e GONÇALVES, 2010).

A produção de ERO durante o metabolismo do oxigênio exige o desenvolvimento de defesas antioxidantes para remover os intermediários reativos do oxigênio antes que eles causem danos, mantendo a homeostase entre a produção e a eliminação de ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; SORDILLO e AITKEN, 2009; SILVA e GONÇALVES, 2010). De modo geral, os agentes antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos. Os enzimáticos constituem a primeira linha de defesa endógena no combate as ERO, e incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione redutase (GSH-Rd) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; SILVA e GONÇALVES, 2010).

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas que tem a função de proteger as células aeróbicas contra a ação do $O_2^{\bullet-}$. Em meio aquoso, ela catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e oxigênio (O_2) com extrema rapidez, aproximadamente 10 milhões de vezes mais rápido que a dismutação espontânea não enzimática ($O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$). Nos mamíferos, três tipos distintos de SOD são conhecidos: i) a cobre-zinco SOD (CuZnSOD), presente principalmente no citoplasma e em algumas organelas denominadas peroxissomas; ii) a manganês SOD (MnSOD), que contém manganês em seu sítio ativo e é sintetizada inicialmente no citoplasma e transportada para o interior da matriz mitocondrial e a iii) SOD extracelular (ECSOD), que também possui cobre e zinco em sua estrutura e está presente apenas no meio extracelular (OLSZEWER, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BOWIER e CAPRO, 2002; DAMASCENO et al., 2002; KINNULA e CAPRO, 2003; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; RAHMAN et al., 2006). No aparelho respiratório a SOD é encontrada no epitélio dos brônquios, alvéolos, nos fibroblastos, macrófagos alveolares, arteríolas e nas células do endotélio capilar dos pulmões (SILVA e GONÇALVES, 2010).

A CAT é uma metaloproteína que catalisa a decomposição do H_2O_2 , formado pela ação da SOD, em H_2O e O_2 ($2 H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2 H_2O + O_2$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; RAHMAN et al., 2006). Tem afinidade apenas por moléculas de baixo peso molecular, tais como o H_2O_2 , não metabolizando moléculas grandes como os hidroperóxidos lipídicos, produtos da peroxidação lipídica (COMHAIR e ERZURUM, 2002). Atua de forma complementar ao sistema antioxidante das glutations, sendo mais eficiente que este em altas concentrações de H_2O_2 . No aparelho respiratório a CAT se concentra nas vias aéreas posteriores, principalmente no interior de macrófagos alveolares, pneumócitos tipo II e células Clara (CANTIN, et al., 1990; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; KINULLA, 2005; RAHMAN et al., 2006; SILVA e GONÇALVES, 2010).

O ciclo redutor da glutatona é o principal mecanismo de remoção de hidroperóxidos, lipoperóxidos e, assim como a CAT, do H_2O_2 . As enzimas que participam do ciclo incluem a glutatona peroxidase (GSH-Px) e a glutatona redutase (GR). A GSH-Px é uma enzima que contém selênio em seu sítio ativo

e é responsável pela redução dos peróxidos, utilizando glutathione reduzida (GSH) como substrato doador de elétron, transformando-a em glutathione oxidada (GSSG) ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{ GSH} \xrightarrow{\text{GSH-Px}} 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{GSSG}$). Uma vez oxidada, a GSSG é convertida em GSH pela GSH-Rd ($\text{GSSG} + 2 \text{ H} \xrightarrow{\text{GSH-Rd}} 2 \text{ GSH}$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002; KINULLA, 2005; SILVA e GONÇALVES, 2010). A GSH-Px e a GSH-Rd estão presentes no citoplasma e nas mitocôndrias das células do epitélio das vias aéreas, macrófagos alveolares e outras células pulmonares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; RAHMAN et al., 2006; SILVA e GONÇALVES, 2010).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos podemos destacar as vitaminas E e C, GSH, carotenos, ácido úrico e proteínas quelantes de metais de transição (SABAT et al., 2008). Apesar da defesa antioxidante básica oferecida pelas enzimas antioxidantes, a variação individual nos teores de cada uma dessas enzimas mostra-se importante no agravamento das doenças relacionadas aos agentes oxidantes (KINNULA e CRAPO, 2003).

Considerável atenção tem sido dada ao papel das ERO na patogênese de doenças pulmonares nas espécies animais, inclusive na pneumonia (AL-QUDAH, 2009). O contato direto das vias aéreas com o oxigênio atmosférico, as altas concentrações de substratos oxidáveis como ácidos graxos insaturados e proteínas, a disponibilidade de catalisadores de oxidação como macrófagos, além de sua grande área de superfície e suprimento sanguíneo, fazem com que o impacto do aumento na produção de ERO no interior do trato respiratório seja ainda mais relevante (KINULA et al., 1995).

2.3. Resposta inflamatória, estresse oxidativo e injúria pulmonar

A inflamação, como uma importante resposta de proteção do organismo às injúrias celulares e teciduais, implica em uma série de processos para destruir e remover o agente causador, juntamente com células e tecidos danificados, auxiliando assim na recuperação tecidual (RAHMAN e MACNEE, 2000). Uma característica comum a todas as doenças do trato respiratório é o envolvimento de uma resposta imune inflamatória, caracterizada pela ativação de células endoteliais, células epiteliais, e macrófagos alveolares, bem como o recrutamento e ativação de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. A

intensidade em que isto ocorre e os tipos celulares envolvidos variam muito entre as diferentes doenças respiratórias (VAN DER VLIET e CROSS, 2000).

Os macrófagos alveolares respondem aos desafios diários de agentes infecciosos que penetram nas vias aéreas terminais desencadeando uma reação inflamatória local (DELCLAUX e AZOULAY, 2003). Se o desafio infeccioso é muito grande ou muito virulento a ponto de não ser contido pelos macrófagos há ativação da resposta inflamatória aguda em nível sistêmico. Uma das primeiras manifestações é a ativação do endotélio pulmonar e de macrófagos (alveolares e intersticiais), aumento da expressão de moléculas de adesão celular e produção de citocinas que induzem o seqüestro em massa de células fagocíticas, sobretudo neutrófilos, provenientes da microvasculatura pulmonar (CHOW et al., 2003; DELCLAUX e AZOULAY, 2003).

Como componente importante da resposta inflamatória, as células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos) atraídas até o sítio da inflamação utilizam um arsenal de ERO e outras substâncias tóxicas liberadas durante a explosão respiratória para combater os agentes patogênicos. A formação das ERO é fundamental para a defesa do hospedeiro, entretanto, nas situações em que a carga total destes compostos é grande o suficiente para suprimir os mecanismos de defesa antioxidante, como o que ocorre na pneumonia, há o estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos teciduais (KHAIR et al., 1993; AL-QUDAH, 2009).

O estresse oxidativo induz a transcrição de genes inflamatórios que codificam um leque muito variado de mediadores pró-inflamatórios. Com isso, mais células inflamatórias são recrutadas para a microcirculação pulmonar e direcionadas às vias aéreas posteriores tornando-se ativas e passando a produzir mais ERO em resposta aos estímulos inflamatórios (RAHMAN e MACNEE, 2000), amplificando seus efeitos nesses tecidos.

As mudanças provocadas pelas ERO no trato respiratório podem resultar em destruição direta de estruturas fundamentais, em especial o epitélio respiratório, endotélio vascular e a membrana alvéolo-capilar, levando a perdas na função pulmonar (SILVA e GONÇALVES, 2010). A destruição do tecido elástico dos pulmões pelas ERO atenua a complacência pulmonar e, conseqüentemente, diminui sua capacidade de expansão durante a respiração. As ERO são capazes de alterar o tônus da musculatura lisa das vias aéreas,

pelo desbalanceamento entre receptores muscarínicos (contração) e β -adrenérgicos (relaxamento). Elas podem alterar ou interferir em algumas vias metabólicas, como, por exemplo, a cascata da inflamação, onde atuam como mediadores químicos e ativadores de leucócitos, potencializando a resposta inflamatória (MILLS & HIGGINS, 1997; SILVA e GONÇALVES, 2010). As ERO também desativam as antiproteases endógenas, necessárias para limitar os danos causados pelas proteases liberadas durante o processo de fagocitose (LANSING et al., 1991; MILLS & HIGGINS, 1997; SILVA e GONÇALVES, 2010). O aumento na formação das ERO pode levar até mesmo a danos na microcirculação regional e, conseqüentemente, derrame de fluido rico em proteínas, no interior dos alvéolos. Este derrame e a atividade ERO degradam o surfactante, levando ao colapso dos alvéolos e, conseqüentemente, a aumento da resistência pulmonar (MILLS & HIGGINS, 1997; SILVA e GONÇALVES, 2010). O estresse oxidativo aumenta ainda a secreção de mucina pelo epitélio respiratório, o que diminui a eficiência do batimento ciliar, deixando as vias aéreas susceptíveis a infecções (WRIGHT et al., 1994; SILVA e GONÇALVES, 2010).

Diante do que foi exposto fica evidente a importância de conhecer os mecanismos que estimulam e mantém o estresse oxidativo durante a inflamação pulmonar.

2.4. Avaliação da função pulmonar

Os testes de função pulmonar têm ampla aplicação prática, pois podem quantificar, através do estudo de determinados parâmetros, as anormalidades do aparelho respiratório (MALLOZI e ROZOV, 1998; FERRO et al., 2002; MOTA e QUEIROZ, 2010). Os gases presentes no sangue são resultado de todos os processos envolvidos na respiração e, seguramente, o estudo destas variáveis é o teste de avaliação da função respiratória mais utilizado atualmente (BIANCHI, 2003; SOBIECH et al., 2005; PICCIONE et al., 2006).

A gasometria é o exame que permite analisar os gases sanguíneos e o equilíbrio ácido-básico de forma global e em tempo real. Para uma adequada avaliação dos gases presentes no sangue, o tempo de transporte e o acondicionamento das amostras biológicas utilizadas no exame devem ser

considerados, devido à continuidade da atividade metabólica sanguínea (LEAL et al., 2006). *In vitro*, esta atividade inclui o metabolismo aeróbico, com consumo de O_2 e produção de dióxido de carbono (CO_2) no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e glicólise anaeróbica acompanhada da produção de metabólitos ácidos, principalmente os ácidos láctico e pirúvico (SZENCI e BESSER, 1990). Aparelhos utilizados para a determinação dos gases sanguíneos e do pH estão disponíveis no mercado em vários tipos e modelos, inclusive portáteis (FISHEMAN, 1992).

Os aparelhos portáteis de gasometria têm como principal vantagem a possibilidade de avaliação das amostras de sangue imediatamente após a colheita. A análise é feita partir de cartuchos descartáveis contendo uma solução calibradora que permite a calibração do sistema a cada ensaio. Após pingarem-se duas gotas de sangue em orifício apropriado no interior do cartucho, basta inseri-lo no aparelho. O resultado é dado em, no máximo, dois minutos. Além disso, ao contrário dos hemogasômetros convencionais, esses aparelhos não precisam ser recalibrados continuamente, evitando assim gastos constantes com sua manutenção. Cabe ressaltar que vários estudos já demonstraram a eficácia desses dispositivos na determinação das principais variáveis gasométricas em diferentes espécies domésticas (SILVERMAN e BIRKS, 2002; THOEFNER e POLLITT, 2004; SAULEZ et al., 2005; FREITAS et al., 2009; PEIRÓ et al., 2010).

O exame hemogasométrico fornece os resultados de variáveis de interesse para a avaliação da função pulmonar, pela mensuração das pressões arteriais de oxigênio (PaO_2), dióxido de carbono ($PaCO_2$) e hidrogeniônico (pH) sanguíneos, calculando automaticamente o bicarbonato (HCO_3) plasmático, assim como outras variáveis representativas do metabolismo (SOBIECH et al., 2005; GOUVÊA, 2009). As amostras de sangue arterial são empregadas para este tipo de exame, sendo obrigatórias quando se pretende avaliar a função pulmonar, além do equilíbrio ácido básico. O sangue venoso permite o conhecimento de valores razoavelmente confiáveis, porém é impossível obter qualquer informação a respeito da capacidade dos pulmões de oxigenar o sangue (LISBÔA, 2000; SOBIECH et al., 2005; BLUEL et al., 2007; MOTA e QUEIROZ, 2010).

O processo inflamatório nas vias aéreas posteriores e espaço alveolar ocorrido durante a pneumonia é capaz de afetar as trocas gasosas e o equilíbrio ácido-base, o que pode gerar um quadro de acidose respiratória (FERRO et al., 2002). A acidose respiratória é resultado da redução da ventilação pulmonar ou das trocas gasosas com retenção de ácido carbônico e, conseqüentemente, redução do pH e aumento da PaCO_2 (ANDREOLI e ABUL-EZZ, 2002; GOUVÊA, 2009). A acidose respiratória devido à hipercapnia pode induzir o aumento compensatório da concentração de bicarbonato (HCO_3^-) o que elevará a concentração de dióxido de carbono total (TCO_2) no sangue periférico (FERRO et al., 2002). Segundo Ortolani (2003), qualquer disfunção que interfira com a ventilação pode causar acidose respiratória, como obstrução respiratória anterior, pneumonias e pneumotórax. A compensação orgânica na acidose respiratória não é tão eficiente como na acidose metabólica, no entanto, o organismo aumenta a retenção renal de bicarbonato, um processo que demora alguns dias e é verificado mais em quadros crônicos de acidose respiratória (MOTA e QUEIROZ, 2010). Animais com acidose respiratória muitas vezes assumem posição ortopnéica, com o pescoço estendido, abdução das pernas anteriores e as narinas bem abertas, podendo ser acompanhado de dispnéia, respiração superficial e taquipnéia. Em algumas situações pode ser verificada congestão ou cianose das mucosas (GOUVÊA, 2009).

A mensuração dos gases sanguíneos arteriais pela gasometria é indicada não só para documentar a insuficiência pulmonar, mas também diferenciar esta de outras causas de hipóxia, determinar a necessidade de terapia de suporte com oxigênio e monitorar a resposta ao tratamento (GONÇALVES e FEITOSA, 2008). Segundo Ortolani (2003), são considerados valores hemogasométricos de referência para ovinos criados em condições brasileiras: PaCO_2 - 34-35 mmHg (sangue venoso); PaO_2 - 83-95 mmHg (sangue arterial); HCO_3^- - 19-25 mM (sangue venoso); pH de 7,28 a 7,42 (sangue venoso); excesso de bases - - 4 a 2 mM (sangue venoso) e TCO_2 - 19-26 mM (sangue venoso). A facilidade de obtenção de mostras, independentemente do estágio da doença e a possibilidade de obter resultados rapidamente com os modernos analisadores automáticos, são fatores que contribuíram para a generalização do uso da gasometria (CARDOSO, 1997).

Objetivos

3. Objetivos

Em ovinos clinicamente sadios e portadores de pneumonia:

- Avaliar o *status* oxidativo sistêmico pela determinação da atividade enzimática da SOD e GSH-Px e concentrações de glutathiona total (GSH-t) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) eritrocitárias;
- Estudar a resposta inflamatória sistêmica pela determinação da Proteína Total (PT) e do Fibrinogênio (FB) plasmáticos, pelo hemograma e pelos sinais clínicos determinantes de pneumonia;
- Avaliar a segurança e viabilidade da punção carotídea com o ovino em posição quadrupedal como via de acesso para a obtenção de sangue arterial nessa espécie;
- Estudar a função pulmonar pela determinação das variáveis hemogasométricas Pressão Arterial de Oxigênio (PaO_2), Pressão Arterial de Gás Carbônico (PaCO_2), Hidrogeniônico (pH), Saturação de Oxigênio (SO_2), Bicarbonato (HCO_3^-), Dióxido de Carbono Total (TCO_2), Saturação de O_2 (SO_2) e Excesso de Bases (EB) no sangue arterial;
- Comparar esses dados em ovinos clinicamente sadios e portadores de pneumonia com o intuito de estudar a relação entre o estresse oxidativo,

alterações na função pulmonar e a intensidade da resposta inflamatória provocada pela doença;

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 40 ovinos, sendo 20 portadores de pneumonia diagnosticada ao exame clínico e 20 clinicamente sadios, independente de raça e sexo, com idade até um ano, pertencentes a propriedades rurais do município de Botucatu, São Paulo - Brasil (latitude 22°51'S e longitude 48°27"W. Grw.).

Os ovinos foram avaliados clinicamente e em seguida distribuídos em dois grupos:

- **G1 - controle:** 20 animais clinicamente sadios
- **G2:** 20 animais portadores de pneumonia, diagnosticada ao exame clínico

4.2. Exame clínico

Todos os animais foram submetidos ao exame clínico imediatamente antes do início da colheita das amostras biológicas necessárias para o estudo, utilizando-se protocolo adotado por Viana (2003) e critério clínico de Gonçalves e Feitosa (2008). Os resultados foram anotados em fichas individuais.

Os sinais clínicos utilizados como critério para classificação dos animais portadores de pneumonia foram: depressão, aumento da temperatura retal, secreção nasal, tosse, reflexo da tosse positivo, dispnéia com ou sem ruído expiratório, taquicardia, taquipnéia, crepitações e sons respiratórios rudes e/ou anormais à auscultação pulmonar.

Foram considerados sadios e aptos a participar do experimento todos os animais que, após serem submetidos ao exame físico, não manifestaram qualquer alteração clínica e apresentaram variáveis hematológicas dentro dos valores considerados de referência para a espécie (WEISS e WARDROP, 2010).

4.3. Colheita das amostras de sangue

Com os animais em estação e manualmente contidos, foram colhidos assepticamente um total de 10 mL de sangue, da veia jugular externa direita de cada um dos animais em estudo. Para tal utilizou-se um sistema de colheita a vácuo constituído de agulhas 25 x 8 mm (21G) para múltipla colheita, acopladas a tubos siliconizados.

A colheita das amostras de sangue foi realizada imediatamente após o exame clínico e o volume total recolhido de cada animal foi dividido em:

- 5 mL de sangue venoso em tubos siliconizados contendo ácido etileno-diaminotetra-acético (EDTA) para a avaliação hematológica;
- 5 mL de sangue venoso em tubos siliconizados contendo heparina sódica para a determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo (SOD, GSH-t, GSH-Px e TBARS);

O sangue arterial foi colhido em volume de um mL da artéria carótida esquerda, em seringa previamente heparinizada, acoplada a uma agulha 25 x 6 mm, em cada um dos animais em estudo. O sangue arterial colhido foi utilizado para a avaliação da função pulmonar mediante exame hemogasométrico (por determinação das variáveis PaO_2 , PaCO_2 , pH, SO_2 , HCO_3^- , TCO_2 , SO_2 e EB), realizado em aparelho analisador de gases portátil (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois - EUA) imediatamente após a colheita. Após a colheita do sangue arterial, a artéria puncionada de cada um dos animais foi firmemente comprimida por pelo menos um minuto para propiciar adequada hemostasia.

Após a colheita, as amostras de sangue dos tubos siliconizados contendo heparina foram armazenadas a 4° C em recipiente isotérmico contendo gelo em escamas e levadas imediatamente ao laboratório para serem processadas, prevenindo/retardando assim o processo de oxidação *in vitro*. As

amostras dos tubos siliconizados contendo EDTA foram transportadas ao laboratório em temperatura ambiente.

4.4. Análises laboratoriais

A avaliação hematológica e a determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP e no Laboratório de Análises Clínicas Particular Vida Vet¹ – Botucatu/SP, respectivamente.

4.4.1. Avaliação hematológica

Foi realizado hemograma e análises de PT e FB plasmáticos de acordo com métodos convencionais do Laboratório de Análises Clínicas Vida Vet – Botucatu/SP.

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

4.4.2. Biomarcadores do estresse oxidativo

4.4.2.1. Processamento das mostras de sangue

As amostras de sangue dos tubos contendo heparina foram centrifugadas (Centrífuga 5804E, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 185 x G por 10 minutos à 4º C. Para obtenção das hemácias, o sangue foi lavado com solução tampão salina-fosfato (PBS) (Solução tampão salina-fosfato, Ceaquim,

¹ Vida Vet Laboratório Veterinário
Rua Prudente de Moraes, 677, Centro, Botucatu-SP
CEP: 18602-060

Botucatu, São Paulo, Brasil) a 4°C e centrifugado a 1575 x G durante 15 minutos por três vezes. A cada repetição do procedimento, foi retirado o plasma, glóbulos brancos e as plaquetas, por aspiração com micropipeta. Às hemácias lavadas (50 µl) foram adicionados 1900 µl de água deionizada agitando-se por inversão, para obtenção do hemolisado que foi utilizado para determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo: atividade enzimática da SOD e concentrações de hemoglobina e de TBARS. Para a determinação da atividade enzimática de GSH-Px e da concentração de GSH-t, a água deionizada foi substituída por 950µL de solução estabilizadora (2,7 mM EDTA e 0,7 mM 2-mercaptoetanol) (Solução tampão salina-fosfato, pH de 7,4; Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil) (DE SOUZA et al., 2010). As amostras de hemolisado foram congeladas e armazenadas a uma temperatura de -80°C até serem analisadas, 2 meses após a coleta.

4.4.2.2. Análise Bioquímica

As atividades de SOD e GSH-Px e as concentrações de GSH-t e TBARS foram determinadas por método colorimétrico em espectrofotômetro utilizando técnica descrita por De Souza et al. (2010).

Para a determinação da hemoglobina, 20 µL do hemolisado foram diluídos e agitados em 2 mL de solução de Drabkin (Solução de Drabkin, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil). Após 10 minutos de repouso, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SP 220, Bioespectro, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 546 nm e expressa em g/dL (DE SOUZA et al., 2010).

Para a determinação das TBARS, um 1 mL de ácido sulfossalicílico 3,0% (5-sulfosalicylic acid hydrate 95%, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) foi adicionado a 1 mL de hemolisado, agitado por 10 segundos, centrifugado a 15.300 x G por 3 minutos e deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Thiobarbituric acid, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) a 500 µL de hemolisado. A mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos e a absorbância determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram

expressos em nM de malonaldeído (MDA) por grama de hemoglobina (nM/gHb) (DE SOUZA et al., 2010).

A atividade total da SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do ácido pirogálico (Pyrogallol acid, Synth, Dracena, São Paulo, Brasil) pelo ânion superóxido. A mistura consistiu na adição de 100 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM, 20 µL de ácido pirogálico 10mM e 860 µL de água deionizada a 20 µL de hemolisado. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm (25°C) por 5 minutos. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol[®], por miligrama de hemoglobina, é definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em unidades de atividade enzimática, por grama de hemoglobina UI/mgHb (DE SOUZA et al., 2010).

O conteúdo de GSH-t foi determinado pela adição da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (NADPH, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA), que iniciou a reação enzimática da glutathione com o ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) (2-nitrobenzoic acid, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A mistura consistiu na adição de 1.290 µL de água destilada, 200 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 µL de 10 UI/mL de GSH-Rd (Glutathione reductase, SIGMA, St. Louis, USA), 200 µL de NADPH (2mM) e 100 µL de DTNB (12 mM) a 10 µL de hemolisado. Para obtenção da curva padrão da glutathione, foi realizado o mesmo ensaio, substituindo-se a amostra de hemolisado por 10 µL de solução padrão a 1:1000 de glutathione oxidada (GSSG) (L-glutathione oxidized, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA), a 33 µM. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm. A concentração da GSH-t foi expressa em micromoles do substrato reduzido, por grama de hemoglobina (µM/gHb) (DE SOUZA et al., 2010).

A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH. A mistura consistiu na adição de 1.300 µL de água destilada, 200 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 µL de 10 UI/mL de GSH-Rd, 200 µL de NADPH (2mM), 40 µL de GSH (0,1 M) a 40 µL de hemolisado. A mistura foi agitada em vórtex (Vortex AP-56,

Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brazil), durante 10 segundos. Em seguida foi adicionado 20 μL de T-Butil hidroperóxido (7mM) (T-butyl hydroperoxide, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) e mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática, por grama de hemoglobina (UI/gHb) (DE SOUZA et al., 2010).

4.4.3. Hemogasometria

As análises da PaO_2 , PaCO_2 , pH, SO_2 , HCO_3^- , TCO_2 , SO_2 e EB foram realizadas por meio de um analisador clínico portátil (I-STAT[®], Abbott Laboratories, Illinois - EUA), imediatamente após a coleta utilizando-se o cartucho EG7+ (EG7⁺, Abbott Laboratories, Illinois - EUA), no qual foram instiladas aproximadamente duas gotas de sangue arterial para a realização das análises. O aparelho efetuava as análises e apresentava os resultados em aproximadamente dois minutos.

4.5. Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados os grupos G1 (sadios) e G2 (doentes) foram comparados em relação às variáveis dicotômicas e quantitativas. Os sinais clínicos foram analisados utilizando-se o teste do Qui-quadrado e, quando um dos valores esperados foi menor que 5 no cálculo do Qui-quadrado, utilizou-se o Teste Exato de Fisher.

As variáveis hematológicas (hemograma e PT e FB plasmáticos), os biomarcadores do metabolismo oxidativo (SOD, GSH-Px, GSH-t e TBARS) e as variáveis gasométricas (PaO_2 , PaCO_2 , pH, SO_2 , HCO_3^- , TCO_2 e EB) não apresentaram distribuição normal e foram analisadas de acordo com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Toda a análise estatística foi feita utilizando-se o software PASW v.17.0.2 (Statistical Software PASW - version 17.0.2, Chicago, Illinois, USA) e, para todas as comparações estatísticas, foi considerado limite mínimo de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

Resultados

5. Resultados

Os dois grupos de ovinos (G1 e G2) foram similares em idade e sexo. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os animais sadios (G1) e os portadores de pneumonia (G2) com relação ao peso. Os ovinos portadores de pneumonia apresentaram menor peso quando comparados aos animais sadios (Tabela 1).

Ao exame clínico, no grupo de animais sadios (G1), as médias da temperatura retal (°C), frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC) foram respectivamente de $39,6 \pm 0,28$, $34,2 \pm 8,99$ e $105,1 \pm 15,46$, (Tabela 2), sendo que os valores da temperatura retal e FC se encontravam dentro dos valores de referência para a espécie, com discreto aumento na FR de quatro movimentos respiratórios por minuto (mpm) acima dos valores considerados normais. A elevação da FR foi observada em 50% (10/20) dos animais do grupo G1, com variação de até 18 mpm acima do valor considerado normal (20-30 mpm). Apesar da média da FC apresentar-se dentro dos padrões considerados ideais (90-115 bmp), quatro animais (4/20 – 20%) apresentaram média de 15 bpm acima da faixa de normalidade (Tabela 2).

No grupo dos animais com pneumonia (G2), os valores médios de temperatura (°C), FR e FC foram de $40,15 \pm 0,34$, $71,95 \pm 31,95$ e $119,4 \pm 25,77$, respectivamente, todos acima dos valores de referência para a espécie (Tabela 2) (FEITOSA, 2008). A frequência respiratória elevou-se em 70% dos ovinos doentes (14/20 – 70%) e com variações de até 80 mpm. O aumento da FC foi observado em 13 (13/20 – 65%) animais do grupo G2, com até 45 bpm acima dos valores considerados normais para a espécie (Tabela 2).

Contudo, quando comparadas às variáveis temperatura retal (°C), FR e FC entre os grupos G1 e G2, foi possível observar diferença estatística apenas na temperatura retal ($p=0,01$) e na frequência respiratória ($p<0,05$), significativamente maiores no grupo dos animais portadores de pneumonia (Tabela 2).

A Tabela 3 apresenta os percentuais médios e desvios padrão referentes a sintomatologia clínica dos animais avaliados para os dois grupos estudados (G1 e G2). A ocorrência dos sinais clínicos característicos de doença respiratória e suas associações entre os animais do grupo G2 encontram-se resumidos na Tabela 4. Reflexo da tosse positivo e aumento da intensidade dos ruídos laringotraqueal e traqueobrônquico foram os sinais clínicos mais observados no grupo 2, presentes em 95% (19/20 - 95%) dos animais doentes. Depois, seguem-se a secreção nasal uni ou bilateral em 90% (18/20 - 90%) dos animais doentes, a tosse em 85% (17/20 - 85%), a crepitação grossa em 75% (15/20 - 75%), o frêmito brônquico em 60% (12/20 - 60%) e o aumento das frequências cardíaca e respiratória, presentes em 70% (14/20 - 70%) e 65% (13/20 - 65%) dos ovinos com pneumonia, respectivamente.

Em proporção intermediária estão presentes a crepitação fina e a dispnéia mista, observados em 55% (11/20 - 55%) dos animais do grupo 2, o frêmito traqueal, o aumento do ruído broncobronquiolar e o sibilo, presentes em 50% (10/20 - 50%) dos ovinos portadores de pneumonia, além da hipertermia, observada em 45% (9/20 - 45%) dos animais doentes. Os sinais clínicos menos frequentes foram a posição ortopnéica, observada em 15% (3/20 - 15%) dos ovinos do grupo 2 e, o ronco e o odor expiratório fétido, presentes em 10% (2/20 - 10%) dos animais com pneumonia.

Nos animais sadios (G1) não foram encontrados sinais clínicos característicos de doença respiratória. Quando comparados os grupos G1 e G2, os sinais clínicos que ocorreram com frequência estatisticamente significativa ($p<0,05$) nos animais doentes e por isso caracterizaram o quadro de pneumonia apresentado pelos animais do grupo G2 foram: tosse, secreção nasal, dispnéia mista, frêmitos traqueal e brônquico, reflexo da tosse positivo, aumento dos ruídos laringotraqueal, traqueobrônquico, e broncobronquiolar, crepitação fina e grossa, sibilo e hipertermia (Tabela 3).

Com relação aos componentes do hemograma, não houve diferença significativa entre os grupos para a contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular e plaquetas ($p>0,05$) (Tabela 5). Na análise do leucograma, os animais do grupo G2 demonstraram aumento significativo ($p<0,05$) nos valores médios da contagem total de leucócitos, de neutrófilos segmentados, eosinófilos e monócitos. Com exceção dos monócitos, todas as variáveis do leucograma supracitadas encontravam-se com seus valores médios acima dos considerados de referência para a espécie (WEISS e WARDROP, 2010). No grupo de animais portadores de pneumonia (G2) foi possível observar ainda linfopenia estatisticamente significativa ($p<0,05$). Com relação aos parâmetros hematológicos bioquímicos, os ovinos do grupo de animais portadores de pneumonia (G2) apresentaram aumento significativo da concentração plasmática de fibrinogênio ($p<0,05$) e proteína total ($p=0,004$), que podem indicar inflamação ou desidratação (Tabela 5).

Os resultados para as variáveis SOD, GSH-t, GSH-Px e TBARS obtidos a partir do hemolisado de eritrócitos de ovinos sadios e portadores de pneumonia encontram-se resumidos na Tabela 6. Houve redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) nas atividades de SOD e GSH-Px e na concentração de GSH-t nas hemácias dos ovinos do grupo G2. Com relação ao marcador de peroxidação lipídica, ocorreu elevação estatisticamente significativa na concentração de TBARS nos eritrócitos dos ovinos portadores de pneumonia ($p<0,05$) (Figuras 1 a 4).

Amostras de sangue arterial foram colhidas com sucesso em todos os animais que participaram do estudo (40/40 – 100%). Entretanto, seis animais (6/40 – 15%) demonstraram certa resistência ao procedimento de punção da artéria carótida esquerda, vindo a dificultar a coleta. Cinco desses animais (5/40 - 12,5%) demonstraram suave esforço (berros, feições de medo e elevação das patas), enquanto que um dos animais (1/40 – 2,5%) apresentou forte resistência (saltos e tentativas de coices) à tentativa de acesso arterial por punção carotídea. Dos seis ovinos que apresentaram resistência à punção da artéria carótida, todos apresentaram hematoma no local da punção arterial, apesar da compressão da artéria puncionada por no mínimo cinco minutos (6/40 – 15%). O hematoma local foi a única complicação decorrente da punção arterial observado nos animais que participaram do estudo.

A análise dos resultados da hemogasometria arterial de ambos os grupos encontra-se resumida na Tabela 7. Não houve diferença estatística significativa para as variáveis gasométricas PaO_2 e SO_2 ($p > 0,05$) mensuradas no sangue arterial de ambos os grupos (G1 e G2). Por outro lado, diferenças significativas foram observadas para as variáveis pH, PaCO_2 , HCO_3^- , BE e TCO_2 ($p < 0,05$) entre os grupos estudados (G1 e G2). No grupo G1 os valores médios de todas as variáveis gasométricas analisadas permaneceram dentro dos valores de referência estipulados para a espécie. Quando comparados aos animais sadios, os ovinos portadores de pneumonia (G2) apresentaram hipercapnia média de $49,56 \pm 3,19$ mmHg que variou de 45,70 a 56,80 mmHg. Os teores médios de HCO_3^- ($23,54 \pm 3,04$ mmol/L) e TCO_2 ($26,50 \pm 1,50$ mmol/L) também se elevaram nos animais do grupo G2, com variações de 24,1 a 31,2 mmol/L e de 25 a 32 mmol/L para o HCO_3^- e a TCO_2 , respectivamente. A BE foi outra variável que também se mostrou elevada no grupo dos animais portadores de pneumonia, com valores médios de $0,95 \pm 2,8$ mmol/L que variaram de -2 a 7 mmol/L. A única variável que após a comparação entre os grupos (G1 e G2) mostrou-se significativamente diminuída foi o pH sanguíneo, com média de $7,355 \pm 0,45$ que variou de 7,259 a 7,426 (Figuras 5 a 11).

Tabela 1: Idade, sexo e peso de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011 (média e desvio padrão).

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=20) Média ± Sd¹</i>	<i>G2 (n=20) Média ± Sd</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Idade (dias)</i>	175,45 ± 10,92	176,10 ± 9,42	<i>p>0,05</i>
<i>Sexo</i>			
<i>Machos</i>	0	2	<i>p>0,05</i>
<i>Fêmeas</i>	20	18	
<i>Peso (Kg)</i>	37,10 ± 1,13	32,15 ± 1,22*	<i>p<0,05</i>

* Significativo ao Teste de Mann-Whitney (p<0,05).

¹ Sd: desvio padrão

Tabela 2: Médias, desvios padrão, medianas e valores máximos e mínimos das variáveis temperatura (°C), frequência respiratória e frequência cardíaca de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011.

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=20)</i>	<i>G2 (n=20)</i>
<i>Temperatura (°C)</i>		
<i>Média ± sd¹</i>	39,6 ± 0,28	40,15 ± 0,34*
<i>Mediana</i>	39,6	40,0
<i>Máximo</i>	40,0	40,8
<i>Mínimo</i>	38,9	39,6
<i>Frequência Respiratória</i>		
<i>Média ± sd</i>	34,20 ± 8,99	71,95 ± 31,95*
<i>Mediana</i>	36	80
<i>Máximo</i>	48	120
<i>Mínimo</i>	22	20
<i>Frequência Cardíaca</i>		
<i>Média ± sd</i>	105,10 ± 15,46	119,4 ± 25,77
<i>Mediana</i>	100	120
<i>Máximo</i>	160	160
<i>Mínimo</i>	92	88

* Significativo ao Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher (p<0,05)

¹ Sd: desvio padrão

Tabela 3: Frequências de observação e percentuais dos sinais clínicos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011.

Sinal Clínico	G1 (n=20)		G2 (n=20)	
	n	%	n	%
<i>Tosse</i>	0	0	17	85%*
<i>Secreção nasal</i>	0	0	18	90%*
<i>Dispnéia mista</i>	0	0	11	55%*
<i>Frêmito traqueal</i>	0	0	10	50%*
<i>Frêmito brônquico</i>	0	0	12	60%*
<i>Reflexo da tosse positivo</i>	0	0	19	95%*
<i>Ruído laringotraqueal aumentado</i>	0	0	19	95%*
<i>Ruído traqueobrônquico aumentado</i>	0	0	19	95%*
<i>Ruído broncobronquiolar aumentado</i>	0	0	10	50%*
<i>Área de silêncio pulmonar</i>	0	0	0	0
<i>Crepitação grossa</i>	0	0	15	75%*
<i>Crepitação fina</i>	0	0	11	55%*
<i>Ronco</i>	0	0	2	10%
<i>Sibilo</i>	0	0	10	50%*
<i>Roce pleural</i>	0	0	0	0
<i>Odor expiratório fétido</i>	0	0	2	10%
<i>Posição ortopnéica</i>	0	0	3	15%
<i>Hipertermia</i>	0	0	9	45%*
<i>Frequência respiratória aumentada</i>	10	50%	14	70%
<i>Frequência cardíaca aumentada</i>	4	20%	13	65%

* Significativo ao Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher ($p < 0,05$)

Tabela 4: Ocorrência dos sinais clínicos em cada um dos ovinos portadores de pneumonia do grupo G2 da região de Botucatu/SP, 2011.

<i>Sinais Clínicos</i>	<i>Animal</i>																				<i>Total</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>	<i>14</i>	<i>15</i>	<i>16</i>	<i>17</i>	<i>18</i>	<i>19</i>	<i>20</i>	
<i>Tosse</i>	*	*	*		*	*	*		*	*	*	*		*	*	*		*	*	*	17
<i>Secreção nasal</i>	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	18
<i>Dispnéia mista</i>	*	*		*	*		*		*	*				*	*			*	*		11
<i>Frêmito traqueal</i>	*	*		*	*		*		*	*								*	*	*	10
<i>Frêmito brônquico</i>		*		*	*		*		*	*			*	*	*			*	*	*	12
<i>Reflexo da tosse positivo</i>	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	19
<i>Ruído laringotraqueal aumentado</i>	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	19
<i>Ruído traqueobrônquico aumentado</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	19
<i>Ruído broncobronquiolar aumentado</i>	*	*		*	*		*		*	*					*			*	*		10
<i>Área de silêncio pulmonar</i>																					0
<i>Crepitação grossa</i>	*	*		*	*	*	*		*	*		*	*		*			*	*	*	15
<i>Crepitação fina</i>			*		*	*		*	*	*			*					*		*	11
<i>Ronco</i>					*														*		2
<i>Sibilo</i>		*					*		*	*		*		*	*			*	*	*	10
<i>Roce pleural</i>																					0
<i>Odor expiratório fétido</i>		*																	*		2
<i>Posição ortopnéica</i>					*					*									*		3
<i>Hipertermia</i>		*		*	*		*		*	*	*				*				*		9
<i>Frequência respiratória aumentada</i>		*	*	*	*		*	*	*	*				*	*			*	*	*	14
<i>Frequência cardíaca aumentada</i>		*	*	*	*		*		*	*				*	*			*	*	*	13

Tabela 5: Resultado da análise das variáveis componentes do hemograma no sangue periférico de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011 (médias e desvios-padrão).

Variáveis	G1 (n=20) Méd¹ ± Sd²	G2 (n=20) Méd ± Sd
<i>Hemácias (x10⁶/μl)</i>	11,14 ± 1,35	11,47 ± 1,53
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	11,16 ± 1,32	11,31 ± 1,49
<i>Volume Globular (%)</i>	30,32 ± 3,63	30,55 ± 03,57
<i>Proteína Plasmática Total (g/dL)</i>	7,06 ± 0,53	7,84 ± 1,02*
<i>Fibrinogênio (mg/dL)</i>	267,0 ± 91,20	652 ± 127,30*
<i>Plaquetas (x10³/μl)</i>	582 ± 101	647 ± 132
<i>Leucócitos totais (x10³/μl)</i>	8,170 ± 1,562	15,365 ± 2,578*
<i>Mielócitos/μl</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Metamielócitos/μl</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Bastonetes/μl</i>	13,00 ± 33,10	92,08 ± 147,20
<i>Segmentados/μl</i>	2902,00 ± 844,00	10110,00 ± 1796,00*
<i>Eosinófilos/μl</i>	355,00 ± 119,30	1899,00 ± 476,00*
<i>Linfócitos/μl</i>	4768,00 ± 1045,00	2878,00 ± 646,00*
<i>Monócitos/μl</i>	109,30 ± 85,10	301,00 ± 234,40*
<i>Basófilos/μl</i>	12,6 ± 31,34	39,10 ± 83,60

* Significativo ao Teste de Mann-Whitney (p<0,05).

¹ Méd: média

² Sd: desvio padrão.

Tabela 6: Resultado da análise das variáveis Superóxido Dismutase (SOD), Glutathiona Total (GSH-t), Glutathiona Peroxidase (GSH-Px) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011 (média e desvio padrão).

Variáveis	G1 (n=20)	G2 (n=20)
	Média ± Sd	Média ± Sd
<i>SOD (UI/g Hb)</i>	8764,31 ± 3346	5927 ± 2674*
<i>GSH-t (μM/g Hb)</i>	7,96 ± 2,2	6,31 ± 2,48*
<i>GSH-Px (UI/mg Hb)</i>	0,58 ± 0,12	0,35 ± 0,1*
<i>TBARS (Nm/g Hg)</i>	262,1 ± 72,6	433,9 ± 149,1*

* Significativo ao Teste de Mann-Whitney (p<0,05).

¹ Sd: desvio padrão.

Tabela 7: Resultado da análise das variáveis hemogasométricas pressão arterial de oxigênio (PaO_2), pressão arterial de gás carbônico (PaCO_2), hidrogeniônico (pH), bicarbonato (HCO_3^-), dióxido de carbono total (TCO_2), excesso de bases (EB) e saturação de oxigênio (SO_2) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011 (média e desvio padrão).

Variáveis	G1 (n=20)	G2 (n=20)
	Média $\pm$ Sd	Média $\pm$ Sd
<i>pH</i> [*]	7,419 $\pm$ 0,021	7,35585 $\pm$ 0,452 *
<i>PaO₂ (mmHg)</i>	93,20 $\pm$ 5,59	93,75 $\pm$ 7,85
<i>PaCO₂ (mmHg)</i>	34,180 $\pm$ 0,96	49,56 $\pm$ 3,19 *
<i>HCO₃⁻ (mmol/L)</i>	21,425 $\pm$ 1,22	26,55 $\pm$ 2,27*
<i>TCO₂ (mmol/L)</i>	22,20 $\pm$ 1,28	27,75 $\pm$ 2,22*
<i>EB (mmol/L)</i>	-2,8 $\pm$ 1,67	0,95 $\pm$ 2,8*
<i>SO₂ (%)</i>	95,70 $\pm$ 1,52	95,85 $\pm$ 1,22

* Significativo ao Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

¹ Sd: desvio padrão.

Figura 1: Mediana e valores máximo e mínimo da variável Superóxido Dismutase (SOD) em eritrócitos de ovinos saudios (G1) e portadores de pneumonia (G2).

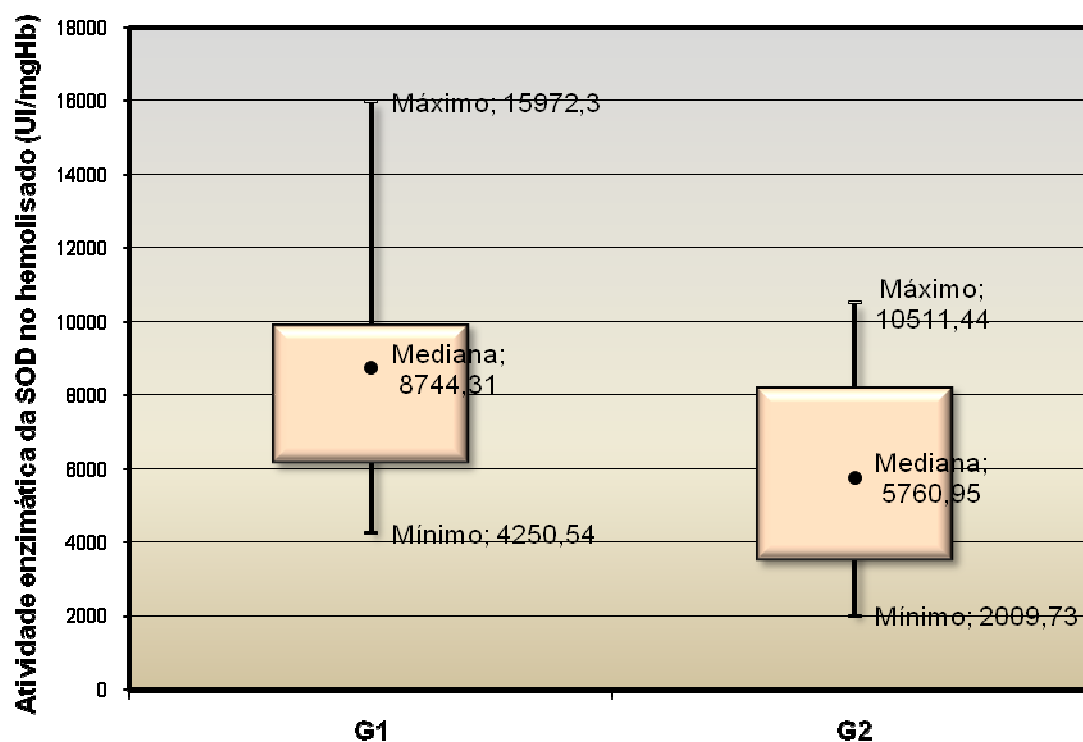


Figura 2: Mediana e valores máximo e mínimo da variável Glutathiona Total (GSH-t) em eritrócitos de ovinos saudios (G1) e portadores de pneumonia (G2).

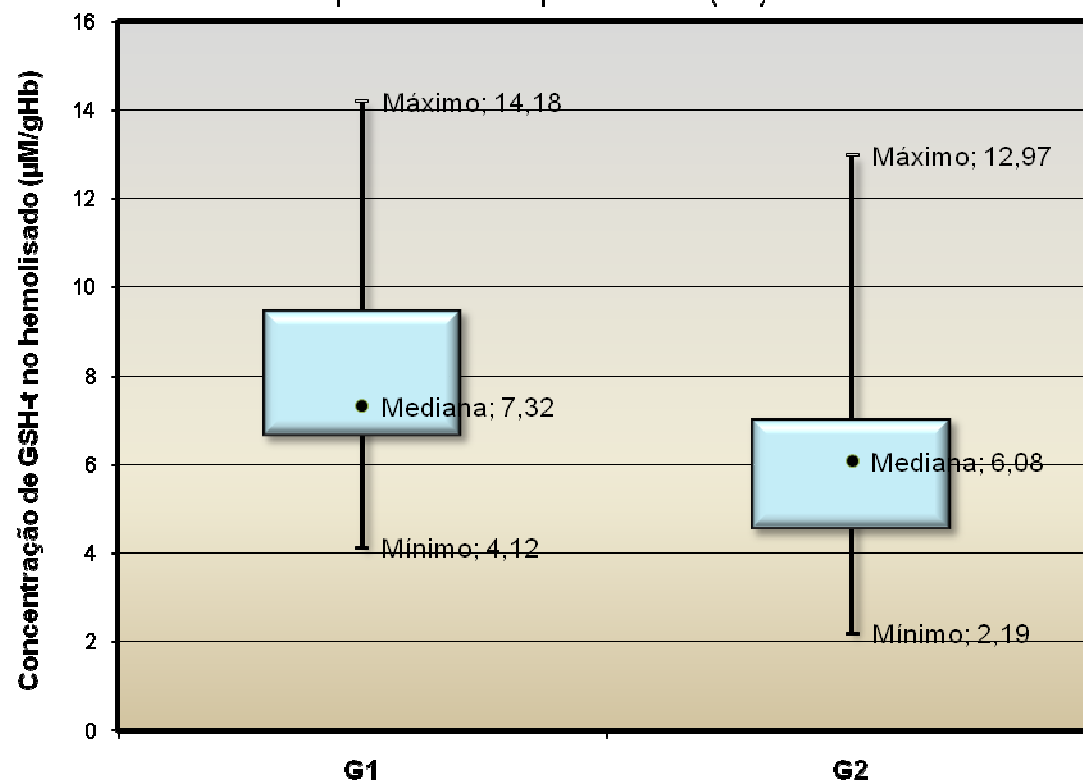


Figura 3: Mediana e valores máximo e mínimo da variável Glutathione Peroxidase (GSH-Px) em eritrócitos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).

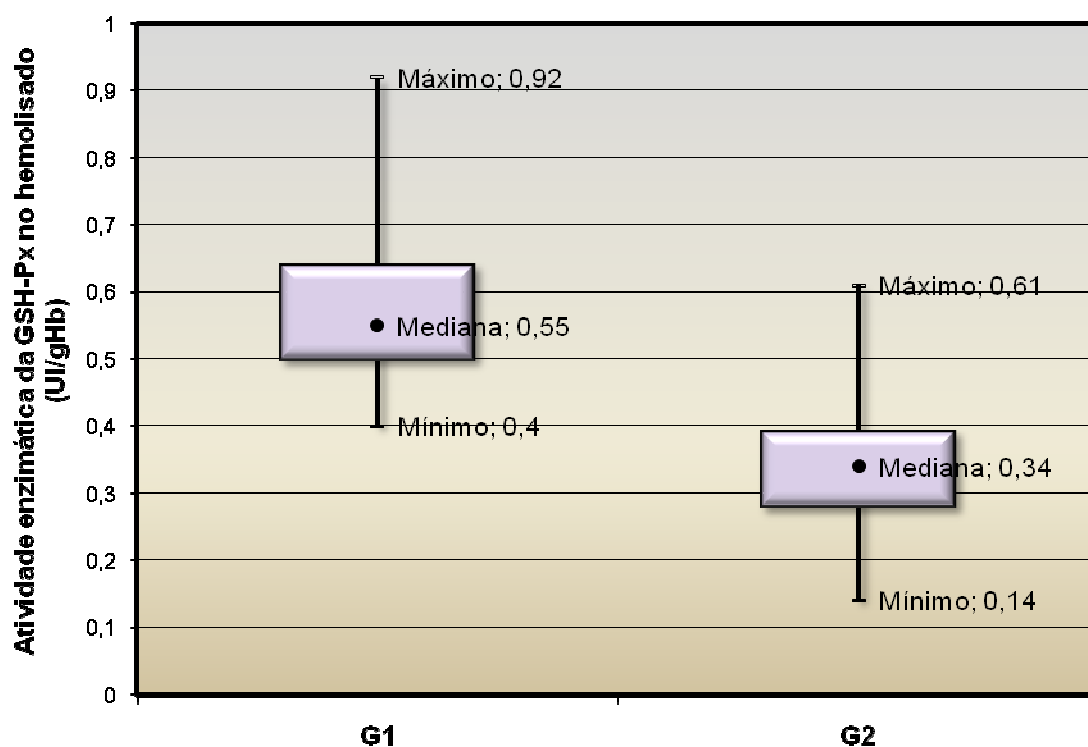
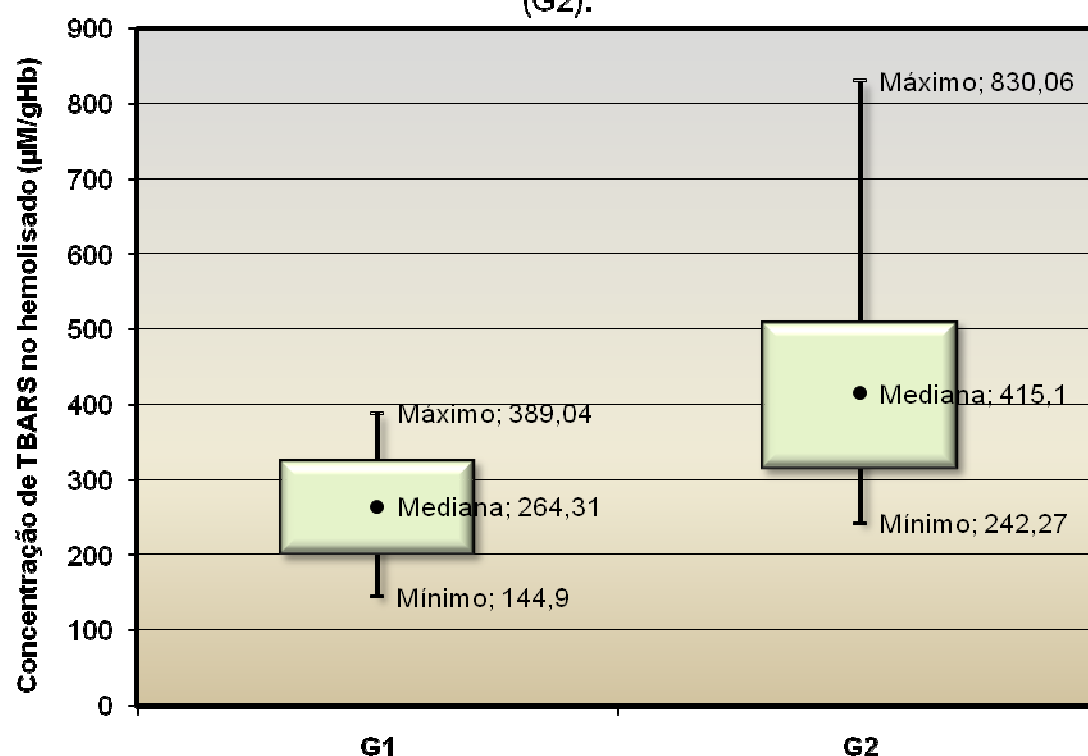
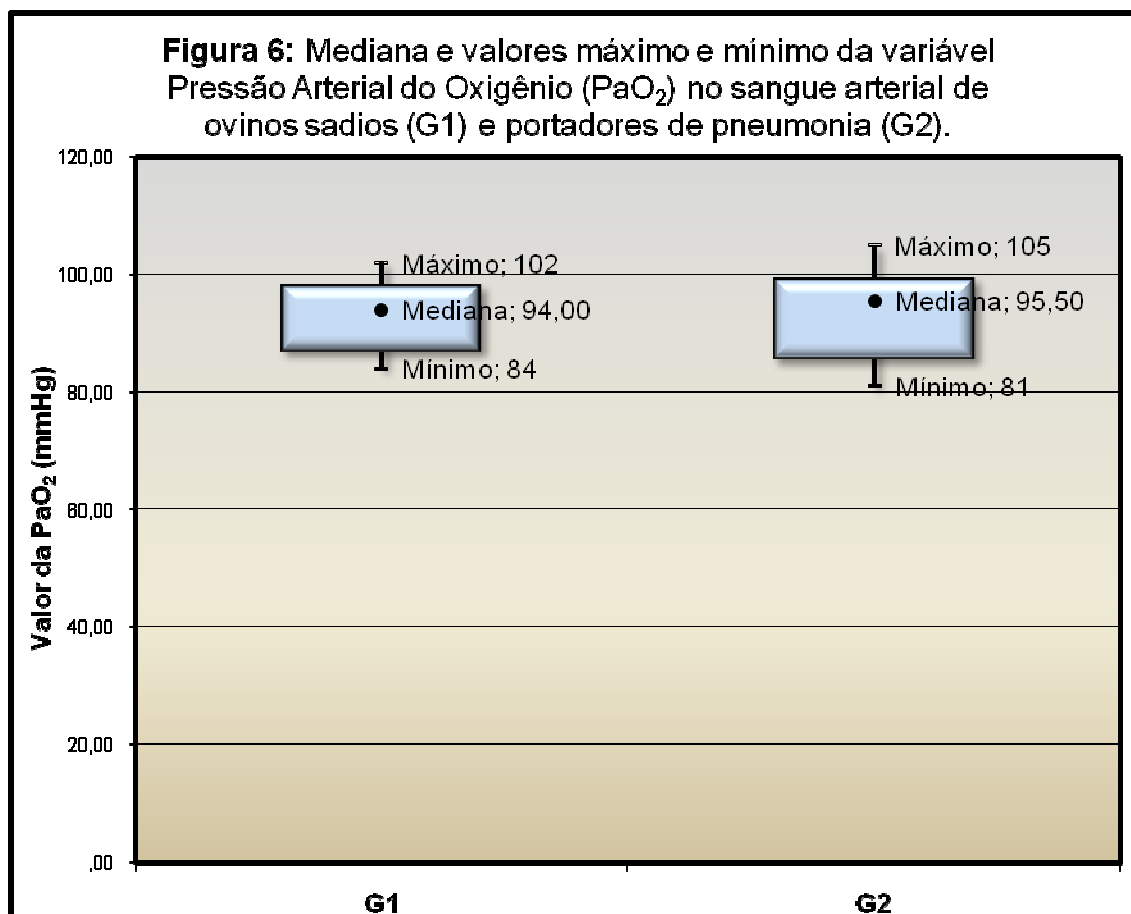
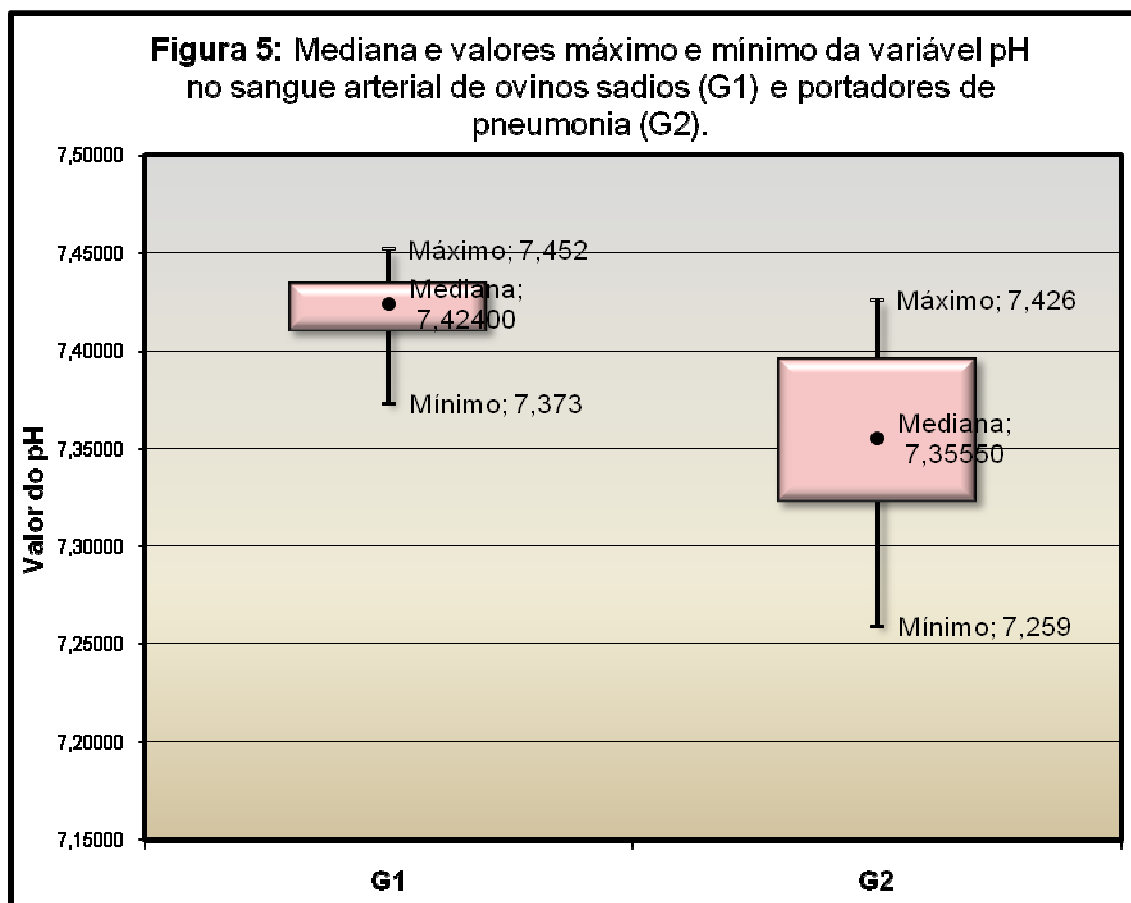


Figura 4: Mediana e valores máximo e mínimo da variável Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em eritrócitos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).





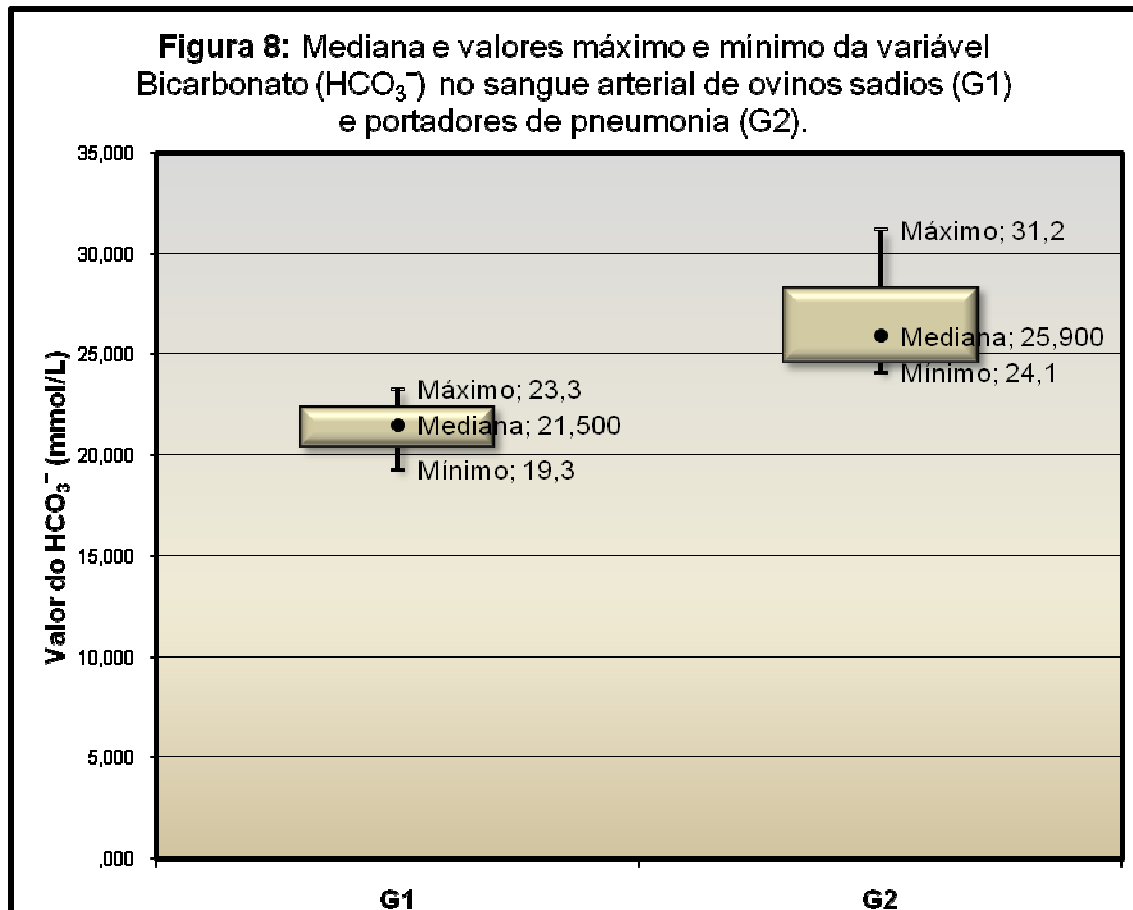
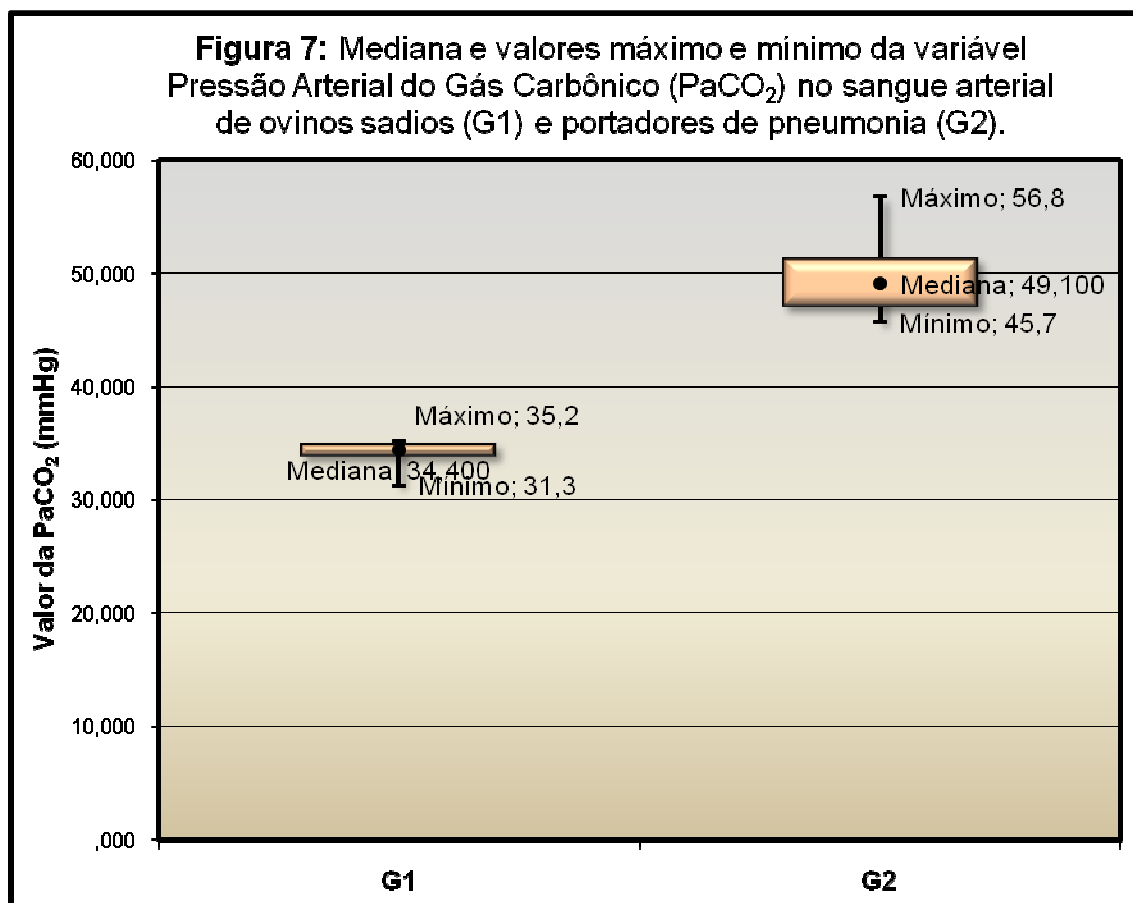


Figura 9: Mediana e valores máximo e mínimo da variável Dióxido de Carbono Total (TCO_2) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).

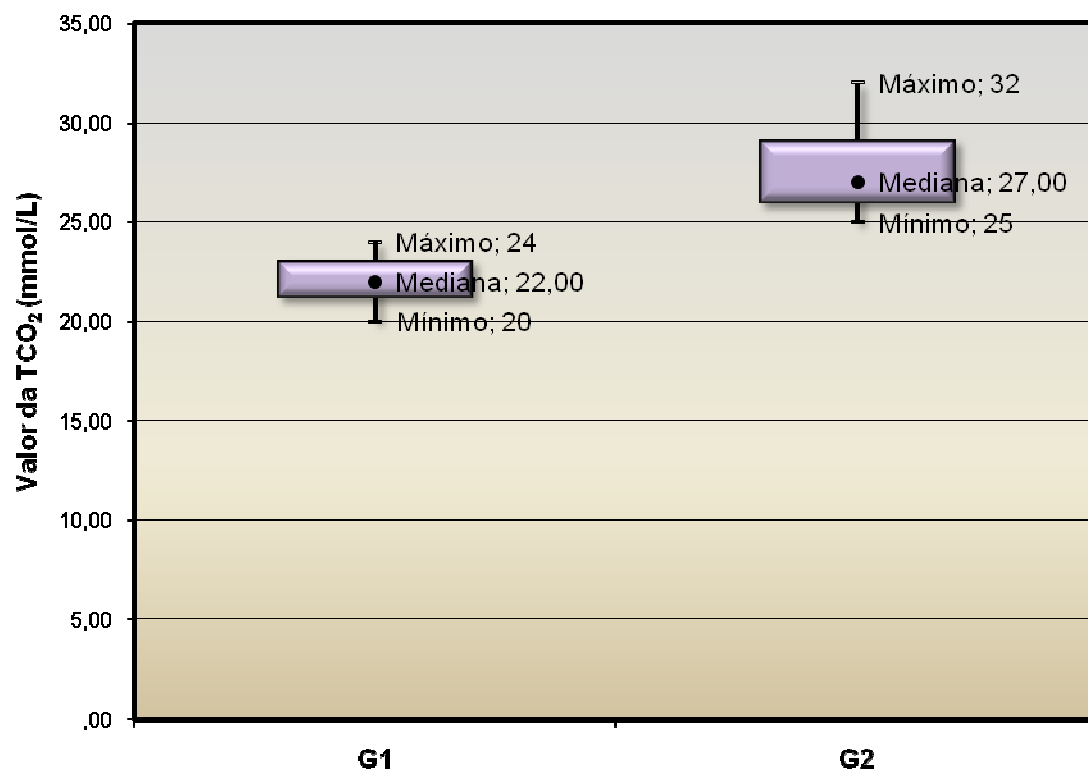
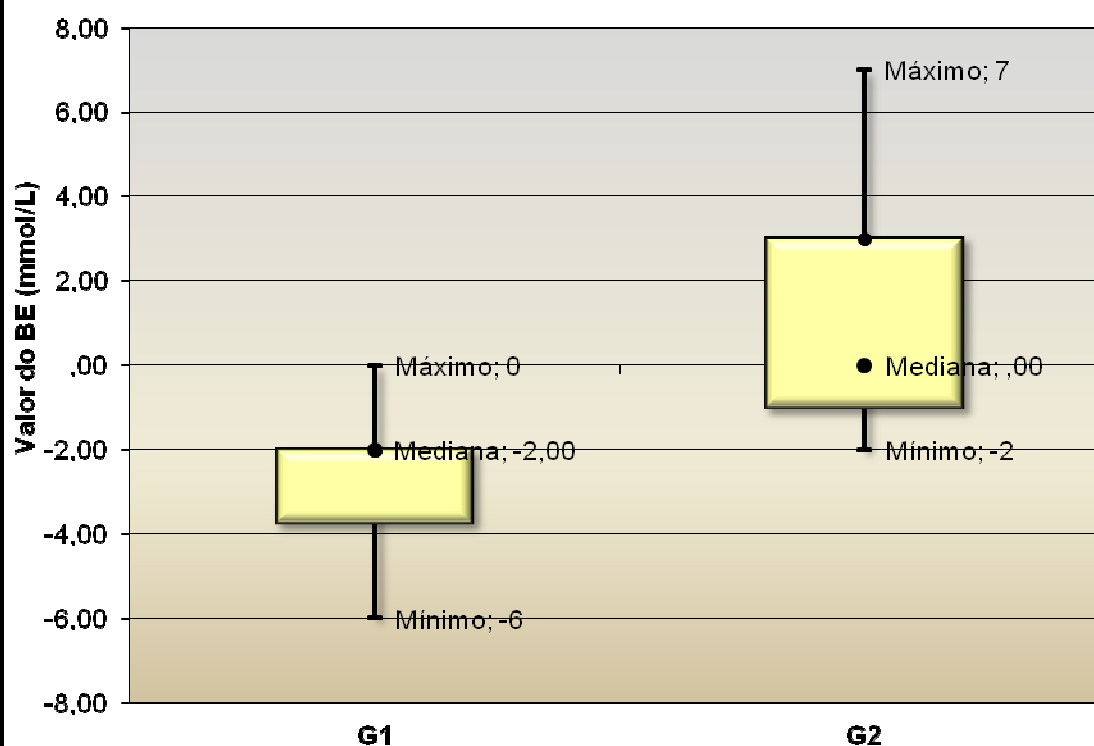
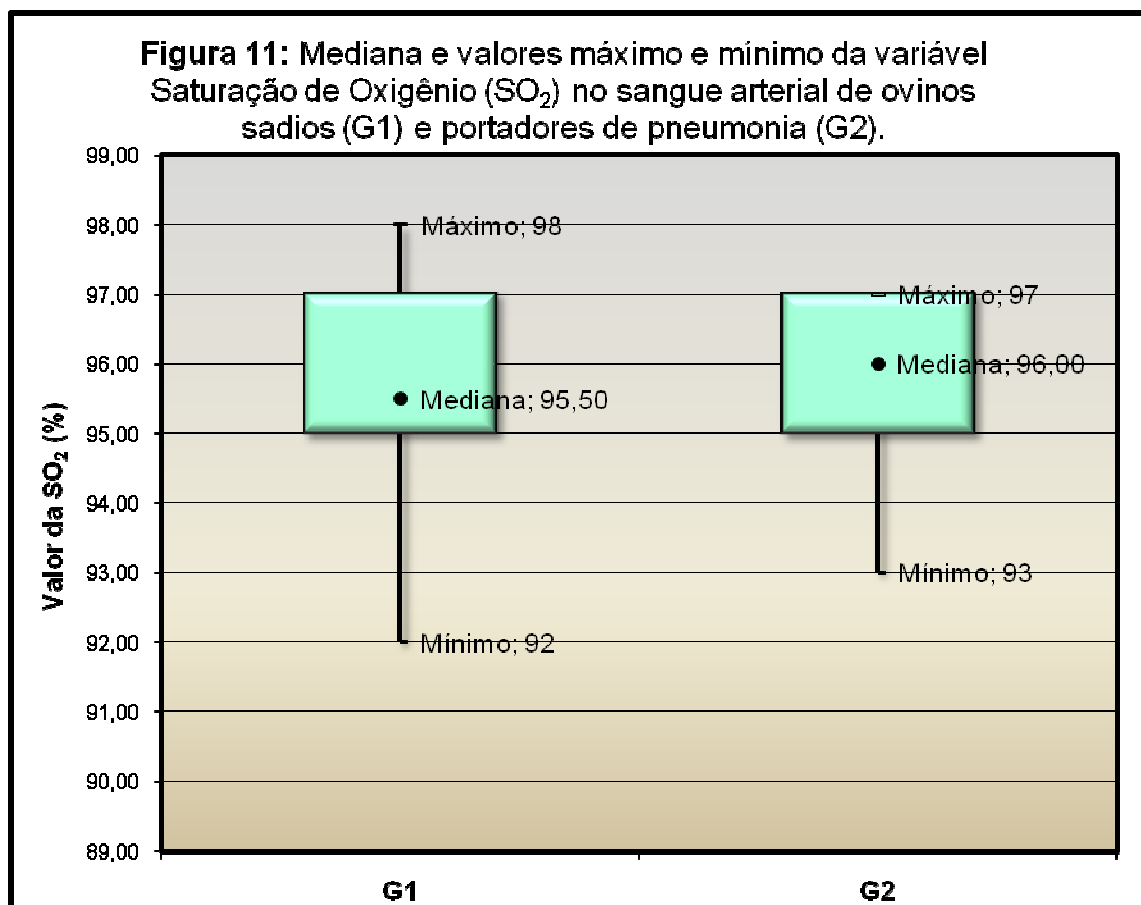


Figura 10: Mediana e valores máximo e mínimo da variável Excesso de Bases (BE) no sangue arterial de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2).





Discussão

6. Discussão

A pneumonia é caracterizada por reação inflamatória em parênquima pulmonar, geralmente acompanhada por inflamação de brônquios, bronquíolos e pleura. Clinicamente manifesta-se por alterações no padrão respiratório, tosse, sons respiratórios anormais à auscultação, hipertermia, taquicardia, e anorexia (GONÇALVES et al., 2001; RADOSTITS, et al 2002). No presente estudo os ovinos portadores de pneumonia (G2) apresentaram menor peso quando comparados aos animais sadios (G1), corroborando com os achados de outros autores que também relataram diminuição da massa corporal associada à pneumonia (BACA-ESTRADA et al., 1995; STIPKOVITS et al., 2005; AL-QUDAH, 2009). Estudos experimentais e achados clínicos sugerem que a liberação de mediadores inflamatórios no curso da doença respiratória pode contribuir para o desenvolvimento de hipermetabolismo, diminuição da ingestão de energia e pode resultar em resposta inadequada à ingestão alimentar e, dessa forma, contribuir para as alterações nutricionais observadas nos pacientes com este tipo de enfermidade. As citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β) podem causar anorexia e estimular a proteólise, esta última através da ativação e da aceleração do sistema enzimático ubiquitina-proteossoma presente nos músculos esqueléticos periféricos (CREUTZBERG, 2003; DOURADO, 2006). Cabe ressaltar ainda que, se acentuada, a perda de massa corporal pode resultar em disfunção muscular periférica e diminuição da capacidade dos

animais em realizar exercícios, alterações importantes e que podem determinar o prognóstico e sobrevida do animal.

Os animais do grupo G1 não apresentaram sinais clínicos compatíveis com doença respiratória (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES e FEITOSA, 2008). Contudo, quatro animais sadios apresentaram taquicardia e os valores médios da FR desse grupo (G1) estava acima dos valores considerados normais para a espécie (FEITOSA, 2008). Tais achados poderiam indicar alterações cardiovasculares ou excitação psíquica (STÖBER, 1993). O fato de estes parâmetros mostrarem-se alterados de forma isolada, sem estarem associados a qualquer outro sinal clínico, reforça a hipótese de excitação psíquica e confirma a higidez do grupo G1. Normalmente ovinos sadios tornam-se agitados e excitados quando separados do grupo ou submetidos a estresse de procedimentos veterinários e de manejo (BALDOCK e SIBLY, 1990; HARGREAVES e HUTSON, 1990; SILVA et al., 2010), o que pode levar ao aumento fisiológico das frequências aferidas.

A elevação da temperatura retal observada em 45% (9/20 – 45%) dos animais com pneumonia (G2) foi estatisticamente significativa, e estava associada ao aumento das frequências cardíaca e respiratória, portanto, relacionada com a “síndrome febre” (RADOSTITS et al., 2002; FEITOSA, 2008).

A frequência respiratória aumentada é um dos mecanismos fisiológicos de compensação pulmonar na tentativa de manutenção das trocas gasosas (RADOSTITS et al., 2002; WILSON e LOFSTEDT, 2006). Quanto mais grave o processo, menor a eficiência das trocas gasosas e maior a necessidade de utilização dos mecanismos de compensação pulmonar (HINCHCLIFF e BYRNE, 1991; ANDREWS, 1992; PRINGLE, 1992; RADOSTITS et al., 2002). Este sinal clínico foi notado em 70% (14/20) dos animais do grupo doente (G2), sendo estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle (G1). Esse achado está de acordo com a literatura que afirma que o aumento da FR é um sinal importante no diagnóstico de afecções respiratórias (STÖBER, 1993; GARCIA et al., 1996; GONÇALVES e FEITOSA, 2008). No entanto, a FR deve ser avaliada com critérios na espécie ovina, devido sua fácil alteração pela simples contenção manual e manejo dos animais.

Com exceção do odor expiratório fétido ou pútrido, da posição ortopnéica e o aumento da frequência cardíaca, todos os sinais clínicos de origem respiratória ocorreram de forma estatisticamente significativa no grupo de animais portadores de pneumonia (G2). Contudo, sinais clínicos como, reflexo da tosse positivo, aumento da FR, aumento dos ruídos laringotraqueal e traqueobrônquico, secreção nasal, tosse, crepitação grossa e o frêmito torácico estavam presentes em cerca de 70% dos animais doentes e foram determinantes para a diferenciação entre os animais sadios e doentes, corroborando com os achados clínicos de outros autores no diagnóstico das afecções respiratórias (GONÇALVES, 1997; MARCONDES, 2007; GONÇALVES et al., 2011). Mesmo a sintomatologia observada nos animais do grupo doente (G2) sendo compatível com quadro de doença respiratória (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; WILSON e LOFSTEDT, 2006; GONÇALVES e FEITOSA 2008), nem todos os sinais clínicos observados foram determinantes para localizar o processo respiratório dentro das vias aéreas. Dessa forma, a análise dos sinais clínicos relacionados às vias aéreas posteriores e ao parênquima pulmonar são fundamentais para a definição do diagnóstico de pneumonia (BREEZE, 1985; RADOSTITS et al., 2002; MOHAMED e ABDELSALAM, 2008).

Entre os sinais clínicos que apresentaram ocorrência significativa nos ovinos com pneumonia estão a tosse espontânea, o reflexo da tosse positivo e a secreção nasal. De maneira geral, a tosse e a resposta positiva ao reflexo de tosse são indicativas de alterações no aparelho respiratório, caracterizando comprometimento da traquéia e manifestações iniciais da pneumonia (HINCHCLIFF e BYRNE, 1991; PRINGLE, 1992). O corrimento nasal se relaciona tanto à inflamação local (BELKNAP, 1993; CRANDELL, 1993; GONÇALVES e FEITOSA, 2008), como à secreção de origem brônquica e pulmonar, principalmente nos casos em que é bilateral (STÖBER, 1993; GONÇALVES e FEITOSA, 2008). Contudo, isoladamente, esses sinais clínicos são pouco específicos no que diz respeito à diferenciação e localização dos processos respiratórios.

O aumento na produção de líquido intersticial inflamatório, decorrente dos processos pneumônicos, conduz melhor os sons produzidos na respiração e explica a auscultação de área aumentada dos ruídos traqueobrônquico e

broncobronquiolar (PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; FEITOSA e GONÇALVES, 2008). Dezenove (19/20 – 95%) e 10 (10/20 - 50%) animais do grupo G2 apresentaram aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar, respectivamente, sendo que o aumento do ruído traqueobrônquico ocorreu em associação com o aumento do ruído broncobronquiolar em 50% (10/20 – 50%) dos casos de pneumonia. A crepitação é outro sinal de aumento de líquido inflamatório, embora nas vias aéreas e, dependendo da quantidade e da localização do líquido na árvore brônquica, produz sons diferentes à auscultação. Quando a quantidade de líquido é intensa nos brônquios de maior calibre, manifesta-se a crepitação grossa, enquanto que a deposição de líquido em brônquios menores induz à crepitação fina (STÖBER, 1993; GONÇALVES et al., 2001; GONÇALVES e FEITOSA, 2008). No grupo G2, o aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar estiveram associados à crepitação (seja ela grossa ou fina) em 90% (18/20) e 50% (10/20) dos casos de pneumonia, respectivamente, e a associação dos três sinais clínicos ocorreu em 50% (10/20) dos episódios da doença.

Corroborando com os achados de outros autores (GONÇALVES, 1997; MARCONDES, 2007; GONÇALVES et al., 2001; GONÇALVES et al., 2011), a crepitação grossa foi o sinal clínico presente na maioria dos animais com comprometimento pulmonar, indicando o envolvimento de brônquios e auxiliando na localização do processo respiratório dos animais em estudo (G2). A crepitação fina é um ruído patológico percebido durante o edema pulmonar ou fases iniciais ou de resolução das pneumonias (STÖBER, 1993; GONÇALVES e FEITOSA, 2008). Quando comparada à crepitação grossa (15/20 – 75%), a crepitação fina (11/20 - 55%) ocorreu com menor frequência nos animais do grupo G2. A menor frequência deste achado clínico nos animais doentes pode ser atribuída à fase intermediária de evolução do processo em que os ovinos foram examinados ou à dificuldade de auscultação quando esse sinal clínico está associado a outros de maior intensidade (GONÇALVES, 1997; GONÇALVES e FEITOSA, 2008).

Quando a quantidade de líquido inflamatório presente nas vias aéreas posteriores é grande e localizada em área próxima à parede torácica, observa-se frêmito torácico à palpação (MAREK e MÓCSY, 1965; BRAZ, 1981;

PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993). O frêmito torácico ocorreu em 60% (12/20) dos casos de pneumonia nos animais do grupo G2, sempre associado a outros sinais de comprometimento pulmonar, como aumento dos ruídos traqueobrônquico e/ou broncobronquiolar e crepitação grossa e/ou fina. A deposição de secreções nas vias aéreas posteriores determina modificação no fluxo de ar, provocando vibrações de tons mais graves, denominados roncosp (MAREK e MÓCSY, 1965; KOTLIKOFF e GILLESPIE, 1983 e 1984), ou tons mais agudos, chamados de sibilos (LEHRER, 1990; PRINGLE, 1992; STÖBER, 1993). Dos animais do grupo G2, 50% (10/20 – 50%) apresentaram sibilos e, embora sua ocorrência não tenha sido significativa, 10% apresentaram ronco à auscultação pulmonar. Esses achados são indicativos de bronquites (WILSON e LOFSTEDT, 1990; HINCHCLIFF e BYRNE, 1991; STÖBER, 1993) e, associados aos achados anteriormente descritos, reforçam a suspeita de comprometimento pulmonar.

Dentro desse contexto, o grupo de ovinos com processo pneumônico (G2) caracterizou-se pela maior ocorrência de sinais clínicos que, principalmente em associação, demonstraram comprometimento pulmonar (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; WILSON e LOFSTEDT, 2006; GONÇALVES et al., 2001; GONÇALVES e FEITOSA 2008), sendo fundamentais na busca do diagnóstico diferencial entre processos de via aérea anterior e posterior (STÖBER, 1993; RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES et al., 2001; GONÇALVES e FEITOSA 2008).

A dispnéia mista é outro sinal clínico bastante importante no que diz respeito à localização do processo respiratório nas vias aéreas e foi observada em 55% (11/20) dos animais do grupo G2, todos eles associados à posição ortopnéica (3/20 – 15%). Normalmente, esse distúrbio traduz consolidação pulmonar extensa, a ponto de interferir com as trocas gasosas (PRINGLE, 1992; RADOSTITS et al., 2002). Contudo tal fato não pode ser confirmado, uma vez que a percussão torácica não foi utilizada como método diagnóstico devido à dificuldade de sua execução em vista do comportamento irrequieto inerente à espécie ovina.

O odor respiratório fétido, apesar de sua ocorrência não ter sido significativa, esteve presente em 10% dos casos de pneumonia do grupo G2. Normalmente esse achado clínico reflete grande quantidade de pus em

decomposição nas vias aéreas (RADOSTITS et al., 2002; GONÇALVES e FEITOSA; 2008). Embora não seja possível atestar que o odor pútrido decorrente da destruição tecidual tenha origem pulmonar, cabe ressaltar que os animais que apresentaram este sinal clínico foram justamente aqueles cujo quadro clínico de pneumonia foi o mais grave entre os animais do grupo G2.

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 plasmáticos foi útil para confirmação da higidez do grupo G1, uma vez que todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados mantiveram-se dentro do intervalo dos valores de referência para a espécie (JAIN, 1993).

O leucograma e a determinação do fibrinogênio plasmático são, na Medicina Veterinária, os recursos laboratoriais mais comumente utilizados para avaliação dos processos inflamatórios, (McSHERRY et al., 1970; EK, 1972). As médias das contagens total de leucócitos e de neutrófilos nos animais doentes (G2) foram significativamente maiores que dos ovinos sadios, corroborando com outros autores que também demonstraram que a pneumonia provoca leucocitose por neutrofilia em ruminantes (MOHAMED e ABDELSALAM, 2008; AL-QUDAH, 2009). 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 e ABDELSALAM, 2008). Esse fato justifica a leucocitose por neutrofilia observada no grupo dos animais portadores da doença (G2), caracterizada principalmente por elevação acentuada de segmentados, fato comum nos processos inflamatórios e infecciosos (JAIN, 1993; LORENZI, 2003).

Todos os animais acometidos por pneumonia (G2) apresentaram neutrofilia, contudo, em sete animais (7/20 – 35%) a neutrofilia estava associada à leve elevação na contagem dos bastonetes. Mesmo que o aumento desta variável não tenha sido significativo, evidenciou leve desvio neutrofílico à esquerda regenerativo em alguns animais do grupo G2.

Foi observada linfopenia nos animais doentes havendo diferença significativa entre os dois grupos (G1 e G2). A linfopenia associada à leucocitose na resposta inflamatória ocorre por que algumas citocinas que promovem migração neutrofílica também atuam em linfócitos, retirando-os da circulação para os tecidos linfóides. Contudo, cabe ressaltar que o estresse inerente a resposta inflamatória, principalmente em sua fase aguda, aumenta a produção de glicocorticóide pelas adrenais, levando à linfopenia pelo sequestro de linfócitos da corrente sanguínea e destruição destes no tecido linfóide (KIDD, 1991; JAIN, 1993; SCHULTZE, 2000), fato que também pode ter contribuído para a linfopenia observada nos animais doentes (G2).

A discreta eosinofilia observada em alguns animais doentes do grupo G2 é um achado que pode ser compatível com quadros pneumônicos devido à ativação e degranulação eosinofílica mediada por complexos imunes de IgA secretora, imunoglobulina mais abundante na mucosa do trato respiratório e importantíssima para a defesa imunológica primária contra infecções locais (SACHER e McPHERSON, 2002; KERR 2003).

No grupo dos animais enfermos (G2) houve, também, leve aumento nos valores médios dos monócitos. Embora os valores deste leucócito tenham permanecido dentro dos padrões considerados normais para a espécie, a elevação estatisticamente significativa dos monócitos no grupo G2 pode ser um indicativo de uma tendência à cronificação do processo nos animais doentes (JAIN, 1993; KERR, 2003).

Assim, fazendo-se uma avaliação global nos achados do hemograma, constatou-se que ocorreu alteração na resposta leucocitária fisiológica da espécie ovina, nos animais portadores de pneumonia, visto que a relação neutrófilo:linfócito em ruminantes é da ordem de 0,5 (TAYLOR, 2000) ou da ordem de 30:70 (0,4) (KERR, 2003). Esta relação, em média, foi de $0,56 \pm 0,2$ no grupo de animais sadios (G1) e de $3,63 \pm 0,92$ no grupo de animais doentes (G2). Portanto, a pneumonia desencadeou elevação da relação neutrófilo:linfócito em torno de seis vezes à observada no grupo de animais sadios (G1).

O fibrinogênio é uma importante glicoproteína de fase aguda, produzida em maior quantidade na presença de afecções inflamatórias (KANEKO, 1997; HORADAGODA et al., 1999) e infecciosas (McSHERRY et al., 1970; SCHALM,

1977). Na análise comparativa do fibrinogênio nos grupos estudados, foi possível observar uma hiperfibrinogenemia duas vezes maior nos ovinos do grupo G2 quando comparado aos animais do grupo controle, demonstrando que a elevação do fibrinogênio é tão sensível quanto a leucocitose na detecção das doenças inflamatórias em ruminantes. O fibrinogênio é uma proteína sintetizada pelo fígado, cuja concentração plasmática eleva-se sob a ação estimuladora da interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral (TNF) liberados pelo processo inflamatório (ANDREWS et al., 1994). A concentração do fibrinogênio permanece elevada durante a ação da doença, decrescendo com a melhora do animal tornando-se assim um bom marcador e avaliador do processo em curso (SUTTON e HOBMAN, 1975). A reação inflamatória provocada pela pneumonia nos animais do grupo G2 induziu o aumento na produção de fibrinogênio pelo fígado, caracterizado pela hiperfibrinogenemia observada nos animais do grupo G2, corroborando com os achados de outros autores que também observaram aumento na concentração plasmática de fibrinogênio em animais portadores de pneumonia (DEMARTIN e DAVEI, 1977; PFEFFER e ROBERS, 1989; VESTWEBER et al., 1990; GANHEIM et al., 2003; AL-QUDAH, 2009).

A relação proteína total plasmática:fibrinogênio (PPT:FB) é usada para distinguir hiperfibrinogenemia causada por doença ou associada à desidratação. Isso porque a hemoconcentração produz aumento relativo de todos os componentes das proteínas plasmáticas, incluindo o fibrinogênio (McSHERRY et al., 1970; SUTTON e HOMAN, 1975; JAIN, 1993). A relação PPT:FB acima de 15 é considerada normal. Já valores entre 10 e 15 demonstram significativa elevação no fibrinogênio plasmático e sugerem processos inflamatórios (ALLEN e KOLD, 1988; LATIMER et al., 2003). No presente estudo, o valor médio da proteína total plasmática no grupo G2 foi de $7,84 \pm 1,02$ g/dL e a relação PPT:FB média de $11,2 \pm 2,22$ g/dL. Como esse valor permaneceu entre 10 e 15, a elevação do fibrinogênio observada nos animais do grupo G2 ocorreu devido ao processo inflamatório decorrente da pneumonia em curso no momento da colheita do sangue.

Nas doenças do trato respiratório há resposta imune inflamatória, caracterizada pela ativação de células endoteliais, células epiteliais, macrófagos residentes e o recrutamento e ativação de neutrófilos, eosinófilos,

monócitos e linfócitos. O grau em que isso ocorre e os tipos celulares envolvidos variam amplamente nas diferentes doenças que acometem o trato respiratório (VAN DER VLIET e CROSS, 2000; DUFLOO et al., 2002). As pneumonias têm como característica um rápido e maciço influxo de células fagocíticas da corrente sanguínea em direção às vias aéreas mais distais afetadas (BIRCAN et al., 2008). Os neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos, como parte da defesa do hospedeiro contra a infecção, produzem e liberam ERO em excesso após o contato com esses microorganismos (FARKHUTDINOV e FARKHUTDINOV, 2000; SORDILHO e AITKEN, 2009). A toxicidade das ERO liberadas por estimulação das células fagocíticas tem sido considerada um dos principais mecanismos de injúria pulmonar durante a inflamação e incriminada na patogênese da pneumonia em seres humanos e animais (LEDWOZYW e STOLARCZYK, 1992; KATSOULIS et al., 2005; CEMEK et al., 2006; AL-QUDAH, 2009).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a produção das ERO e o sistema antioxidante, levando a danos celulares se ERO se não for adequadamente contido (RAHMAN e MACNEE, 2000; COMHAIR e ERZURUM, 2002; SILVA e GONÇALVES, 2010). Os antioxidantes protegem as células contra a injúria oxidativa prevenindo a iniciação da peroxidação lipídica e produção final de produtos como as TBARS que, uma vez disponíveis, provocam danos celulares se ERO e irreversíveis (AL-QUDAH, 2009). No presente estudo todos os antioxidantes avaliados (SOD e GSH-Px) estavam significativamente diminuídos no grupo de animais portadores de pneumonia (G2), evidenciando o comprometimento das defesas antioxidantes nos ovinos doentes e a susceptibilidade à danos teciduais oxidativos à medida que a concentração de ERO aumentavam nesses animais. Corroborando com esses resultados, o decréscimo da atividade enzimática da SOD e da GSH-Px também foi relatado em bovinos e seres humanos portadores de pneumonia (LEDWOZYW e STOLARCZYK, 1992; KATSOULIS et al., 2005; CEMEK et al., 2006; AL-QUDAH, 2009).

A redução significativa da atividade enzimática da SOD nos animais portadores de pneumonia (G2) sugere que a doença levou ao aumento dos níveis de $O_2^{\cdot-}$ nos animais acometidos. Durante a explosão respiratória dos fagócitos o oxigênio molecular sofre redução enzimática para produzir

compostos germicidas. A reação chave na explosão respiratória é a redução do O_2 a $O_2^{\cdot-}$ por meio da enzima NDAPH-oxidase (BRANDT et al., 2003; PARK et al., 2009). Como a SOD representa a primeira linha de defesa do organismo contra o estresse oxidativo, devido a sua ação catalítica na reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , a sua atividade enzimática estava alterada na tentativa de neutralizar os efeitos deletérios provocados pelo excesso na produção dessas ERO durante a explosão respiratória das células fagocíticas recrutadas e/ou ativadas no ambiente pulmonar no curso da pneumonia. Ledwozyw e colaboradores (1992) relataram diminuição significativa na atividade enzimática da SOD em bezerros com broncopneumonia, correlacionando esse decréscimo com a elevação da concentração do $O_2^{\cdot-}$ e de leucócitos totais no sangue desses animais, sugerindo que a produção dessas ERO na pneumonia está realmente associada ao processo de fagocitose.

O H_2O_2 resultante da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela SOD é neutralizado pela ação da CAT e/ou por sucessivas reações mediadas pelas glutathionas, denominado ciclo redutor das glutathionas. Neste ciclo o H_2O_2 é reduzido por ação da GSH-Px, que utiliza a GSH como substrato doador de elétron, transformando-a em GSSG. Uma vez oxidada, a GSSG é convertida novamente em GSH pela ação da GSH-Rd. O ciclo redutor das glutathionas é também o principal mecanismo de remoção dos lipoperóxidos oriundos das reações de peroxidação lipídica (KINNULA e CAPRO, 2003; KINULLA, 2005; SILVA e GONÇALVES, 2010).

Em função da variação na concentração de H_2O_2 provocada pela ação da SOD, a atividade enzimática da GSH-Px também se alterou nos animais com pneumonia (G2), indicando que houve ativação do ciclo redutor das glutathionas e consumo da GSH-Px na tentativa de remover o excesso de H_2O_2 presente no ambiente pulmonar e impedir a formação do radical hidroxila, o estopim para a peroxidação lipídica (SILVA e GONÇALVES, 2010). Contudo, cabe ressaltar que, associado à redução da GSH-Px, houve também redução da GSH-t nos animais do grupo G2, demonstrando que o estresse oxidativo induzido pela doença não foi contido pelo ciclo redutor das glutathionas.

A atividade enzimática da GSH-Px depende da GSH, que atua como substrato doador de elétrons durante a conversão do H_2O_2 em água pela GSH-Px (RAHMAN e MACNEE, 2000; COMHAIR e ERZURUM, 2002; SILVA e GONÇALVES, 2010). A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento-SH presente na cisteína, sendo a GSH considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante celular (GALLEANO e PUNTARULO, 1995). Como a capacidade antioxidante da GSH está diretamente associada à atividade enzimática da GSH-Px, é possível que o consumo de GSH-Px tenha contribuído para diminuir a concentração de GSH no sangue dos ovinos portadores de pneumonia (G2). Como a glutatona em maior concentração nos eritrócitos dos mamíferos está sob a forma reduzida (MEISTER e ANDERSON, 1983; MACHEFER et al., 2004), o consumo de GSH pela GSH-Px provavelmente cooperou, juntamente com o decréscimo na atividade enzimática da GSH-Px, para a diminuição da GSH-t observada nos animais do grupo G2. Este achado sustenta a hipótese de que, uma vez que os danos oxidativos já tinham sido iniciados, o sistema de defesa antioxidante dos animais com pneumonia (G2) não foi suficiente para conter o aumento da produção de ERO.

Corroborando com os achados desse estudo, Cui et al. (1997) avaliou a GSH-Px no plasma de crianças com idade abaixo de 10 anos e portadoras de pneumonia e comparou esses resultados com indivíduos saudáveis, observando diminuição da atividade enzimática da GSH-Px no grupo portador de pneumonia. Ao avaliar o sangue de bezerros com pneumonia, Al-Qudah (2009) observou que os animais com broncopneumonia aguda apresentaram atividade enzimática da GSH-Px e concentração de GSH elevadas, enquanto que os animais portadores de forma crônica da doença apresentaram menor atividade enzimática da GSH-Px e decréscimo na concentração de GSH. Segundo o autor, a elevação da atividade enzimática da GSH-Px nos animais com broncopneumonia crônica pode ser resultado da massiva e duradoura produção de ERO no ambiente pulmonar devido à longa duração do processo pneumônico, levando ao esgotamento do sistema antioxidante e a danos severos na estrutura pulmonar. Nos casos agudos a rápida ativação do sistema antioxidante pode, por sua vez, ter limitado a produção de ERO ainda no início da doença, antes que as quantidades de GSH-Px se tornassem

insuficientes para a remoção dos peróxidos lipídicos. Embora a diferenciação entre pneumonia aguda e crônica não tenha sido feita nesse estudo, o esgotamento do sistema antioxidante observado nos animais com pneumonia sugere que os ovinos desse estudo estão doentes há algum tempo.

Outro fato que sustenta essa hipótese são as características de disseminação da inflamação no ambiente pulmonar. Basicamente, as pneumonias são provocadas pela reação inflamatória decorrente da penetração de agentes infecciosos no trato respiratório posterior. Nas fases iniciais, o processo pneumônico normalmente fica restrito a apenas um foco pulmonar. A disseminação da lesão inflamatória pelos pulmões ocorre principalmente por contiguidade, mas também pode se dar pela passagem de material infeccioso por bronquíolos e vasos linfáticos e, assim, originar vários focos de infecção que se desenvolvem simultaneamente (ROBBINS et al., 2005; RADOSTITS et al., 2002). Os ovinos com pneumonia (G2) apresentaram sinais de reação inflamatória aguda, como hiperfibrinogenemia e leucocitose com neutrofilia. Contudo, as características de disseminação do processo inflamatório pulmonar permitem supor que focos recorrentes da doença podem ter ocorrido nos animais do grupo G2 e isso ter contribuído para a manutenção da reação inflamatória no ambiente pulmonar por um período prolongado e, conseqüentemente, para diminuição considerável da reserva antioxidante nesses animais.

Apesar do H_2O_2 ser considerado uma ERO fraca, sua estabilidade permite que ele atravesse membranas celulares e se difunda pela célula, facilitando sua união a elétrons provenientes de metais de transição como o Fe^{2+} ou o Cu^{2+} através das reações de Fenton e Haber-Weiss (SCHIMMEL e BAUER, 2002; GURZAU et al., 2003; GRUNDY et al., 2004), gerando $OH^\bullet$, uma das ERO mais reativas que o organismo pode produzir, capaz de desencadear a peroxidação das membranas lipídicas (RAHMAN e MACNEE, 2000; COMHAIR e ERZURUM, 2002; SILVA e GONÇALVES, 2010). O aumento estatisticamente significativo da concentração de TBARS nos animais acometidos por pneumonia (G2) sustenta essa hipótese. As TBARS (principalmente o MDA) são produtos finais da peroxidação lipídica dos ácidos graxos insaturados das membranas celulares e, por isso, consideradas marcadores de lesão tissular (BEZERRA et al., 2004). O processo de

peroxidação lipídica inicia-se em membranas celulares, especialmente na membrana interna da mitocôndria, quando o radical $\text{OH}^\cdot$ busca abstrair o hidrogênio das ligações C-H da cadeia dos ácidos graxos insaturados. Como consequência, observa-se perda de integridade, permeabilidade e fluidez da membrana atingida (ANTUNES-NETO et al., 2005). Neste contexto, os dados deste experimento revelam que a pneumonia induziu a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, lesão tecidual, confirmada pela alteração dos valores de TBARS nos eritrócitos dos animais do grupo G2.

Vários estudos já relataram o aumento da concentração de TBARS no sangue periférico de seres humanos e animais portadores de pneumonia (KATSOULIS et al., 2005; CEMEK et al., 2006; AL-QUDAH, 2009). Al-Qudah (2009) observou aumento da concentração de TBARS em bezerros portadores de broncopneumonia, sendo mais evidente nos animais que se encontravam no estágio crônico da doença, sugerindo que a manutenção da produção de ERO durante a doença crônica pode exacerbar os danos oxidativos nos pulmões. Cemek e colaboradores (2006) por sua vez observaram acréscimo na concentração de TBARS no sangue de crianças com pneumonia aguda. Kolhir et al. (1998) investigaram o efeito da terapia antioxidante sobre a peroxidação lipídica em seres humanos com pneumonia e observaram concentrações elevadas de TBARS no sangue de pacientes, durante as fases aguda e subaguda da doença, que antecederam o tratamento.

A atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT e a determinação da concentração das TBARS são comumente utilizadas para avaliar a capacidade de defesa do organismo contra a ação das ERO e os possíveis danos às estruturas celulares decorrentes de sua atuação. Alguns autores sugerem que o aumento da produção de citocinas durante a fase inicial do processo inflamatório está associado com a atividade prejudicada das enzimas SOD, GSH-Px e CAT, o que resulta em aumento do estresse oxidativo e dano celular, verificado pelo incremento da apoptose celular (LINKE et al. 2005). Segundo MCINTYRE et al. (1997), a extensão dos eventos inflamatórios e das injúrias eventualmente provocadas por eles está diretamente relacionada à intensidade do estímulo inicial e aos mecanismos imunológicos que são ativados durante o processo. A ocorrência da pneumonia nos animais do grupo G2 deflagrou e exacerbou a resposta inflamatória pulmonar e a liberação de

mediadores químicos nos momentos que se seguiram. Essa sequência de eventos culminou em estresse oxidativo refletido na diminuição da atividade enzimática da SOD e GSH-Px e da concentração de GSH-t no sangue dos ovinos doentes. A peroxidação lipídica com consequente dano tecidual também ocorreu, visto que a concentração de TBARS estava elevada nos animais do grupo G2.

Os distúrbios ácido-básicos e as alterações nas trocas gasosas provocados pela inflamação das vias aéreas distais e espaços alveolares nos animais com pneumonia podem ser determinados através do exame hemogasométrico, sendo, nesse caso, obrigatório o emprego de amostras de sangue arterial para a determinação (FERRO et al., 2002; SOBIECH et al., 2005; GUNES e ATALAN, 2006; BLUEL et al., 2007; MOTA e QUEIROZ, 2010). Apesar da opinião geral ser a mesma sobre a importância da coleta de sangue arterial para a realização da gasometria, existem opiniões divergentes sobre vários aspectos, especialmente em relação à posição do animal no momento da colheita (em estação ou decúbito) e local da punção (grandes artérias centrais, pequenas artérias periféricas), isso por que esse fatores podem alterar os valores e correlações das variáveis gasométricas, em particular os de pH e gases sanguíneos (NAGY et al., 2002).

Vários autores relacionaram os valores dos gases sanguíneos com a posição dos animais no momento da coleta. Houve unanimidade entre os autores com relação à dificuldade de se manter os animais conscientes em decúbito lateral para a colheita do sangue arterial, sem falar na necessidade da rápida execução da colheita de modo a evitar que o estresse da contenção altere os resultados do exame (STEWART et al., 1984; ADAMS et al., 1991; WAGNER et al., 1990). Cabe ressaltar ainda que o decúbito lateral reduz a absorção de oxigênio e a liberação de dióxido de carbono (CO₂) pelos pulmões, fazendo com que os resultados da gasometria sejam afetados pelo posicionamento dos animais durante a colheita, principalmente naqueles animais com depressão respiratória (STEWART et al., 1984; ADAMS et al., 1991; WAGNER et al., 1990; UYSTEPRUYSTE et al., 2002; BLUEL et al., 2007)

Nos cães, a punção arterial geralmente é feita nas artérias femoral e dorsal podal, embora a artéria radial e seus arcos palmares digitais possam ser

utilizados. Nos gatos, a artéria femoral é normalmente o único vaso suficientemente grande para permitir a colheita do sangue com sucesso (PROULX, 1999). A artéria carótida costuma ser o vaso de eleição na espécie equina (YAMASHITA et al., 2000; PADILHA et al., 2004; ART et al., 2006). Nos bezerros e bovinos adultos, vários possíveis locais de coleta de sangue arterial já foram descritos, com destaque para as artérias maxilar, auricular caudal, carótida, coccígea e caudal mediana (SLANINA et al 1992;. MUDROÑ 1998; NAGY et al. , 2001; NAGY et al., 2002). Contudo, esses autores pouco descrevem sobre suas experiências e opiniões, vantagens e desvantagens de cada técnica e o grau de confiabilidade do material colhido.

Dentro deste contexto, optou-se por fazer o acesso arterial com os animais em estação, de modo a evitar alterações nos resultados da gasometria advindo do mau posicionamento dos animais no momento da colheita. Além disso, achados recentes na literatura a respeito de colheitas bem sucedidas de sangue a partir da artéria carótida com animais em estação na espécie equina e bovina, especialmente em bezerros, cujo porte físico se assemelha ao de ovinos com até um ano de idade (ROSE e ROSDALE, 1981; MUYLLE et al. 1996; NAGY et al., 2002; ART et al., 2006), indicam ser possível a utilização deste acesso também em ovinos.

Apesar da demonstração de resistência à punção arterial em seis animais (6/40 – 15%), as amostras de sangue foram colhidas com sucesso em todos os animais que participaram do estudo (40/40 – 100%). É possível que a recusa observada nos seis animais à execução do procedimento esteja associada à dor da punção arterial que, quando comparada à punção venosa, parece ser bem mais dolorosa (GOUVÊA, 2009; ONMAZ et al., 2009; MARCATTO et al., 2010). A colheita de sangue arterial é bastante difícil e pode resultar em complicações como coágulo intravascular, sangramento excessivo, formação de hematoma, infecção e trombose arterial ou embolismo, que podem até levar à isquemia do local irrigado pela artéria (WILLIAMS, 1998; GUNES e ATALAN, 2006; BLUEL et al., 2007; ONMAZ et al., 2009; KHAN et al., 2010). Com exceção do hematoma apresentado pelos seis animais (6/40 – 15%) que demonstraram resistência à colheita de sangue arterial, nenhuma outra complicação decorrente da punção foi observada nos animais deste

estudo, demonstrando que a punção carotídea com o animal em estação é segura e adequada para a obtenção de sangue arterial na espécie ovina.

Qualquer disfunção que interfira na ventilação pulmonar e/ou nas trocas gasosas, como obstrução respiratória anterior e posterior, pneumotórax, enfisema e pneumonias, pode causar acidose respiratória (ATKINS e CALGARY, 1969; FERRO et al., 2002; NOBLE, 2009; GOUVÊA 2009). Esta condição tem sido observada em bezerros neonatos com pulmão imaturo ou clones com suspeita de hipertensão pulmonar (GOUVÊA 2009), bovinos portadores de pneumonia (PICKEL et al., 1989; GUNES e ATALAN, 2006), seres humanos com pneumonia e falência respiratória (LEVIN et al., 2001; CHU et al., 2003; PIFFERIA et al., 2005) e, em equinos com obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) (FERRO et al., 2002). Nessas situações o distúrbio ácido-básico ocorre por retenção de CO_2 e o acúmulo deste gás no sangue leva ao aumento da PaCO_2 e, conseqüentemente, da TCO_2 . Na corrente sanguínea o CO_2 reage com a água e essa reação química produz o ácido carbônico, reduzindo, portanto, o pH do sangue (PICCIONE et al., 2006). A diminuição do pH do sangue é chamada acidemia, enquanto o distúrbio resultante desta redução recebe o nome de acidose (MOTA e QUEIROZ, 2010). A análise dos resultados da gasometria arterial dos animais neste estudo revelou aumento significativo da PaCO_2 e da TCO_2 e queda nos valores de pH nos animais do grupo G2, sugerindo que a pneumonia induziu um quadro de acidose por hipercapnia nos animais doentes.

As respostas compensatórias aos distúrbios ácido-básicos do organismo ocorrem nos pulmões e nos rins, órgãos pivôs na excreção de ácidos do corpo (NOBLE, 2009; MOTA e QUEIROZ, 2010). Os pulmões somente podem excretar ácido volátil (CO_2), o qual é eliminado pela ventilação. Para tal, há aumento da frequência e amplitude dos movimentos respiratórios. Apesar de rápida, na maioria das vezes a resposta pulmonar não é suficiente para corrigir a acidose (MOTA e QUEIROZ, 2010). Nestes casos, a compensação renal, apesar de lenta, é mais eficaz, e cursa com aumento na excreção de íons H^+ , pela urina, tornando-a mais ácida, e incremento na reabsorção de HCO_3^- pelos túbulos renais, o que aumenta a reserva de bases do organismo (ATKINS, 1969; ORTOLANI, 2003; NOBLE, 2009; GOUVÊA, 2009 MOTA e QUEIROZ, 2010). No presente estudo, o aumento significativo da concentração de HCO_3^-

no sangue arterial dos animais portadores de pneumonia (G2) ocorreu juntamente com a elevação dos valores EB, sugerindo que os mecanismos de compensação dos distúrbios ácido-básicos foram acionados nos ovinos doentes na tentativa de corrigir a alteração do pH sanguíneo.

Assim, fazendo-se uma análise geral dos resultados da gasometria dos animais deste estudo pode-se dizer que a pneumonia induziu alterações no equilíbrio ácido-base dos animais doentes (G2), caracterizado por acidose por hipercapnia e elevação compensatória da concentração de bicarbonato sanguíneo. Apesar desses achados, ao analisarmos os resultados da PaO_2 e da SO_2 , não foi possível observar alteração significativa entre os grupos estudados (G1 e G2), sugerindo que, apesar da pneumonia ter provocado alterações no sistema tampão dos animais doentes, essas mudanças não repercutiram sobre a função de oxigenação pulmonar desses animais.

Uma possível justificativa para este achado seria o perfil anatomopatológico das pneumonias que normalmente acometem os ovinos. Grande parte dos quadros pneumônicos nessa espécie tem ocorrência focal. Os lobos pulmonares, apical e cardíaco, são geralmente os mais afetados, e, nos casos mais graves, porções substanciais do lobo diafragmático também podem ser acometidas (BROGDEN et al., 1998; LOPEZ, 2001; MOHAMED e ABDELSALAM, 2008). Segundo Silva e colaboradores (2010), em casos de pneumonias de apresentação focal é comum que as partes não afetadas do pulmão compensem a insuficiência funcional das áreas lesionadas. Dentro deste contexto é possível que os quadros pneumônicos dos animais do grupo G2 tenham sido, em sua maioria, focais, e que a compensação funcional da região pulmonar não comprometida possa ter contribuído para a manutenção dos níveis normais da PaO_2 . Esta hipótese também explicaria os achados aparentemente contraditórios entre a reação inflamatória aguda demonstrada pelos resultados hematológicos e a crônica, apontada pelo estudo das ERO. Contudo, apenas uma avaliação *post mortem* dos animais poderia confirmar esta suspeita.

A escolha da artéria carótida esquerda para a realização da punção arterial é outro ponto a se considerar. Vestweber et al., (1977) compararam os valores da PaO_2 obtida a partir de sangue arterial colhidos nas artérias coccígea e carotídea de bezerras sadias e observaram que os valores dessa

variável na artéria coccígea foram muito mais baixos (média de 77 mmHg) quando comparados a artéria carótida (99,7 mmHg), contudo os autores não apresentaram qualquer explicação que justificassem seus achados. Mais tarde Fisher e colaboradores (1980) encontraram resultados semelhantes ao comparar os valores da PaO_2 obtida a partir do sangue das artérias carótida e auricular caudal. Segundo esses autores, artérias localizadas longe do coração tendem a ter menores valores para PaO_2 , isso por que um pouco do oxigênio é aparentemente consumido durante a perfusão dos tecidos encontrados entre o coração e as artérias mais periféricas. Como a artéria carótida esquerda se origina a partir da artéria aorta, maior e mais importante artéria do sistema circulatório, que nasce do ventrículo esquerdo do coração e que transporta sangue arterial recém saído dos pulmões, é possível que as amostras de sangue obtidas da artéria carótida dos ovinos avaliados realmente apresentem valores mais elevados da PaO_2 , contribuindo para as diferenças nos resultados obtidos nesse estudo.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o retardo da espécie ovina para demonstrar os sinais clínicos frente às enfermidades. Com base em vivência prática, os ovinos, quando comparado aos bovinos no que diz respeito à evolução das doenças respiratórias, demoram mais tempo para mostrar sinais clínicos compatíveis com distúrbio respiratório grave. Quando esses sintomas se manifestam o animal normalmente está em estágio avançado da doença, sendo a sua recuperação, mesmo com tratamento adequado, difícil. Os achados de Silva e colaboradores (2010) sustentam essa hipótese. Ao realizarem biopsia pulmonar em um ovino que se apresentava clinicamente sadio, esses autores obtiveram diagnóstico pneumonia intersticial, demonstrando que ovinos com pneumonia laboratorialmente diagnosticada podem apresentar-se clinicamente estáveis e sem perda aparente da função de oxigenação pulmonar. Como ao exame clínico, nenhum dos animais doentes (G2) apresentou um quadro respiratório compatível com doença pulmonar grave, único momento da doença em que os ovinos normalmente demonstram severo comprometimento respiratório. É possível que a resistência aos processos respiratórios inerente à espécie ovina tenha contribuído para a manutenção da função de oxigenação pulmonar e, conseqüentemente, dos teores normais da PaO_2 nos animais deste estudo.

Conclusões

7. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados nas condições experimentais realizadas, podemos concluir:

- A presença ou a associação de sinais clínicos compatíveis com distúrbios respiratórios de vias aéreas posteriores e parênquima pulmonar confirmaram o diagnóstico de pneumonia.
- Os sinais clínicos mais freqüentes nos animais pneumônicos foram reflexo da tosse positivo, aumento do ruído laringotraqueal, secreção nasal, tosse, aumento das freqüências cardíaca e respiratória, bem como presença de crepitação (grossa ou fina), ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar aumentado, frêmito torácico, ronco e sibilo que estiveram presentes e associados nos ovinos portadores de pneumonia.
- Os ovinos portadores de pneumonia apresentaram reação inflamatória evidenciada por leucocitose com neutrofilia e hiperfibrinogenemia
- Quando comparada ao leucograma, a análise do fibrinogênio e proteína total plasmáticos foi tão sensível quanto para a avaliação do processo inflamatório decorrente da pneumonia.
- A pneumonia em ovinos provoca danos teciduais e celulares expressivos em nível pulmonar, uma vez que induz peroxidação lipídica mensurada por determinação da concentração de TBARS.
- Ovinos portadores de pneumonia apresentaram diminuição nas atividades enzimáticas da SOD e GSH-Px e da concentração da GSH-t,

demonstrando desequilíbrio entre a produção e remoção de agentes oxidantes e, conseqüentemente, estresse oxidativo.

- O acesso arterial por punção da artéria carotídea esquerda com o animal em estação é segura e adequada para obtenção de sangue arterial na espécie ovina.
- A pneumonia provoca alterações significativas no equilíbrio ácido-base dos ovinos, caracterizadas por acidose por hipercapnia e elevação compensatória da concentração de bicarbonato sanguíneo, sem que houvesse, contudo, detrimento da função de oxigenação pulmonar.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

ACKERMANN, M.R.; GALLUP, J.M.; ZABNER, J.; EVANS, R.B.; BROCKUS, C.W.; MEYERHOLZ, D.K.; GRUBOR, B.; BROGDEN, K.A. Differential expression of sheep beta-defensin-1 and -2 and interleukin 8 during acute *Mannheimia haemolytica* pneumonia. *Microb. Pathog.*, v.37, n.1, p.21–27, 2004.

ADAMS, R.; HOLLAND, M. D., ALDRIDGE, B., GARRY, F. B. & ODDE, K. G. Arterial blood sample collection from the newborn calf. *Vet. Res. Commun.*, v.15, n.5, p.387-394, 1991.

ALLEN, B.V.; KOLD, S.E. Fibrinogen response to surgical tissue trauma in the horse. *Equine Vet. J.*, v.20, n.6, p.441-443, 1988.

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

AL-SULTAN, I. I.; AITKEN, I.D. Promotion of *Pasteurella haemolytica* infection in mice by iron. *Res. Vet. Sci.*, v.36, n.3, 385–386, 1984.

AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA M.R.; CARMELLO M.J.; PADOVANI C.R. Efeito da administração de Oxfendazol, Ivermectina e

Levamisole sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.38, n.29, p.31-38, 1992.

ANDRADE JÚNIOR, D.R.; DE SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Brás. Pneumol.*, v.31, n.1, p.60-68, 2005.

ANDREOLI, T.E.; ABUL-EZZ, S.R. Distúrbios hidroeletrólíticos. In: ANDREOLI, T.E. *Medicina Interna Básica*. 5.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.211-224.

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.

ANDREWS, D. A.; REAGAN, W.J.; DeNICOLA, D.B. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, v.16, n.10, p.1349-1357, 1994.

ANTUNES-NETO, J.M.F.; JOAQUIM, M.F.; SILVA, L.P.; MACEDO, D.V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Rev. Bras. Ciênc. Mov.*, v.13, n.3, p.73-79, 2005.

ART, T.; FRANK, T.; LEKEUX, P.; DE MOFFARTS, B.; COUËTIL, L.; BECKER, M.; DEBY-DUPONT, G.; SERTEYN, D. Myeloperoxidase concentration in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and those with recurrent airway obstruction. *Can. Vet. J.*, v.70, n.4, p.291-296, 2006.

ART, T.; KIRSCHVINK, N.; SMITH, N. LEKEUX, P. Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.*, v.31, n.5, p.397-401, 1999.

ATKINS, E.L. Assessment of acid-base disorders - a practical approach and review. *Can. Med. Ass. J.*, v.100, n.21, p.992-998, 1969.

BACA-ESTRADA, M.E.; GODSON, D.L.; HUGHES, H.P.A.; VAN DONKERSGOED, J.; VAN KESSEL, A.; HARLAND, R.; SHUSTER, D.E.; DALEY, M.; BABIUK, L.A. Effect of recombinant bovine interleukin-1 β on viral/bacterial pneumonia in cattle. *J. Interferon Cytokine Res.*, v.15, n.5, p.431-439, 1995.

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.

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

BEZERRA, F.J.L.; REZENDE, A.A.; RODRIGUES, S.J.; ALMEIDA, M.G. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v.54, n.5, p.640-649, 2004.

BIANCHI, P.D. 2003. *Avaliação da função pulmonar e estresse oxidativo em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise*. Dissertação de Mestrado em Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 125p.

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.

BLANCO, S.L.; TRIGO, T.F.J.; JARAMILLO, M.L; AGUILAR, R.F.; TAPIA, P.G.; SUÁREZ, G.F. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet. Méx.*, v.24, n.2, p.107-112, 1993.

BLEUL, U.; LEJEUNE, B.; SCHWANTAG, S.; KÄHN, K. Blood gas and acid base analysis of arterial blood in 57 newborn calves. *Vet Rec.*, v.161, n.20, p.688-691, 2007.

BOWIER, R.P.; CAPRO, J.D. Oxidative stress in airways: is the role for extracellular superoxide dismutase? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.166, sup.1, p.S38-S43, 2002.

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.

BRANDT, C.T.; LEITE, C.R.C; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; BRANDT FILHO, C.; CASTRO, C.M.M.B. Aderência e atividade microbica de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica cirúrgica. *Acta Cir. Bras.*, v.18, n.2, p.143-153, 2003.

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.; LEHMKUHL, 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.

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

CANTIN, A.M.; FELS, G.A.; HUBBARD, R.C.; CRYSTAL, R.G. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.*, v.86, n.3, p.962–971, 1990.

CARDOSO, J. Fisiopatologia Respiratória: da biopatologia à exploração funcional. *Ver. Portug. Pneumo.*, v.3, n.4, p.429-439, 1997.

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

CEMEK, M.; AKSEN, H.C.; LU, F.B.; CEMEK, F.; DEDE, S. Oxidative stress and enzymic–non-enzymic antioxidant responses in children with acute pneumonia. *cell biochemistry and function. Cell Biochem. Funct.*, v.24, n.3, p.269-273, 2006.

CHOW, C.; ABREU, M.T.H.; SUZUKI, T.; DOWNEY, G.P. Oxidative stress and acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v.29, n.4, p.427–431, 2003.

CHU, Y.C.; CHEN, C.Z.; LEE, C.H.; CHEN, C.W.; CHANG, H.Y.; HSIUE, T.R. Prediction of arterial blood gas values from venous blood gas values in patients with acute respiratory failure receiving mechanical ventilation. *J. Formos Med. Assoc.*, v.102, n.8, p.539–543, 2003.

COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, v. 283, n.2, p.L246-L255, 2002.

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.

CREUTZBERG, E. Leptin in relation to systemic inflammation and regulation of the energy balance. *Eur. Respir. Mon.*, v.24, p.56-66, 2003.

CUI, H.; YIN, S.A.; GAO, H.; LI, G. The comparison of selenium status between the children suffering from pneumonia and the normal children from kindergarten. *Wei. Sheng Yan. Jiu.*, v.26, n.2, p.42–24, 1997.

DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. *Diabetes Clínica*, v. 5, n. 5, p. 355-361, 2002.

DELCLAUX, C.; AZOULAY, E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur. Respir. J.*, v.22, supl.42, p.10S–14S, 2003.

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.

DIMRI, U.; LONKAR, P.S.; SRIVASTAVA, C.P.; BHAGWAN, P.S.K. An outbreak of pneumonia due to *Pasteurella multocida* in sheep. *Indian Vet. J.*, v.71, n.12, p.1163-1167. 1994.

DOURADO, V.Z.; VALE, S.A.; FAGANELLO, M.M.; SANCHEZ, F.F.; GODOY, I. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J. Bras. Pneumol.*, v.32, n.2, p.161-71, 2006.

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.

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.

FARIAS, M.T.; BORDIN, E.L.; FORBES, A.B.; NEWCOMB, K. A survey on resistance to anthelmintic in sheep stud farms of southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 72, p. 209-214. 1997.

FARKHUTDINOV, U.R.; FARKHUTDINOV, R.R. Free-Radical Oxidation during experimental pneumonia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v.129, n.3, p.260-264, 2000.

FEITOSA, F.L. *Semiologia Veterinária – A Arte do Diagnóstico*. 1.ed. São Paulo: Roca, 2008. 424p.

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.

FERRO, E.; FERRUCCI, F.; ZUCCA, E.; DI FABIO, V.; CASTOLDI, S. Arterial blood gas analysis in 53 racehorses with a diagnosis of small airway inflammatory disease (SAID). *J. Equine Vet. Sci.*, v.22, n.4, p.165-168, 2002.

FISCHER, E.W.; SIBARTIE, D.; GRIMSHAW, W.T.R. A comparison of the pH, pCO₂, pO₂ and total CO₂ content in blood from the brachial and caudal auricular arteries in normal cattle. *Br. Vet. J.*, v.136, n.5, p.496-499, 1980.

FISHMAN, A.P. *Diagnóstico das doenças pulmonares*. 1.ed. São Paulo: Editora Manole, 1992. 299p.

FREITAS, M.D.; FACURY FILHO, E.J.; et al. Determinação do perfil hidroeletrólítico e do equilíbrio ácido-básico de bezerras híginas de três aos trinta dias de idade. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, Ciência Animal Brasileira*, Supl.1, p.70-75, 2009.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, v.127, n.2-3, p.321-326, 1995.

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.

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. 87p.

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

GONÇALVES, R.C.; FEITOSA, F.L. 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. *Rev. Ciênc. Rural*, v.31, n.2, p.263-269, 2001.

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.

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.

GOUVÊA, L.V. 2009. *Análise hemogasométrica arterial e venosa de ovinos submetidos à transposição carotídea e indução de desequilíbrios ácido básicos*.

Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Universidade Federal de Brasília, Brasília. 49p.

GRUNDY, M.A.; GORMAN, N.; SINCLAIR, P.R.; CHORNEY, M.J.; GERHARD, G.S. High-throughput non-heme iron assay for animal tissues. *J. Biochem. Biophysical Methods*, v.59, n.2, p.195-200, 2004.

GUNES, A.V.; ATALAN, G. Comparison of ventral coccygeal arterial and jugular venous blood samples for pH, pCO₂, HCO₃, Beecf and ctCO₂ values in calves with pulmonary diseases. *Res. Vet. Sci.*, v.81, n.1, p.148-151, 2006.

GURZAU, E.S. NEAGU, C.; GURZAU, A.E. Essential metal – case study on irion. *Ecotoxicol. Enveron. Saf.*, v.56, n.1, p.190-200, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radical in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press, 1999. Cap. 4, p.189-276.

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.

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.

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.

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

KATSOULIS, K.; KONTAKIOTIS, T.; BALTOPOULOS, G.; KOTSOVILI, A.; LEGAKIS, I.N. Total Antioxidant Status and Severity of Community-Acquired Pneumonia: Are They Correlated? *Respiration*, v.72, n.4, p.381–387, 2005.

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

KHAIR, O.A.; DAVIES, R.J.; DEVALIA, J.L. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J.*, v.9, n.9, p.1913–1922, 1993.

KHAN, Z.H. SAMADI, S.; SADEGHI, M.; ALEMOHAMMAD, M.G; ZANJANI, A.P.; ADINE-HASHTJIN, S.; MAKAREM, J. Prospective Study to Determine Possible Correlation Between Arterial and Venous Blood Gas Values. *Acta Anaesthesiol. Taiwan*, v.48, n.3, p.136–139, 2010.

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

KIMBERLING, C. V. Jensen and swift's diseases of sheep. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988.

KINNULA, V.L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway disease. *Thorax*, v.60, n.8, p.693-700, 2005.

KINNULA, V.L.; CRAPO, J.D. Superoxide dismutase in the lung and human lung disease. *Am. J. Respir, Crit, Care Med.*, v. 167, n.12, p. 1600-1619, 2003.

KINNULA, V.L.; CRAPO, J.D.; RAIVIO, K.O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab. Invest.*, v. 73, n.1, p. 3-19, 1995.

KIRSCHIVIK, N.; LEKEUX, P. Oxidants and Airway Inflammations. In: THIRD WORLD EQUINE AIRWAYS SIMPOSIUM, 2005, Nova York. *Proceedings of...* Nova York: Cornell University, 2005. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/WEAS/2005/toc.asp>> Acesso em: 3 de out. 2009.

KOLHIR, V.K.; BYKOV, V.A.; TESELKIN, Y.O.; BABENKOVA, I.V.; TJUKAVKINA, N.A.; RULENKO, I.A.; KOLESNIK, Y.A.; EICHHOLZ, A.A. Use of a new antioxidant diquertin as an adjuvant in the therapy of patients with acute pneumonia. *Phytother Res.*, v.12, n.8, p.606-608, 1998.

KOTLIKOFF, M.I., GILLESPIE, J.R. Lung sounds in veterinary medicine: Part I. Terminology and mechanisms of sound production. *Compendium Continuing Education Practicing Veterinarian*, Yardley, 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.

LANINA, L.; NAGY, O.; EDOVIÂ, M.; STRUHÁRIKOVÁ, J. Dynamik des Säure-Basen Haushaltes des venösen und arteriellen Blutes bei klinisch gesunden Kälbern. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, v.99, p.82-186, 1992.

LANSING, M.W.; MANSOUR, E.; AHMED, A.; CORTES, A.; GARCIA, L.; LAUREDO, I.T.; WANNER, A.; ABRAHAM, W.M. Lipid mediators contribute to oxygen radical induced airways response in sheep. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.144, n.6, p.1291-1296, 1991.

LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology*, 2nd ed. Iowa: Blackwell Publishing Company, 2003. 450p.

LEAL, M.L.R.; SOARES, P.C.; BERTAGNON, H.G.; SILVA, P.E.G.; ORTOLANI, E.L. BENESI, F.J. Efeito da refrigeração sobre o exame hemogasométrico em sangue de ovinos. *Braz. J. Vet. Res. Sci.*, v.43, sup., p.80-85, 2006.

LEDWOZYW, A.; STOLARCZYK, H. The involvement of polymorphonuclear leukocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves. VI. Superoxide dismutase and lipoprotein lipase activities. *Acta Vet. Hung.*, v.40, n.4, p.267-277, 1992.

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.

LEVIN, K.P.; HANUSA, B.H.; ROTONDI, A.; SINGER, OLE, H.M.; MARRIE, T.J.; KAPOOR, W.N.; FINE, M.J. Arterial blood gas and pulse oximetry in initial management of patients with community-acquired pneumonia, *JGIM*, v.16, n.9, p.590-598, 2001.

LINKE, A.; ADAMS,V.; SCHULZE, P.C.; ERBS, S.; GIELEN, S.; FIEHN, E. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*, v.111, n.14, p.1763-1770, 2005.

LISBÔA, J.A.N. 2000. *Equilíbrio ácido-básico em bezerras sadias da raça holandesa, no primeiro mês de vida – influencia do fator etário*. Tese de

Doutorado em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 113p.

LOPES, A. Respiratory System, Thoracic Cavity and Pleura. In: McGAVIN, D.; CARLTON, W.W.; ZACHARY, J. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. 3.ed. Baltimore: Mosby-Year Book, p.125–195, 2001.

LORENZI, T.F. Anemias In: Lorenzi T.F. *Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica*. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. p.193-288.

MACHEFER, G.; GROUSSARD, C.; RANOU-BEKONO, F.; ZOUHAL, H.; FAURE, H.; VICENT, S.; CILLARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Extreme running competition decrease blood antioxidant defense capacity. *J. Am. Coll. Nutr.*, v.23, n.4, p.358-364, 2004.

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.

MALLOZI, M.C.; ROZOV, T. O laboratório nas doenças pulmonares. *J. Pediatr. (Rio J)*, v.74, supl.1, S125-S132, 1998.

MARCATTO, J.O.; TAVARES, E.C.; SILVA, Y.P.E. Anestesia tópica em recém-nascidos prematuros: uma reflexão acerca da subutilização deste recurso na prática clínica. *Rev. bras. Ter. Intensiva*, v.22, n.1, p.69-76, 2010.

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

MAREK, J.; MÓCSY, J. *Tratado de Diagnóstico Clínico de Las Enfermedades Internas de los Animales Domésticos*. Barcelona: Labor, 1965. 526p.

MARRIOTT, H.M.; JACKSON, L.E.; WILKINSON, T.S.; SIMPSON, A.J.; MITCHELL, T.J.; BUTTLE, D.J.; CROSS, S.S.; INCE, P.G.; HELLEWELL, P.G.; WHYTE, M.K.B.; DOCKRELL, D.H. Reactive Oxygen Species Regulate Neutrophil Recruitment and Survival in Pneumococcal Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.177, n.8, p.887–895, 2008.

MAZZUCHELLI, F.; RODRIGUEZ, M. Patologia respiratória del ternero em cría intensiva: pautas básicas para su tratamiento y prevención. *Med.Vet.*, v.12, n. 9, p.506 - 512, 1995.

MCINTYRE, T.M.; MODUR, V.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Molecular mechanisms of early inflammation. *Thromb. Haem.*, v.78, n.1, p.302-305, 1997.

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.

MEISTER A, ANDERSON ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, v.52, p. 711-716, 1983.

MILLS, P.C.; HIGGINS, A.J. Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: implications for the exercising horse. *Vet. J.*, v.135, n.2; p.125-148, 1997.

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.

MOLINA, M.R. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*, v.2, n.1, 2003.

MOTA, I.L.; QUEIROZ, R.S. Distúrbios do equilíbrio ácido básico e gasometria arterial: uma revisão crítica. *Revista Digital - Buenos Aires*, v.14, n.141, 2010.

MUDRON, P. 1998. *Stúdium vitamínu E a lipoperoxidaãnych procesov u dojnic postihnutých tukovou infiltráciou a insuficienciou pečene*. PhD Thesis, Vysoká škola veterinárnej medicíny, Kosice, 155p.

MUYLLE, S.; ANTHONE, P.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H. Preferential sites for arterial blood sampling in cattle. *Vet. Rec.*, v.139, n.4, p.86-88, 1996.

NAGY, O.; KOVA, G.; SEIDEL, H.; PAULIKOVA, I. Selection of arteries for blood sampling and evaluation of blood gases and acid-base balance in cattle. *Acta Vet. Brno.*, v.71, n.3, p.289–296, 2002.

NAGY, O.; KOVA, G.; SEIDEL, H.; WEISSOVÁ, T. The effect of arterial blood sampling sites on blood gases and acid-base balance parameters in calves. *Acta Vet. Hung.*, v.49, n.3, p.331-340, 2001.

NAGY, O.; KOVA, G.; SEIDEL, H.; PAULIKOVA, I. Selection of Arteries for Blood Sampling and Evaluation of Blood Gases and Acid-Base Balance in Cattle. *Acta Vet. Brno.*, v.71, n.3, p.289–296, 2002.

NOBLE, K.A. The ABCs of arterial blood gasses. *J. Peri. Anesth. Nurs.*, v.24, n.6, p.401-405, 2009.

OLSZEWER, E. *Radicais livres em medicina*. São Paulo: BYK, 1995. 204p.

ONMAZ, C.; GUNES, V.; ATALAN, G.; GELFERT, G. Comparison of arterial and venous blood gas values in sheep before and during isoflurane anaesthesia. *Revue Méd. Vét.*, v.160, n.7, p.356-361, 2009.

ORTOLANI, E.L. Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do

Brasil, 2003, Porto Alegre. *Anais eletrônicos...* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17307/000456119.pdf?sequence=1>
Acesso 02 de dez 2011

PADILHA, D.J.; McDONOUGH P.; KINDING, C.A.; ERICKSON, H.H.; POOLE, D.C. Ventilatory dynamics and control of blood gases after maximal exercise in the Thoroughbredhorse. *J. Appl. Physiol.*, v.96, n.6, p.2187-2193, 2004.

PARK, H.S.; KIM, S.R.; LEE, Y.C. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*, v.14, n.1, p.27-38, 2009.

PEIRÓ, J.R.; BORGES, A.S. ; GONÇALVES, R.C. ; MENDES, L.C.N. Use of I-STAT to determine blood gas, electrolytes, and hematocrit in whole-blood samples from cattle, horses and sheep. *Am. J. Vet. Res.*, v. 71, n.5, p.323-332, 2010.

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.

PICCIONE, G.; COSTA, A.; BERTOLUCCI, C.; BORRUSO, M.; PENNISI, P.; CAOLA, G. Acid–base balance modifications in the lamb and goat kids during the first week of life. *Small Rumin. Res.*, v.63, n.3, p.304–308, 2006.

PICKEL, M.; ZAREMBA, W.; GRUNERT, E. Comparison of arterial and venous blood gas and acid-base values in prematurely born healthy calves or calves with a late asphyxia. *Zentralbl. Veterinärmed. A*, v.36, n.9, p.653-663, 1989.

PIFFERIA, M.; CARAMELLAB, C.; PIETROBELLIC, A.; RAGAZZO, V.; BONER, A.L. Blood Gas Analysis and Chest X-Ray Findings in Infants and Preschool Children with Acute Airway Obstruction. *Respiration*, v.72, n.2, p.176–181, 2005.

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

PROULX, J. Respiratory Monitoring: Arterial blood gas analysis, pulse oximetry, and end-tidal carbon dioxide analysis. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, v.14, n.4, p. 227-230, 1999.

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

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.*, v.533, n.1-3, p.222-239, 2006.

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

RAO, T.M.; CHARYULU, E.K.; PRASAD, R.D.D.; SRINIVASULU, D.; MUNIRATHNAM, D. Some observations on incidence and mortality of pneumonia in sheep. *Indian J. Anim. Health*, v.32, n.1, p.77-78. 1993.

REBHUN, W.C. *Doenças do Gado Leiteiro*. 1.ed. São Paulo: Editora Roca, 2000. 462p.

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

ROCHA, A.E.A. 2006. *Influência da vitamina E na profilaxia e tratamento de broncopneumonia em bezerros*. Dissertação de Mestrado em Clínica

Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Botucatu. 93p.

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.

ROSE, R.J.; ROSSDALE, P.D. Techniques and clinical application of arterial blood collection in the horse. *Equine Vet. J.*, v.13, n.1, p.70-73, 1981.

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.

SABAT, R.; GUTHMANN, F.; RÜSTOW, B. Formation of reactive oxygen species in lung alveolar cells: effect of vitamin E deficiency. *Lung*, v.186, n.2, p.115–122, 2008.

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.

SAULEZ, M.N.; CEBRA, C.K.B.; DAILEY, M. Comparative biochemical analyses of venous blood and peritoneal fluid from horses with colic using a portable analyser and an in-house analyzer. *Vet. Rec.*, v.157, n.8, p.217-221, 2005.

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.

SCHIMMEL, M.; BAUER, G. Proapoptotic and redox-state related signaling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. *Oncogene*, v.21, n.38, p.5886-5896, 2002.

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.

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, A.A.; GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Cien. Rural*, v.40, n.4, p.994-1002, 2010.

SILVERMAN, S.C. BRIKS, E.K. Evaluation of the I-STAT hand-held chemiactal analyser during treadmill and endurance exercise. *Equine Vet. J.*, v.34, p.551-554, 2002.

SMITH, J.A. Ruminant respiratory system. In: SMITH, B.P. *Large Animal Internal Medicine*. St Louis: Mosby, 2002. p.560-618.

SOBIECH, P.; STOPYRA, A.; KULETA, Z.; ZBANYSZEK, M.; MILEWSKI, S. Acid-base balance parameters of arterial, venous and capillary blood in sheep. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, v.49, n.1, p.125-127, 2005.

SORDILLO, L.M.; AITKEN, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.128, n.1-3, p.104–109, 2009.

DE SOUZA, M.S.S.; SINZATO, Y.K.; LIMA, P.H.O.; CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C.; DAMASCENO, D.C. Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Reprod. Biomed. Online*, v.20, n.4, p.547-552, 2010.

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.

STEWART, J.H.; ROSE, R.J.; BARKO, A.M. Respiratory studies in foals from birth to 7 days old. *Equine Vet. J.*, v.16, n.4, p.323-328, 1984.

STIPKOVITS, I.; RIPLEY, P.H.; TENK, M.; GLÁVITS, R.; MOLNA, T.; FODOR, L. The efficacy of valnemulin (Econor) in the control of disease caused by experimental infection of calves with *Mycoplasma bovis*. *Res. Vet Sci.*, v.78, n.3, p.207-215, 2005.

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.

SUTTON, R.H.; HOBMAN, B. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *N. Z. Vet. J.*, v.23, n.3, p.21- 27, 1975.

SZENCI, O.; BESSER, T. Changes in blood gas and acid-base values of bovine venous blood during storage. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 197, n.74, p. 471-474, 1990.

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,

THOEFNER, M.B.; POLLITT, C.C.; VAN EPS, A.W.; MILINOVICH, G.J.; TROTT, D.J. WATTLE, D.J.; ANDRESEN, P.H. Acute bovine laminitis: a new induction model using alimentary oligofructose overload. *J. Dairy Sci.*, v.87, n.9, p.2932–2940, 2004.

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

UYSTEPRUYST, C.; COGHE, J.; DORTS, T.; HARMEGNIES, N.; DELSEMME, M.H.; ART, T.; LEKEUX, P. Sternal recumbency or suspension by the hind legs immediately after delivery improves respiratory and metabolic adaptation to extra uterine life in newborn calves delivered by caesarean section. *Vet. Res.*, v.33, n.6, p.709-724, 2002.

VALARCHER, J.F.; HÄGGLUND, S. Viral respiratory infections in cattle. In: XXIV World Buiatrics Congress. Proceeding of... Nice: World Buiatrics Association. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/valarcher.pdf?LA=1> Acesso em 12 de dez. 2012.

VALKO M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free Radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 39, p.44-84, 2007.

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

VERÍSSIMO, C.J.; OLIVEIRA, S.M.; FILHA, E.S. Eficácia de alguns antihelmínticos em uma ovinocultura no Estado de São Paulo, Brasil. In: XII Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Rio de Janeiro. *Anais eletrônicos...* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2002.

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. 2003. *Pesquisa de Mannheimia (Pasteurella) haemolytica e Pasteurella multocida em ovinos clinicamente sadios e portadores de afecções*

respiratórias na região de Botucatu-SP. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 76p.

WAGNER, A.E.; MUIR, W.W.; GROSPITCH, B.J. Cardiopulmonary effects of position in conscious cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, n.1, p.7-10, 1990.

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

WILLIAMS, A.J. Assessing and interpreting arterial blood gases and acidbase balance. *BMJ*, v.317, n.7167, p.1213-1216, 1998.

WILSON, J.H.; LOFSTEDT, J. Alterations in Respiratory Function. In: SMITH, B. *Large Animal Internal Medicine: Diseases of Horses, Cattle, Sheep and Goats*. St. Louis: C.V., 1990. Vol.1, p.47-99.

WRIGHT, D.T.; COHN, L.A.; FISHER, B. LI, C.M; ADLER, K.B. Interations of oxygen radicals with airway epithelium. *Environ. Health Perspect.*, v.102, sup.10, p.85-90, 1994.

YAMASHITA, K.; TSUBAKISHITA, S.; FUTAOKA, S.; UEDA, I.; HAMAGUCHI, H.; SENO, T.; KATOH, S.; IZUMISAWA, Y.; KOTANI, T.; MUIR, W.W. Cardiovascular Effects of Medetomidine, Detomidine and Xylazine in Horses. *J. Vet. Med. Sci.*, v.62, n.10, p.1025-1032, 2000.

Artigo Científico

Artigo: Estresse oxidativo em ovinos portadores de pneumonia.

A ser encaminhado à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

ISSN: 0100-736X

Normas para publicação disponível em:

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

Normas Para Publicação

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\$ 120,00 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 RietCorrea 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 seguindo 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, exemplo: (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; evitarse-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 autoexplicativas , 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.....**Estresse oxidativo em ovinos portadores de pneumonia²**

Andreza A. da Silva^{3*}, Mayra T. A. Martins², Danilo O. L. Ferreira², Adriano Dias⁴,
Roberto Calderon Gonçalves²

ABSTRACT.- Silva, A.A., Martins, M.T.A., Ferreira, D.O.L., Dias, A., Gonçalves, R.C. 2012. **[Oxidative stress in sheep with pneumonia.]** *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: andrezamedvet@yahoo.com.br

The aim of this study was to analyze the oxidative status and inflammatory response in healthy sheep (n=20) and animals with a clinically diagnosed pneumonia (n = 20). After physical examination the animals were divided into two groups: i) G1/control, composed of clinically healthy animals and ii) G2, composed of animals with pneumonia. The oxidative status was assessed by indirect determinations of enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and concentrations of total glutathione (GSH-t) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in peripheral blood by a colorimetric method. The inflammatory response was evaluated by complete blood count and total protein and plasma fibrinogen. The statistical analysis of the blood test results showed significant increased ($p<0,05$) values of total leukocytes count, segmented neutrophils, monocytes and eosinophils in sick animals. With regard to biochemical parameters, sheep with pneumonia showed a significant increase ($p<0,05$) of fibrinogen and total plasma protein concentrations. The animals from group G2 had a statistically significant reduction ($p<0,05$) in SOD and GSH-Px enzymatic activity and GSH-t concentration, while TBARS concentration was significantly higher ($p<0,05$). These results demonstrate the occurrence of oxidative stress and lipid peroxidation in pneumonic sheep, associated with marked inflammatory response.

INDEX TERMS: Pneumonia, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants, lung disease, sheep.

² Recebido em

Aceito para publicação em

Tese de Doutorado do primeiro autor. Auxílio financeiro (Proc. 2010/00044-0) e bolsa de doutorado (Proc.20087/58929-7) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

³ 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: andrezamedvet@yahoo.com.br

⁴ 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.

RESUMO.- O objetivo deste estudo foi analisar o *status* oxidativo e a resposta inflamatória de ovinos sadios (n=20) e com diagnóstico clínico de pneumonia (n=20). Inicialmente os animais foram submetidos ao exame clínico e divididos em dois grupos: I) G1/controle, composto pelos animais clinicamente sadios e II) G2, composto pelos animais portadores de pneumonia. O *status* oxidativo foi avaliado por determinação indireta da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e das concentrações de Glutathione total (GSH-t) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no sangue periférico por método colorimétrico. A resposta inflamatória foi avaliada pelo hemograma e proteína total e fibrinogênio plasmáticos. A análise estatística do hemograma revelou aumento significativo ($p<0,05$) das variáveis leucócitos totais, neutrófilos segmentados, monócitos e eosinófilos no sangue dos animais doentes. Com relação aos parâmetros bioquímicos, os ovinos portadores de pneumonia apresentaram aumento significativo ($p>0,05$) da concentração de fibrinogênio e proteína plasmática total. Os animais portadores de pneumonia apresentaram diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na atividade enzimática da SOD e GSH-Px e na concentração GSH-t, enquanto que a concentração de TBARS mostrou-se significativamente elevada ($p<0,05$). Estes resultados demonstram a ocorrência de estresse oxidativo e peroxidação lipídica em ovinos portadores de pneumonia, associado à resposta inflamatória e acúmulo de células fagocíticas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Pneumonia, estresse oxidativo, espécies reativas do oxigênio, antioxidantes, doenças pulmonares, ovinos.

INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias são consideradas um sério problema de sanidade na ovinocultura, resultando em prejuízos econômicos significativos devido aos altos índices de morbidade e mortalidade, conversão alimentar ineficiente, retardo no crescimento e ganho de peso, condenações de carcaças e custos com medicamentos e assistência veterinária (Martin 1996, Cutlip et al. 1998, Goodwin-Ray et al. 2008). Nesta espécie a doença respiratória parece ser precedida pelo desequilíbrio na tríade de interação entre um ou mais agentes infecciosos, principalmente vírus, micoplasmas e bactérias, o sistema de defesa do hospedeiro e o ambiente (Bowland & Shewen 2000, Lacasta et al. 2008, Ferrari et al. 2010). Entre as enfermidades respiratórias, as pneumonias são as mais frequentes e de maior importância (Gonçalves et al. 2001, Radostits et al. 2002, Mohamed & Abdelsalam 2008).

A resposta inflamatória durante a pneumonia é fundamental para a efetiva eliminação dos agentes infecciosos. No entanto, o controle da inflamação é igualmente importante para a prevenção de lesão tecidual excessiva mediada pelos leucócitos, decorrente da ação das proteases e Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) liberadas durante a explosão respiratória no processo de fagocitose (Duflo et al. 2002, Marriott et al. 2008, Sabat et al. 2008), com destaque para o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (Comhair & Erzurum 2002, Silva & Gonçalves 2010).

As células do trato respiratório, em especial os pneumócitos tipo II, são particularmente sensíveis aos efeitos nocivos das ERO, e passam a liberar

mediadores inflamatórios em resposta a exposição excessiva, perpetuando a reação inflamatória no ambiente pulmonar (Rahman & Macnee 2000, Dufloo et al. 2002). Para que isso não ocorra o trato respiratório conta com um complexo mecanismo de defesa antioxidante responsável pela manutenção da homeostase entre a produção e a eliminação das ERO (Wright et al. 1994). De modo geral, os agentes antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos constituem a primeira linha de defesa endógena no combate às ERO, e incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione reductase (GSH-Rd) (Comhair & Erzurum 2002, Dufloo et al. 2002, Al-Qudah 2009, Park et al. 2009, Silva & Gonçalves 2010).

O aumento excessivo na produção de ERO desencadeado pela reação inflamatória durante a pneumonia, acompanhado da insuficiência do sistema de defesa antioxidante levam ao estresse oxidativo, condição em que as ERO provocam lesões teciduais significativas danificando organelas celulares, ácidos nucléicos, carboidratos, proteínas e lipídeos (Valko et al. 2007, Sabat et al. 2008, Park et al. 2009, Sordillo & Aitken 2009). A reação das ERO com os ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas celulares inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica, que acarreta em inativação de receptores, perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas à célula no espaço extracelular, lesando tecidos adjacentes. Dentro desse contexto, não é surpreendente verificar que a lesão induzida pelas ERO influencie na extensão das lesões ocorridas durante as pneumonias (Marriot et al. 2008, Al-Qudah 2009, Silva & Gonçalves et al. 2010).

O objetivo desse estudo foi avaliar o estresse oxidativo e o status antioxidante eritrocitário de ovinos portadores de pneumonia através da determinação das concentrações de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e da Glutathione Total (GSH) e da determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O trabalho foi desenvolvido no município de Botucatu, Estado de São Paulo – Brasil (latitude 22°51'S e longitude 48°27'W. Grw.) durante os meses de junho à setembro de 2010. Foram utilizados 40 ovinos (20 da raça Bergamácea e 20 mestiços Santa Inês), 17 machos e 23 fêmeas, com idade de 150-190 dias (média de 175 dias) e pesando 23-44 kg (média 32 kg), todos provenientes de propriedades do município de Botucatu com antecedentes de doença respiratória em seus rebanhos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (protocolo nº 26/2010 – CEEA).

Exame Clínico

Todos os ovinos incluídos no estudo foram submetidos ao exame físico, utilizando-se protocolo adotado por Viana (2003) e critério clínico de Gonçalves & Feitosa (2008). Os resultados foram anotados em fichas individuais e os animais distribuídos em dois grupos: i) G1 - animais sadios (n=20) e ii) G2 - animais portadores de pneumonia (n=20).

Os sinais clínicos utilizados como critério para classificação dos animais portadores de pneumonia foram: depressão, aumento da temperatura retal, secreção nasal, tosse, reflexo da tosse positivo, dispnéia com ou sem ruído expiratório, taquicardia, taquipnéia, crepitações e sons respiratórios rudes e/ou anormais à auscultação pulmonar.

Foram considerados sadios e aptos a participar do experimento todos os animais que, após serem submetidos ao exame físico, não manifestaram qualquer alteração clínica e apresentaram variáveis hematológicas dentro dos valores considerados de referência para a espécie (Weiss e Wardrop, 2010).

Colheita e Processamento das Amostras

Com os animais em estação e manualmente contidos, foram colhidos assépticamente um total de 10 mL de sangue da veia jugular externa de cada um dos animais em estudo. Para tal utilizou-se um sistema de colheita a vácuo constituído de agulhas 25 x 8 mm (21G) para múltipla colheita, acopladas a tubos siliconizados. Com relação ao volume total de sangue retirado de cada animal, 5 mL foram colhidos em tubos contendo ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA) e encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas Particular – Vida Vet, Botucatu – Brasil para a realização das avaliações hematológicas por meio de hemograma e proteína total e fibrinogênio plasmáticos. A contagem total de leucócitos e hemácias foi realizada em contador semi-automático (Celm SB-190) e a contagem diferencial dos leucócitos foi em esfregaços sangüíneos corados com corante hematológico de Giemsa, com diferenciação do padrão leucocitário ao microscópio óptico. Para a dosagem da hemoglobina foi utilizado o método da cianometahemoglobina (Kit Comercial Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda., Brasil), enquanto que a mensuração da proteína total e do fibrinogênio plasmáticos foi realizada por refratometria (Refratômetro RTP-20ATC), e o volume globular, pelo método do micro hematócrito (Weiss e Wardrop, 2010).

Os outros 5 mL foram colhidos em tubos contendo heparina sódica e utilizadas para a determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) e da Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e das concentrações da Glutathione Total (GSH-t) e das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Após a colheita essas amostras de sangue foram armazenadas a 4^o C em recipiente isotérmico contendo gelo em escamas e levadas imediatamente ao Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP, São Paulo – Brasil para serem processadas, prevenindo ou retardando assim o processo de oxidação *in vitro*.

As amostras de sangue dos tubos contendo heparina foram centrifugadas (Centrífuga 5804E, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 185 x G por 10 minutos à 4^o C. Para obtenção das hemácias, o sangue foi lavado com solução tampão salina-fosfato (PBS) (Solução tampão salina-fosfato, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil) a 4^oC e centrifugado a 1575 x G durante 15 minutos por três vezes. A cada repetição do procedimento, foi retirado o plasma, glóbulos brancos e as plaquetas, por aspiração com micropipeta. Às hemácias lavadas (50 µl) foram adicionados 1900 µl de água deionizada agitando-se por inversão, para obtenção do hemolisado que foi utilizado para determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo: atividade enzimática da SOD e concentrações de Hemoglobina e de TBARS. Para a determinação da atividade enzimática de GSH-Px e da concentração de GSH-t, a água deionizada foi substituída por 950µL de solução estabilizadora

(2,7 mM EDTA e 0,7 mM 2-mercaptoetanol) (Solução tampão salina-fosfato, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil) (DE SOUZA et al. 2010). As amostras de hemolisado foram congeladas e armazenadas a uma temperatura de -80°C até serem analisadas, 2 meses após a coleta.

Análise Bioquímica

As atividades de SOD e GSH-Px e as concentrações de GSH-t e TBARS foram determinadas por método colorimétrico em espectrofotômetro utilizando técnica descrita por DE SOUZA et al. (2010).

Para a determinação da hemoglobina, 20 μL do hemolisado foram diluídos e agitados em 2 mL de solução de Drabkin (Solução de Drabkin, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil). Após 10 minutos de repouso, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SP 220, Bioespectro, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 546 nm e expressa em g/dL (DE SOUZA et al., 2010).

Para a determinação das TBARS, um 1 mL de ácido sulfossalicílico 3,0% (5-sulfosalicylic acid hydrate 95%, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) foi adicionado a 1 mL de hemolisado, agitado por 10 segundos, centrifugado a $15.300 \times G$ por 3 minutos e deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Thiobarbituric acid, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) a 500 μL de hemolisado. A mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos e a absorbância determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nM de malonaldeído (MDA) por grama de hemoglobina (nM/gHb) (De Souza et al. 2010).

A atividade total da SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do ácido pirogálico (Pyrogalllic acid, Shynth, Dracena, São Paulo, Brasil) pelo ânion superóxido. A mistura consistiu na adição de 100 μL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 20 μL de ácido pirogálico 10mM e 860 μL de água deionizada a 20 μL de hemolisado. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm (25°C) por 5 minutos. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol[®], por miligrama de hemoglobina, é definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em unidades de atividade enzimática, por grama de hemoglobina UI/mgHb (De Souza et al. 2010).

O conteúdo de GSH-t foi determinado pela adição da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (NADPH, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Pphosphate, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA), que iniciou a reação enzimática da glutathione com o ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) (2-nitrobenzoic acid, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A mistura consistiu na adição de 1.290 μL de água destilada, 200 μL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 μL de 10 UI/mL de GSH-Rd (Glutathione reductase, SIGMA, St. Louis, USA), 200 μL de NADPH (2mM) e 100 μL de DTNB (12 mM) a 10 μL de hemolisado. Para obtenção da curva padrão da glutathione, foi realizado o mesmo ensaio, substituindo-se a amostra de hemolisado por 10 μL de solução padrão a 1:1000 de glutathione oxidada (GSSG) (L-glutathione oxidized, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA), a 33 μM . A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm. A concentração da GSH-t foi expressa em micromolar do substrato reduzido, por grama de hemoglobina ($\mu\text{M/gHb}$) (De Souza et al. 2010).

A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH. A mistura consistiu na adição de 1.300 µL de água destilada, 200 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 µL de 10 UI/mL de GSH-Rd, 200 µL de NADPH (2mM), 40 µL de GSH (0,1 M) a 40 µL de hemolisado. A mistura foi agitada em vórtex (Vortex AP-56, Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brazil), durante 10 segundos. Em seguida foi adicionado 20 µL de T-Butil hidroperóxido (7mM) (T-Butyl hydroperoxide, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) e mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática, por grama de hemoglobina (UI/gHb) (De Souza et al. 2010).

Análise Estatística

Os sinais clínicos foram analisados utilizando-se o teste do Qui-quadrado e, quando um dos valores esperados foi menor que 5 no cálculo do Qui-quadrado, utilizou-se o Teste Exato de Fisher. As variáveis hematológicas (hemograma, proteína total plasmática e fibrinogênio) e os biomarcadores do metabolismo oxidativo (SOD, GSH-Px, GSH-t e TBARS) não apresentaram distribuição normal e foram analisadas de acordo com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Toda a análise estatística foi feita utilizando-se o software PASW v.17.0.2 (Statistical Software PASW - version 17.0.2, Chicago, Illinois, USA) e, para todas as comparações estatísticas, foi considerado limite mínimo de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os dois grupos de ovinos (G1 e G2) foram similares em idade e sexo, contudo uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os animais sadios (G1) e os portadores de pneumonia (G2) com relação ao peso. Os ovinos portadores de pneumonia apresentaram menor peso quando comparados aos animais sadios, com valores médios de $32,15 \pm 1,22$ Kg (Quadro 1).

Ao exame clínico, no grupo de animais sadios (G1), as médias da temperatura retal (°C), frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC) foram respectivamente de $39,6 \pm 0,28$, $34,2 \pm 8,99$ e $105,1 \pm 15,46$, (Quadro 2), sendo que os valores da temperatura retal e FC encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie, com discreto aumento na FR de quatro movimentos respiratórios por minuto (mrpm) acima dos valores considerados normais. A elevação da FR foi observada em 50% (10/20) dos animais do grupo G1, com variação de até 18 mpm acima do valor considerado normal (20-30 mpm). Apesar da média da FC apresentar-se dentro dos padrões considerados ideais (90-115 bpm), quatro animais (4/20 – 20%) apresentaram média de 15 bpm acima da faixa de normalidade (Quadro 2).

No grupo dos animais com pneumonia (G2), os valores médios de temperatura (°C), FR e FC foram de $40,15 \pm 0,34$, $71,95 \pm 31,95$ e $119,4 \pm 25,77$, respectivamente, todos acima dos valores de referência para a espécie (Quadro 1). A frequência respiratória se elevou em 70% dos ovinos doentes (14/20 – 70%) e com variações de até 80 mpm. O aumento da FC foi observado em 13 (13/20 – 65%) animais do grupo G2, com amplitude de até 45 bpm acima dos valores considerados normais para a espécie (Quadro 2). Contudo, quando comparadas às

variáveis temperatura retal (°C), FR e FC entre os grupos G1 e G2, foi possível observar diferença estatística apenas na temperatura retal ($p=0,01$) e na frequência respiratória ($p<0,05$), significativamente elevadas no grupo dos animais portadores de pneumonia (Quadro 3).

A Quadro 3 apresenta os percentuais médios, desvios padrão e valores de p referentes aos sinais clínicos dos animais avaliados para os dois grupos estudados (G1 e G2). Reflexo da tosse positivo e aumento dos ruídos laringotraqueal e traqueobrônquico foram os sinais clínicos mais observados no grupo 2, presentes em 95% (19/20 - 95%) dos animais doentes. Depois, seguem-se a secreção nasal uni ou bilateral em 90% (18/20 - 90%) dos animais doentes, a tosse em 85% (17/20 - 85%), a crepitação grossa em 75% (15/20 - 75%), o frêmito brônquico em 60% (12/20 - 60%) e o aumento das frequências cardíaca e respiratória, presentes em 70% (14/20 - 70%) e 65% (13/20 - 65%) dos ovinos com pneumonia, respectivamente.

Em proporção intermediária estão presentes a crepitação fina e a dispnéia mista, observados em 55% (11/20 - 55%) dos animais do grupo 2, os frêmitos traqueal, o aumento do ruído broncobronquiolar e o sibilo, presentes em 50% (10/20 - 50%) dos ovinos portadores de pneumonia, além da hipertermia, observada em 45% (9/20 - 45%) dos animais doentes. Os sinais clínicos menos frequentes foram a posição ortopnéica, observada em 15% (3/20 - 15%) dos ovinos do grupo 2 e, o ronco e o odor expiratório fétido, presentes em 10% (2/20 - 10%) dos animais com pneumonia.

Nos animais sadios (G1) não foram encontrados sinais clínicos característicos de doença respiratória. Quando comparados os grupos G1 e G2, os sinais clínicos que ocorreram com frequência estatisticamente significativa ($p<0,05$) nos animais doentes e por isso caracterizaram o quadro de pneumonia apresentado pelos animais do grupo G2 foram: tosse, secreção nasal, dispnéia mista, frêmitos traqueal e brônquico, reflexo da tosse positivo, aumento dos ruídos laringotraqueal, traqueobrônquico, e broncobronquiolar, crepitação fina e grossa, sibilo e hipertermia (Quadro 3).

Com relação às variáveis hematológicas, não houve diferença significativa entre os grupos para a contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular e plaquetas ($p>0,05$) (Quadro 4). Na análise do leucograma, os animais do grupo G2 demonstraram aumento significativo ($p<0,05$) nos valores médios da contagem total de leucócitos, de neutrófilos segmentados, eosinófilos e monócitos. Com exceção dos monócitos, todas as variáveis do leucograma supracitadas encontravam-se com seus valores médios acima dos considerados de referência para a espécie. No grupo de animais portadores de pneumonia (G2) foi possível observar ainda linfopenia estatisticamente significativa ($p<0,05$). Com relação aos parâmetros hematológicos bioquímicos, os ovinos do grupo de animais portadores de pneumonia (G2) apresentaram aumento significativo da concentração de fibrinogênio ($p<0,05$) e proteína total ($p=0,004$), plasmáticos (Quadro 4).

Os resultados para as variáveis SOD, GSH-t, GSH-Px e TBARS obtidos a partir do hemolisado de eritrócitos de ovinos sadios e portadores de pneumonia encontram-se resumidos no Quadro 5. Houve redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) nas atividades de SOD e GSH-Px e na concentração de GSH-t nas hemácias dos ovinos do grupo G2. Com relação ao marcador de peroxidação

lipídica, ocorreu elevação estatisticamente significativa na concentração de TBARS nos eritrócitos dos ovinos portadores de pneumonia ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A pneumonia é caracterizada por reação inflamação em parênquima pulmonar, normalmente acompanhada por inflamação de brônquios, bronquíolos e pleura. Clinicamente manifesta-se por taquicardia, alterações no padrão respiratório, tosse, sons respiratórios anormais à auscultação, hipertermia e anorexia (Gonçalves et al. 2001, Radostits et al. 2002). No presente estudo os ovinos portadores de pneumonia (G2) apresentaram menor peso quando comparados aos animais sadios (G1), corroborando com os achados de outros autores que também relataram diminuição da massa corporal associada à pneumonia (Baca-Estrada et al. 1995, Stipkovits et al. 2005, Al-Qudah 2009). Estudos experimentais e achados clínicos sugerem que a liberação de mediadores inflamatórios no curso da doença respiratória pode contribuir para o desenvolvimento de hipermetabolismo, diminuição da ingestão de energia e pode resultar em resposta inadequada à ingestão alimentar e, dessa forma, contribuir para as alterações nutricionais observadas nos pacientes com este tipo de enfermidade. As citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β) podem causar anorexia e estimular a proteólise, esta última através da ativação e da aceleração do sistema enzimático ubiquitina-proteossoma presente nos músculos esqueléticos periféricos (Creutzberg 2003, Dourado 2006). Cabe ressaltar ainda que, se acentuada, a perda de massa corporal pode resultar em disfunção muscular periférica e diminuição da capacidade dos animais em realizar exercícios, alterações importantes e que podem determinar o prognóstico e sobrevida do animal.

Os animais do grupo G1 não apresentaram sinais clínicos compatíveis com doença respiratória (Stöber 1993, Radostits et al. 2002, Gonçalves & Feitosa 2008). Contudo, quatro animais sadios apresentaram taquicardia e os valores médios da FR desse grupo (G1) estava acima dos valores considerados normais para a espécie. Tais achados poderiam indicar alterações cardiovasculares ou excitação psíquica (Stöber 1993). O fato de estes parâmetros mostrarem-se alterados de forma isolada, sem estarem associados a qualquer outro sinal clínico, reforça a hipótese de excitação psíquica e confirma a higidez do grupo G1. Normalmente ovinos sadios tornam-se agitados e excitados quando separados do grupo ou submetidos a estresse de procedimentos veterinários e de manejo (Baldock & Sibly 1990, Hargreaves & Hutson 1990, Silva et al. 2010), o que pode levar ao aumento fisiológico das frequências aferidas.

A elevação da temperatura retal observada em 45% (9/20 – 45%) dos animais com pneumonia (G2) foi estatisticamente significativa, e estava associada ao aumento das frequências cardíaca e respiratória, portanto, relacionada com a “síndrome febre” (Radostits et al. 2002, Feitosa 2008).

A frequência respiratória aumentada é um dos mecanismos fisiológicos de compensação pulmonar na tentativa de manutenção das trocas gasosas (Radostits et al. 2002). Quanto mais grave o processo, menor a eficiência das trocas gasosas e maior a necessidade de utilização dos mecanismos de compensação pulmonar (Hinchcliff & Byrne 1991, Andrews 1992, Pringle 1992, Radostits et al. 2002). Este sinal clínico foi notado em 70% (14/20) dos animais do grupo doente, sendo

estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle (G1). Esse achado está de acordo com a literatura que afirma que o aumento da FR é um sinal importante no diagnóstico de afecções respiratórias (Stöber 1993, Garcia et al. 1996, Gonçalves & Feitosa 2008). No entanto, a FR deve ser avaliada com critérios na espécie ovina, devido sua fácil alteração pela simples contenção manual e manejo dos animais.

Com exceção do odor expiratório fétido ou pútrido, a posição ortopnéica e o aumento da frequência cardíaca, todos os sinais clínicos de origem respiratória ocorreram de forma estatisticamente significativa no grupo de animais portadores de pneumonia (G2). Contudo, sinais clínicos como, reflexo da tosse positivo, aumento da FR, aumento dos ruídos laringotraqueal e traqueobrônquico, secreção nasal, tosse, crepitação grossa e o frêmito torácico estavam presentes em cerca de 70% dos animais doentes e foram determinantes para a diferenciação entre os animais sadios e doentes, corroborando com os achados clínicos de outros autores no diagnóstico das afecções respiratórias (Gonçalves 1997, Marcondes 2007, Gonçalves et al. 2011). Mesmo a sintomatologia observada nos animais do grupo doente (G2) sendo compatível com quadro de doença respiratória (Stöber 1993, Radostits et al. 2002, Gonçalves & Feitosa 2008), nem todos os sinais clínicos observados foram determinantes para localizar o processo respiratório dentro das vias aéreas. Dessa forma, a análise dos sinais clínicos relacionados às vias aéreas posteriores e ao parênquima pulmonar são fundamentais para a definição do diagnóstico de pneumonia (Breeze 1985, Radostits et al. 2002, Mohamed & Abdelsalam 2008).

Entre os sinais clínicos que apresentaram ocorrência significativa no grupo G2 estão a tosse, o reflexo da tosse positivo e a secreção nasal. De maneira geral, a tosse e a resposta positiva ao reflexo de tosse são indicativas de alterações no aparelho respiratório, caracterizando comprometimento da traquéia e manifestações iniciais da pneumonia (Hinchcliff & Byrne 1991, Pringle 1992). O corrimento nasal se relaciona tanto à inflamação local (Belknap 1993, Crandell 1993, Gonçalves & Feitosa 2008), como à secreção de origem brônquica e pulmonar, principalmente nos casos em que é bilateral (Stöber 1993, Gonçalves & Feitosa 2008). Contudo, isoladamente, esses sinais clínicos são pouco específicos no que diz respeito à diferenciação e localização dos processos respiratórios.

O aumento na produção de líquido intersticial inflamatório, decorrente dos processos pneumônicos, conduz melhor os sons produzidos na respiração e explica a auscultação de área aumentada dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar (Pringle 1992, Stöber 1993, Radostits et al. 2002, Feitosa & Gonçalves 2008). Dezenove (19/20 – 95%) e 10 (10/20 – 50%) animais do grupo G2 apresentaram aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar, respectivamente, sendo que o aumento do ruído traqueobrônquico ocorreu em associação com o aumento do ruído broncobronquiolar em 50% (10/20 – 50%) dos casos de pneumonia. A crepitação é outro sinal de aumento de líquido inflamatório, embora nas vias aéreas e, dependendo da quantidade e da localização do líquido na árvore brônquica, produz sons diferentes à auscultação. Quando a quantidade de líquido é intensa nos brônquios de maior calibre, manifesta-se a crepitação grossa, enquanto que a deposição de líquido em brônquios menores induz à crepitação fina (Stöber 1993, Gonçalves et al. 2001, Gonçalves & Feitosa 2008). No grupo G2, o aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar estiveram associados à crepitação (seja ela grossa ou fina) em 90% (18/20) e 50%

(10/20) dos casos de pneumonia, respectivamente, e a associação dos três sinais clínicos ocorreu em 50% (10/20) dos episódios da doença.

Corroborando como os achados de outros autores (Gonçalves 1997, Marcondes 2007, Gonçalves et al. 2001, Gonçalves et al. 2011), a crepitação grossa foi o sinal clínico presente na maioria dos animais com comprometimento pulmonar, indicando o envolvimento de brônquios e auxiliando na localização do processo respiratório dos animais em estudo (G2). A crepitação fina é um ruído patológico normalmente percebido durante o edema pulmonar ou fases iniciais ou de resolução das pneumonias (Stober 1993, Gonçalves & Feitosa 2008). Quando comparada à crepitação grossa (15/20 – 75%), a crepitação fina (11/20 – 55%) ocorreu com menor frequência nos animais do grupo G2. A menor frequência deste achado clínico nos animais doentes pode ser atribuída à fase intermediária de evolução do processo em que os ovinos foram examinados ou à dificuldade de auscultação quando esse sinal clínico está associado a outros de maior intensidade (Gonçalves 1997, Gonçalves & Feitosa 2008).

Quando a quantidade de líquido inflamatório presente nas vias aéreas inferiores é grande e localizada em área próxima à parede torácica, observa-se frêmito torácico à palpação (Marek & Mócsy 1965, Braz 1981, Pringle 1992, Stöber 1993). O frêmito torácico ocorreu em 60% (12/20) dos casos de pneumonia nos animais do grupo G2, sempre associado a outros sinais de comprometimento pulmonar, como aumento dos ruídos traqueobrônquico e/ou broncobronquiolar e crepitação grossa e/ou fina. A deposição de secreções nas vias aéreas posteriores determina modificação no fluxo de ar, provocando vibrações de tons mais graves, denominados roncos (Marek & Mócsy 1965, Kotlikoff & Gillespie 1983 e 1984), ou tons mais agudos, chamados de sibilos (Lehrer 1990, Pringle 1992, Stöber 1993). Dos animais do grupo G2, 50% (10/20 – 50%) apresentaram sibilos e, embora sua ocorrência não tenha sido significativa, 10% apresentaram ronco à auscultação pulmonar. Esses achados são indicativos de bronquites (Wilson & Lofstedt 1990, Hinchcliff & Byrne 1991, Stöber 1993) e, associados aos achados anteriormente descritos, reforçam a suspeita de comprometimento pulmonar.

Dentro desse contexto, o grupo de ovinos com processo pneumônico (G2) caracterizou-se pela maior ocorrência de sinais clínicos que, principalmente em associação, demonstraram comprometimento pulmonar (Stöber 1993, Radostits et al., 2002, Gonçalves et al. 2001, Gonçalves & Feitosa 2008), sendo fundamentais na busca do diagnóstico diferencial entre processos de via aérea anterior e posterior (Stöber 1993, Radostits et al. 2002, Gonçalves et al. 2001, Gonçalves & Feitosa 2008).

A dispnéia mista é outro sinal clínico bastante importante no que diz respeito à localização do processo respiratório nas vias aéreas e foi observada em 55% (11/20) dos animais do grupo G2, todos eles associados à posição ortopnéica (3/20 – 15%). Normalmente, esse distúrbio traduz consolidação pulmonar extensa, a ponto de interferir com as trocas gasosas (Pringle 1992, Radostits et al. 2002). Contudo tal fato não pode ser confirmado, uma vez que a percussão torácica não foi utilizada como método diagnóstico devido à dificuldade de sua execução em vista do comportamento irrequieto inerente à espécie ovina.

O odor respiratório fétido, apesar de sua ocorrência não ter sido significativa, esteve presente em 10% dos casos de pneumonia do grupo G2. Normalmente esse achado clínico reflete grande quantidade de pus em decomposição nas vias aéreas (Radostits et al. 2002, Gonçalves & Feitosa 2008).

Embora não seja possível atestar que o odor pútrido decorrente da destruição tecidual tenha origem pulmonar, cabe ressaltar que os animais que apresentaram este sinal clínico foram justamente aqueles cujo quadro clínico de pneumonia foi o mais grave entre os animais do grupo G2.

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 plasmáticos foi útil para confirmação da higidez do grupo G1, uma vez que todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados mantiveram-se dentro dos valores de referência para a espécie (Jain 1993).

O leucograma e a determinação do fibrinogênio plasmático são, na Medicina Veterinária, os recursos laboratoriais mais comumente utilizados para avaliação dos processos inflamatórios, (McSherry et al. 1970, Ek, 1972). A média da contagem total de leucócitos e de neutrófilos nos animais doentes (G2) foi significativamente superior à dos ovinos sadios, corroborando com outros autores que também demonstraram que a pneumonia provoca leucocitose por neutrofilia em ruminantes (Mohamed & Abdelsalam 2008, Al-Qudah 2009). A inflamação desencadeada pela pneumonia 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). Esse fato justifica a leucocitose por neutrofilia observada no grupo dos animais portadores da doença (G2), caracterizada principalmente por elevação acentuada de segmentados, fato comum nos processos inflamatórios e infecciosos (Jain 1993, Lorenzi 2003).

Todos os animais acometidos por pneumonia (G2) apresentaram neutrofilia, contudo, em sete animais (7/20 – 35%) a neutrofilia estava associada à leve elevação na contagem dos bastonetes. Mesmo que o aumento desta variável não tenha sido significativo, evidencia discreto desvio neutrofílico à esquerda regenerativo em alguns animais do grupo G2.

Foi observada linfopenia nos animais doentes havendo diferença significativa entre os dois grupos (G1 e G2). A linfopenia associada à leucocitose na resposta inflamatória ocorre por que algumas citocinas que promovem migração neutrofílica também atuam em linfócitos, retirando-os da circulação para os tecidos linfóides. Contudo, cabe ressaltar que o estresse inerente à resposta inflamatória, principalmente em sua fase aguda, aumenta a produção de glicocorticóide pelas adrenais, levando à linfopenia pelo sequestro de linfócitos da corrente sanguínea e destruição destes no tecido linfóide (Kidd 1991, Jain 1993, Schultze 2000), fato que também pode ter contribuído para a linfopenia observada nos animais doentes (G2).

A discreta eosinofilia observada em alguns animais doentes do grupo G2 é um achado que pode ser compatível com quadros pneumônicos devido a ativação e degranulação eosinofílica mediada por complexos imunes de IgA secretora, imunoglobulina mais abundante na mucosa do trato respiratório e importantíssima para a defesa imunológica primária contra infecções locais (Sacher & McPherson, 2002, Kerr 2003).

No grupo dos animais enfermos (G2) houve, também, leve aumento nos valores médios dos monócitos. Embora os valores desta variável tenham permanecido dentro dos padrões considerados normais para a espécie, a elevação

estatisticamente significativa dos monócitos no grupo G2 pode ser um indicativo de uma tendência à cronificação do processo nos animais doentes (Jain 1993, Kerr 2003).

Assim, fazendo-se uma avaliação global nos achados do hemograma, constatou-se que ocorreu alteração na resposta leucocitária fisiológica da espécie ovina, nos animais portadores de pneumonia, visto que a relação neutrófilo:linfócito em ruminantes é da ordem de 0,5 (Taylor 2000) ou da ordem de 30:70 (0,4) (Kerr, 2003). Esta relação, em média, foi de $0,56 \pm 0,2$ no grupo de animais sadios (G1) e de $3,63 \pm 0,92$ no grupo de animais doentes (G2). Portanto, a pneumonia desencadeou elevação da relação neutrófilo:linfócito em torno de seis vezes à observada no grupo de animais sadios (G1).

O fibrinogênio é uma importante glicoproteína de fase aguda, produzida em maior quantidade na presença de afecções inflamatórias (Kaneko 1997, Horadagoda et al. 1999) e infecciosas (McSherry et al. 1970, Schalm 1977). Na análise comparativa do fibrinogênio nos grupos estudados, foi possível observar uma hiperfibrinogenemia pelo menos duas vezes maior nos ovinos do grupo G2 quando comparado aos animais do grupo controle, demonstrando que a elevação do fibrinogênio é um indicador tão sensível quanto a leucocitose na detecção das doenças inflamatórias em ruminantes. O fibrinogênio é uma proteína sintetizada pelo fígado, cuja concentração plasmática eleva-se sob a ação estimuladora da interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral (TNF) liberados pelo processo inflamatório (Andrews et al. 1994). A concentração do fibrinogênio permanece elevada durante a ação da doença, decrescendo com a melhora do animal tornando-se assim um bom marcador e avaliador do processo em curso (Sutton & Hobman 1975). A reação inflamatória provocada pela pneumonia nos animais do grupo G2 induziu o aumento na produção de fibrinogênio pelo fígado, caracterizado pela hiperfibrinogenemia observada nos animais do grupo G2, corroborando com os achados de outros autores que também observaram aumento na concentração plasmática de fibrinogênio em animais portadores de pneumonia (Demartin & Davel 1977, Pfeffer & Robers 1989, Vestweber et al. 1990, Ganheim et al. 2003, Al-Qudah 2009).

A relação proteína total plasmática:fibrinogênio (PPT:FB) é usada para distinguir hiperfibrinogenemia causada por doença ou associada à desidratação. Isso porque a hemoconcentração produz aumento relativo de todos os componentes das proteínas plasmáticas, incluindo o fibrinogênio (McSherry et al. 1970, Sutton & Homan 1975, Jain 1993). A relação PPT:FB acima de 15 é considerada normal. Já valores entre 10 e 15 demonstram significativa elevação no fibrinogênio plasmático e sugerem processos inflamatórios (Allen & Kold 1988, Latimer et al. 2003). No presente estudo, os valor médio da proteína total plasmática no grupo G2 foi de $7,84 \pm 1,02$ g/dL e a relação PPT:FB média de $11,2 \pm 2,22$ g/dL. Como esse valor permaneceu entre 10 e 15, a elevação do fibrinogênio observada nos animais do grupo G2 ocorreu devido ao processo inflamatório decorrente da pneumonia em curso no momento da colheita do sangue.

Nas doenças do trato respiratório há resposta imune inflamatória, caracterizada pela ativação de células endoteliais, células epiteliais, macrófagos residentes e o recrutamento e ativação de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. O grau em que isso ocorre e os tipos celulares envolvidos variam amplamente nas diferentes doenças que acometem o trato respiratório (Van Der Vliet e Cross 2000, Dufloo et al. 2002). As pneumonias têm como característica um

rápido e maciço influxo de células fagocíticas da corrente sanguínea em direção às vias aéreas mais distais afetadas (Bircan et al. 2008). Os neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos, como parte da defesa do hospedeiro contra a infecção, produzem e liberam ERO em excesso após o contato com esses microorganismos (Farkhutdinov & Farkhutdinov 2000, Sordilho & Aitken 2009). A toxicidade das ERO liberadas por estimulação das células fagocíticas tem sido considerada um dos principais mecanismos de injúria pulmonar durante a inflamação e incriminada na patogênese da pneumonia em seres humanos e animais (Ledwozyw & Stolarczyk 1992, Katsoulis et al. 2005, Cemek et al. 2006, Al-Qudah 2009).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a produção das ERO e o sistema antioxidante, levando a danos celulares se ERO se não for adequadamente contido (Rahman & Macnee 2000, Comhair & Erzurum 2002, Silva & Gonçalves 2010). Os antioxidantes protegem as células contra a injúria oxidativa prevenindo a iniciação da peroxidação lipídica e produção final de produtos como as TBARS que, uma vez disponíveis, provocam danos celulares se ERO e irreversíveis (Al-Qudah 2009). No presente estudo todos os antioxidantes avaliados (SOD e GSH-Px) estavam significativamente diminuídos no grupo de animais portadores de pneumonia (G2), evidenciando o comprometimento das defesas antioxidantes nos ovinos doentes e a susceptibilidade à danos teciduais oxidativos à medida que a concentração de ERO aumentavam nesses animais. Corroborando com esses resultados, o decréscimo da atividade enzimática da SOD e da GSH-Px também foi relatado em bovinos e seres humanos portadores de pneumonia (Ledwozyw & Stolarczyk 1992, Katsoulis et al. 2005, Cemek et al. 2006, Al-Qudah 2009).

O aumento significativo da atividade enzimática da SOD nos animais portadores de pneumonia (G2) sugere que a doença levou ao aumento dos níveis de $O_2^{\bullet-}$ nos animais acometidos. Durante a explosão respiratória dos fagócitos o oxigênio molecular sofre redução enzimática para produzir compostos germicidas. A reação chave na explosão respiratória é a redução do O_2 a $O_2^{\bullet-}$ por meio da enzima NDAPH-oxidase (Brandt et al. 2003, Park et al. 2009). Como a SOD representa a primeira linha de defesa do organismo contra o estresse oxidativo, devido a sua ação catalítica na reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 , a sua atividade enzimática estava alterada na tentativa de neutralizar os efeitos deletérios provocados pelo excesso na produção dessas ERO durante a explosão respiratória das células fagocíticas recrutadas e/ou ativadas no ambiente pulmonar no curso da pneumonia. Ledwozyw e colaboradores (1992) relataram diminuição significativa na atividade enzimática da SOD em bezerros com broncopneumonia, correlacionando esse decréscimo com a elevação da concentração do $O_2^{\bullet-}$ e de leucócitos totais nos sangue desses animais, sugerindo que a produção dessas ERO na pneumonia está realmente associada ao processo de fagocitose.

O H_2O_2 resultante da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD é neutralizado pela ação da CAT e/ou por uma sucessão de reações mediadas pelas glutathionas, denominado ciclo redutor das glutathionas. Neste ciclo o H_2O_2 é reduzido por ação da GSH-Px, que utiliza a GSH como substrato doador de elétron, transformando-a em GSSG. Uma vez oxidada, a GSSG é convertida novamente em GSH pela ação da GSH-Rd. O ciclo redutor das glutathionas é também o principal mecanismo de

remoção dos lipoperóxidos oriundos das reações de peroxidação lipídica (Kinnula & Capro 2003, Kinnula 2005, Silva & Gonçalves 2010).

Em função da variação na concentração de H_2O_2 provocada pela ação da SOD, a atividade enzimática da GSH-Px também se alterou nos animais com pneumonia (G2), indicando que houve ativação do ciclo redutor das glutathionas e consumo da GSH-Px na tentativa de remover o excesso de H_2O_2 presente no ambiente pulmonar e impedir a formação do radical hidroxila, o estopim para a peroxidação lipídica (Silva & Gonçalves 2010). Contudo, cabe ressaltar que, associado à redução da GSH-Px, houve também redução da GSH-t nos animais do grupo G2, demonstrando que o estresse oxidativo induzido pela doença não foi contido pelo ciclo redutor das glutathionas.

A atividade enzimática da GSH-Px depende da GSH, que atua como substrato doador de elétrons durante a conversão do H_2O_2 em água pela GSH-Px (Rahman & Macnee 2000, Comhair & Erzurum 2002, Silva & Gonçalves 2010). A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento-SH presente na cisteína, sendo a GSH considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante celular (Galleano & Puntarulo 1995). Como a capacidade antioxidante da GSH está diretamente associada à atividade enzimática da GSH-Px, é possível que o consumo de GSH-Px tenha contribuído para diminuir a concentração de GSH no sangue dos ovinos portadores de pneumonia (G2). Como a glutathiona em maior concentração nos eritrócitos dos mamíferos está sob a forma reduzida (Meister & Anderson 1983, Machefer et al. 2004), o consumo de GSH pela GSH-Px provavelmente cooperou, juntamente com o decréscimo na atividade enzimática da GSH-Px, para a diminuição da GSH-t observada nos animais do grupo G2. Este achado sustenta a hipótese de que, uma vez que os danos oxidativos já tinham sido iniciados, o sistema de defesa antioxidante dos animais com pneumonia (G2) não foi suficiente para conter o aumento da produção de ERO.

Corroborando com os achados desse estudo, Cui et al. (1997) avaliou a GSH-Px no plasma de crianças com idade abaixo de 10 anos e portadoras de pneumonia e comparou esses resultados com indivíduos saudáveis, observando diminuição da atividade enzimática da GSH-Px no grupo portador de pneumonia. Ao avaliar o sangue de bezerros com pneumonia, Al-Qudah (2009) observou que os animais com broncopneumonia aguda apresentaram atividade enzimática da GSH-Px e concentração de GSH elevadas, enquanto que os animais portadores de forma crônica da doença apresentaram menor atividade enzimática da GSH-Px e decréscimo na concentração de GSH. Segundo o autor, a elevação da atividade enzimática da GSH-Px nos animais com broncopneumonia crônica pode ser resultado da massiva e duradoura produção de ERO no ambiente pulmonar devido à longa duração do processo pneumônico, levando ao esgotamento do sistema antioxidante e a danos severos na estrutura pulmonar. Nos casos agudos a rápida ativação do sistema antioxidante pode, por sua vez, ter limitado a produção de ERO ainda no início da doença, antes que as quantidades de GSH-Px se tornassem insuficientes para a remoção dos peróxidos lipídicos. Embora a diferenciação entre pneumonia aguda e crônica não tenha sido feita nesse estudo, o esgotamento do sistema antioxidante observado nos animais com pneumonia sugere que os ovinos desse estudo estão doentes há algum tempo.

Outro fato que sustenta essa hipótese são as características de disseminação da inflamação no ambiente pulmonar. Basicamente, as pneumonias são provocadas pela reação inflamatória decorrente da penetração de agentes

infecciosos no trato respiratório inferior. Nas fases iniciais, o processo pneumônico normalmente fica restrito a apenas um foco pulmonar. A disseminação da lesão inflamatória pelos pulmões ocorre principalmente por continuidade, mas também pode se dar pela passagem de material infeccioso por bronquíolos e vasos linfáticos e, assim, originar vários focos de infecção que se desenvolvem simultaneamente (Robbins et al. 2005, Radostits et al. 2002). Os ovinos com pneumonia (G2) apresentaram sinais claros de reação inflamatória aguda, como hiperfibrinogenemia e leucocitose com neutrofilia. Contudo, as características de disseminação do processo inflamatório pulmonar permitem supor que focos recorrentes da doença podem ter ocorrido nos animais do grupo G2 e isso ter contribuído para a manutenção da reação inflamatória no ambiente pulmonar por um período prolongado e, conseqüente, para o esgotamento do sistema antioxidante nesses animais.

Apesar do H_2O_2 ser considerado uma ERO fraca, sua estabilidade permite que ele atravesse membranas celulares e se difunda pela célula, facilitando sua união a elétrons provenientes de metais de transição como o Fe^{2+} ou o Cu^{2+} através das reações de Fenton e Haber-Weiss (Schimmel & Bauer 2002, Gurzau et al. 2003, Grundy et al. 2004), gerando $OH^\bullet$, uma das ERO mais reativas que o organismo pode produzir, capaz de desencadear a peroxidação das membranas lipídicas (Rahman & Manee, 2000, Comhair & Erzurum 2002, Silva & Gonçalves 2010). O aumento estatisticamente significativo da concentração de TBARS nos animais acometidos por pneumonia (G2) sustenta essa hipótese. As TBARS (principalmente o MDA) são produtos finais da peroxidação lipídica dos ácidos graxos insaturados das membranas celulares e, por isso, consideradas marcadores de lesão tissular (Bezerra et al. 2004). O processo de peroxidação lipídica inicia-se em membranas celulares, especialmente na membrana interna da mitocôndria, quando o radical $OH^\bullet$ busca abstrair o hidrogênio das ligações C-H da cadeia dos ácidos graxos insaturados. Como conseqüência, observa-se perda de integridade, permeabilidade e fluidez da membrana atingida (Antunes-Neto et al. 2005). Neste contexto, os dados deste experimento revelam que a pneumonia induziu a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, lesão tecidual, confirmado pela alteração dos valores de TBARS nos eritrócitos dos animais do grupo G2.

Vários estudos já relataram o aumento da concentração de TBARS no sangue periférico de seres humanos e animais portadores de pneumonia (Katsoulis et al. 2005, Cemek et al. 2006, Al-Qudah 2009). Al-Qudah (2009) observou aumento da concentração de TBARS em bezerros portadores de broncopneumonia, sendo mais evidente nos animais que se encontravam no estágio crônico da doença, sugerindo que manutenção da produção de ERO durante a doença crônica pode exacerbar os danos oxidativos nos pulmões. Cemek e colaboradores (2006) por sua vez observaram acréscimo na concentração de TBARS no sangue de crianças com pneumonia aguda. Kolhir et al. (1998) investigaram o efeito da terapia antioxidante sobre a peroxidação lipídica em seres humanos com pneumonia e observaram concentrações elevadas de TBARS no sangue de pacientes, durante as fases aguda e subaguda da doença, que antecederam o tratamento.

A atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT e a determinação da concentração das TBARS são comumente utilizadas para avaliar a capacidade de defesa do organismo contra a ação das ERO e os possíveis danos às estruturas celulares decorrentes de sua atuação. Alguns autores sugerem que o aumento da

produção de citocinas durante a fase inicial do processo inflamatório está associado com a atividade prejudicada das enzimas SOD, GSH-Px e CAT, o que resulta em aumento do estresse oxidativo e dano celular, verificado pelo incremento da apoptose celular (Linke et al. 2005). Segundo McIntyre et al. (1997), a extensão dos eventos inflamatórios e das injúrias eventualmente provocadas por eles está diretamente relacionada à intensidade do estímulo inicial e aos mecanismos imunológicos que são ativados durante o processo.

A ocorrência da pneumonia nos animais do grupo G2 deflagrou e exacerbou a resposta inflamatória pulmonar e a liberação de mediadores químicos, nos momentos que se seguiram. Essa sequência de eventos culminou em estresse oxidativo refletido na diminuição da atividade enzimática da SOD e GSH-Px e da concentração de GSH-t no sangue dos ovinos doentes. A peroxidação lipídica com consequente dano tecidual também ocorreu, visto que a concentração de TBARS estava elevada nos animais do grupo G2. Concluindo, os resultados deste estudo demonstram a ocorrência de estresse oxidativo e danos celulares em ovinos portadores de pneumonia, associado a marcada resposta inflamatória e acúmulo de células fagocíticas.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao auxílio financeiro e a bolsa de estudos de doutorado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proc. 2010/00044-4 e 2008/58929-7, respectivamente).

REFERÊNCIAS

- Allen, B.V., Kold, S.E. 1988. Fibrinogen response to surgical tissue trauma in the horse. *Equine Vet. J.* 20(6):441-443.
- Al-Qudah, K. M. 2009. Oxidative stress in calves with acute chronic bronchopneumonia. *Rev. Med. Vet.* 160(5):231-236.
- Amarante, A.F.T., Barbosa, MA., Oliveira, M.R., Carmello M.J., Padovani, C.R. 1992. Efeito da administração de Oxfendazol, Ivermectina e Levamisole sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38(29):31-38.
- Andrews, A.H. 1992. Calf respiratory disease, p.202-212. In: Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, R.G., Eddy, R.G. (Ed.) *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*. Blackwell, Oxford.
- Antunes-Neto, J.M.F., Joaquim, M.F., Silva, L.P., Macadeo, D.V. 2005. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Rev. Bras. Ciênc. Mov.* 13(3):73-79.
- Baca-Estrada, M.E., Godson, D.L., Hughes, H.P.A., Van Donkersgoed, J. Van Kessel, A., Harland, R., Shuster, D.E., Daley, M., Babiuk, L.A. 1995. Effect of recombinant bovine interleukin-1 β on viral/bacterial pneumonia in cattle. *J. Interferon Cytokine Res.* 15(5):431-439.

- Baldock, N.M., Sibly, R.M. 1990. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 28(1-2):15-39.
- Belknap, E.B. 1993. Recognizing the clinical signs of BRSV infection. *Vet. Med.* 88(9):886-887.
- Bezerra, F.J.L., Rezende, A.A., Rodrigues, S.J., Almeida, M.G. 2004. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 54(5):640-649.
- Bowland, S.L., Shewen, P.E. 2000. Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada. *Can. Vet. J.* 41:33-48.
- Brandt, C.T., Leite, C.R.C, Manhães-de-Castro, R., Brandt Filho, C., Castro, C.M.M.B. 2003. Aderência e atividade microbicida de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica cirúrgica. *Acta Cir. Bras.* 18(2):143-153.
- Braz, M.P. 1981. *Semiologia Médica Animal*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 644p.
- Breeze, R. Structure, function, and metabolism in the lung. 1985. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1(2):219-35.
- Campbell, T.W. 2004. Clinical Chemistry of Birds, p449-479. In: Thrall, M.A. *Veterinary Hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Cemek, M., Aksen, H.C., Lu, F.B., Cemek, F. Dede, S. 2006. Oxidative stress and enzymic-non-enzymic antioxidant responses in children with acute pneumonia. *cell biochemistry and function. Cell Biochem. Funct.*, 24(3):269-273.
- Comhair, S.A.A., Erzurum, S.C. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 283(2):L246-L255, 2002.
- Crandell, R.A. 1993. Viral Diseases of Cattle, p.417-419. In: Howard, J.L. *Current Veterinary Therapy 3: Food Animal Practice*. 3rd.ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Creutzberg, E. 2003. Leptin in relation to systemic inflammation and regulation of the energy balance. *Eur. Respir. Mon.* 24:56-66.
- Cui, H., Yin, S.A., Gao, H. Li, G. 1997. The comparison of selenium status between the children suffering from pneumonia and the normal children from kindergarten. *Wei. Sheng Yan. Jiu.* 26(2):42-24.

- Cutlip R.C., Brogden A.K., Lehmkuhl H.D. 1998. Changes in the lungs of lambs after intratracheal injection of lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* A1. J. Com. Path. 118:163-167.
- Demartin, J.C., Davies, R.B. 1977. An epizootic of pneumonia in captive bighorn sheep infected with *Muellerius* sp. J. Wildl. Dis. 13(2):117-124.
- Dourodo, V.Z., Vale, S.A., Faganello, M.M., Sanchez, F.F., Godoy, I. 2006. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. J. Bras. Pneumol. 32(2):161-171.
- Duflo, F., Debon, R., Goubadle, J., Chassard, D., Allaouchiche, B. 2002. Alveolar and serum oxidative stress in ventilator-associated pneumonia. Br. J. Anaesth. 89(2):231-236.
- Faraías, M.T., Bordin, E.L., Forbes, A.B. 1997. Newcomb, K. A survey on resistance to anthelmintic in sheep stud farms of southern Brazil. Vet. Parasitol. 72:209-214.
- Farkhutdinov, U.R., Farkhutdinov, R.R. 2000. Free-Radical Oxidation during experimental pneumonia. Bull. Exp. Biol. Med. 129(3):260-264.
- Ferrari, S., Piccinini, R., Silva, M., Exadaktylos, V., Berckmans, D., Guarino, M. 2010. Cough sound description in relation to respiratory diseases in dairy calves. Prevent. Vet. Med. 96:276-280.
- Galleano, M., Puntarulo, S. 1995. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. Biochim. Biophys. Acta, 127(2-3):321-326.
- Ganheim, C., Hultén, C., Carlsson, U., Kindahl, H., Niskanen, R., Waller, K.P. 2003. The acute response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. J. Vet Med, Series B, 50(4):183-190.
- Garcia, M., Libera, A.M.M.P.D., Barros Filho, I.R. 1996. Manual de Semiologia e Clínica dos Ruminantes. Editora Varela, São Paulo. 247p.
- Gonçalves, R.C., Silva, A.A., Ferreira, D.O.L., Marcondes, J.S., Pituco, E.M., Dias, A.D. 2011. Detection of serum antibodies to parainfluenza type 3 virus, respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, and herpes virus type 1 in sheep in the Region of Botucatu, São Paulo – Brazil. J. Vet. Med. Anim. Health. 3(4):1-5.
- Gonçalves, R.C. 1997. Estudo clínico e citológico em bezerros clinicamente saudáveis 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., Kunchebunck, M.R., Curi, P.R., Chiacchio, S.B., Almeida, C.T., Borges, A.S. 2001. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. *Rev. Ciênc. Rural*, 31(2):263-269.
- Gonçalves, R.C.; Feitosa, F.L. 2008. Semiologia do sistema respiratório, p.313-331. In: Feitosa, F.L. *Semiologia Veterinária – A Arte do Diagnóstico*. Editora Roca, São Paulo.
- Goodwin-Ray, K.A., Stevenson, M.A., Heuer, C., Cogger, N. 2008. Economic effect of pneumonia and pleurisy in lambs in New Zealand. *New Zealan. Vet J.* 56(3):107-114.
- Grundy, M.A., Gorman, N., Sinclair, P.R., Chorney, M.J., Gerhard, G.S. 2004. High-throughput non-heme iron assay for animal tissues. *J. Biochem. Biophysical Methods* 59(2):195-200.
- Gurzau, E.S., Neagu, C., Gurzau, A.E. 2003. Essential metal – case study on irion. *Ecotoxicol. Enveron. Saf.* 56(1):190-200.
- Hargreaves, A.L., Hutson, G.D. 1990. Changes in heart, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 26(1-2):91-101.
- Hinchcliff, K.W., Byrne, B. 1991 Clinical examination of the respiratory system. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 7(1):1-26.
- Horadagoda, N.U, Knox, K.M.G., Gibbes, S.W., Redi, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards, S.E.R., Eckersall, P.D. 1999. Acute phase protein in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.*, 144(16):437-441.
- Jain, N.C. 1993. *Essentials of veterinary hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia 417p.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.th ed. Academic Press, New York. 932p.
- Katsoulid, K., Kontakiotis, T., Baltopoulos, G., Kotosovili, A., Legakis, I.N. 2005. Total Antioxidant Status and Severity of Community-Acquired Pneumonia: Are They Correlated? *Respiration*, 72(4):381–387.
- Kerr, M.G. 2003. *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária. Bioquímica Clínica e Hematologia*. 2th ed. Editora Roca, São Paulo. 436p.
- Kidd, R. Interpreting neutrophil numbers. 1991. *Vet. Med.* 86(10):975-982.
- Kolhir, V.K., Bykon, V.A., Teselkin, Y.O., Babenkova, I.V., Tijukavkina, N.A., Rulenko, I.A., Kolesnik, Y.A., Eicholz, A.A. 1998. Use of a new antioxidant diquertin as

- an adjuvant in the therapy of patients with acute pneumonia. *Phytother Res.* 12(8):606-608.
- Kotlikoff, M.I.; Gillespie, J.R. 1984. Lung sounds in veterinary medicine: Part II. Deriving clinical information from lung sounds. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 6:462-467.
- Kotlikoff, M.I., Gillespie, J.R. 1983. Lung sounds in veterinary medicine: Part I. Terminology and mechanisms of sound production. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 5:634-644.
- Lacasta, D., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., González, J.M., Las Heras, M. 2008. Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. *Small Rumin. Res.* 80:28-32.
- Latimer, K.S., Mahaffey, E.A., Prasse, K.W. 2003. *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology.* 2th ed. Blackwell Publishing Company, Iowa. 450p.
- Ledwozyw, A., Stolarczyk, H. 1992. The involvement of polymorphonuclear leukocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves. VI. Superoxide dismutase and lipoprotein lipase activities. *Acta Vet. Hung.* 40(4):267-277.
- Lehrer, S. 1990. *Entendendo os sons pulmonares.* Editora Roca, São Paulo 147p.
- Linke, A., Adams, V., Schulze, P.C., Erbs, S., Gielen, S., Fiehn, E. 2005. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*, 111(14):1763-1770.
- Lorenzi, T.F. 2003. Anemias, p.193-288. In: Lorenzi T.F. *Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica.* 3th. ed. MEDSI, Rio de Janeiro.
- Machefer, G., Groussard, C., Ranou-Bekono, F., Zouhal, H., Faure, H., Vicent, S., Cillard, J., Gratas-Delamarche, A. 2004. Extreme running competition decrease blood antioxidant defense capacity. *J. Am. Coll. Nutr.* 23(4):358-364.
- Marcondes, J.S. Estudo clínico-citológico em ovinos sadios e portadores de afecções pulmonares de ocorrência natural, utilizando-se o lavado traqueobrônquico como auxílio diagnóstico. Dissertação de Mestrado em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Botucatu, SP. 107p.
- Marek, J., Mócsy, J. 1965. *Tratado de Diagnóstico Clínico de Las Enfermedades Internas de los Animales Domésticos.* Labot, Barcelona. 526p.
- Marriott, H.M., Jackson, L.E., Wilkinson, T.S., Simpson, A.J., Mitchell, T.J., Buttle, D.J., Cross, S.S., Ince, P.G., Hellewell, P.G., Whyte, M.K.B., Dockrell, D.H. 2008.

- Reactive Oxygen Species Regulate Neutrophil Recruitment and Survival in Pneumococcal Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177(8):887–895.
- McIntyre, T.M., Modur, V., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. 1997. Molecular mechanisms of early inflammation. *Thromb. Haem.* 78(1):302-305.
- 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.
- Meister, A., Anderson, M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52:711-716. 1983.
- Mohamed, R.A., Abdelsalam, E.B. 2008. A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory mannheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. *Bulg. J. Vet. Med.* 11(3):139–160.
- Park, H.S., Kim, S.R., Lee, Y.C. 2009. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*, 14(1):27-38.
- Pfeffer, A., Rogers, K.M. 1989. 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.* 46(1):118-124.
- Pringle, J.K. 1992. Ancillary testing for the ruminant system. *Vet. Clin. North Am.* 8(2):243-256.
- Radostits, O.M., Gat, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. 2002. *Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. 9th. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1737p.
- Rahman, I., Macnee, W. 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* 16(3):534-554.
- Sabat, R., Guthmann, F., Rustow, B. 2008. Formation of reactive oxygen species in lung alveolar cells: effect of vitamin E deficiency. *Lung*, 186(2):115–122.
- Sacher, R.A., McPherson, R.A. 2002. Hematologia, p.431-441. In: Sacher, R.A.; McPherson, R.A. *Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais*. 11.ed. Manole, São Paulo.
- Schalm, O.W. 1977. Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170(10):1137-1140.
- Schimmel, M., Bauer, G. 2002. Proapoptotic and redox-state related signaling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. *Oncogene* 21(38):5886-5896.

- Schultze, A.E. 2000. Interpretation of Canine Leucocyte Responses, p.366-381. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. Schalm's veterinary hematology. 5th.ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Silva, A.A., Ferreira, D.O.L., Porto, C.D., Sequeira, J.L., Gonçalves, R.C. 2010. Segurança e eficácia da técnica de biopsia pulmonar transtorácica percutânea para avaliação histopatológica do parênquima pulmonar de ovinos clinicamente sadios. *Pesq. Vet. Bras.* 30(4):27-31.
- Silva, A.A., Gonçalves, R.C. 2010. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Cien. Rural* 40(4):994-1002.
- Smith, J.A. 2002. Ruminant respiratory system, p.560-618. In: Smith, B.P. Large Animal Internal Medicine. Mosby, St Louis.
- Sordillo, L.M., Aitken, S.L. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128(1-3):104-109.
- DE SOUZA, M.S.S., Sinzato, Y.K., Lima, P.H.O., Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., Damasceno, D.C. 2010. Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Reprod. Biomed. Online*, 20(4):547-552.
- Stipkovits, I., Ripley, P.H., Tenk, M., Glávits, R., Molna, T., Fodor, L. 2005. The efficacy of valnemulin (Econor) in the control of disease caused by experimental infection of calves with *Mycoplasma bovis*. *Res. Vet. Sci.* 78(3):207-215.
- Stöber, M. 1993. Aparelho Respiratório, p.139-165. In: Dirksen, G., Gründer, H.D., Stöber, M. Exame Clínico dos Bovinos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Sutton, R.H., Hobman, B. 1975. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *N. Z. Vet. J.* 23(3):21- 27.
- Taylor, J.A. 2000. Leukocyte response in Ruminants, p.391-404. In: Feldman, B.F.; Zinkl J.G.; Jain, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 5th.ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Tizard, I.R. 2009. Imunologia Veterinária – Uma Introdução. 8th.ed. Elsevier, São Paulo. 2009.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free Radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39:44-84.
- Van Der Vliet, A., Cross, C.E. 2000. Oxidants, Nitrosants, and the Lung. *Am. J. Med.* 109(5):398-421.

- Vestweber, J.G., Klemm, R.D, Leipold, H.W., Johnson, D.E., Baile, W.E. 1990. Clinical and pathologic studies of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia in calves. Am. J. Vet. Res. 51(11):1792-1798.
- Viana, L. 2003. Pesquisa de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* e *Pasteurella multocida* em ovinos clinicamente sadios e portadores de afecções respiratórias na região de Botucatu-SP. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 76p.
- Weiss, D.J., Wardrop, K.J. Schalm's Veterinary Hematology. 6ª ed. Iwoa: Wiley-Blackwell, 2010. 1206p.
- Wilson, J.H., Lofstedt, J. 1990. Alterations in Respiratory Function, p.47-99. In: Smith, B. Large Animal Internal Medicine: Diseases of Horses, Cattle, Sheep and Goats. C.V., St Louis.
- Wright, D.T., Cohn, L.A., Fisher, B., Li, C.M., Adler, K.B. 1994. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. Environ. Health Perspect. 102:85-90.

Quadro 1. Idade, sexo e peso de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011 (média e desvio padrão)

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=20) Média ± Sd¹</i>	<i>G2 (n=20) Média ± Sd</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Idade (dias)</i>	175,45 ± 10,92	176,10 ± 9,42	<i>p>0,05</i>
<i>Sexo</i>			
<i>Machos</i>	0	2	<i>p>0,05</i>
<i>Fêmeas</i>	20	18	
<i>Peso (Kg)</i>	37,10 ± 1,13	32,15 ± 1,22*	<i>p<0,05</i>

* Significativo ao Teste de Mann-Whitney ($p<0,05$).

¹ Sd: desvio padrão

Quadro 2. Médias (M), desvios padrão (sd), medianas e valores máximos e mínimos das variáveis temperatura (°C), frequência respiratória e frequência cardíaca de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=20)</i>	<i>G2 (n=20)</i>
<i>Temperatura (°C)</i>		
<i>Média ± sd</i> ¹	39,6 ± 0,28	40,15 ± 0,34*
<i>Mediana</i>	39,6	40,0
<i>Máximo</i>	40,0	40,8
<i>Mínimo</i>	38,9	39,6
<i>Frequência Respiratória</i>		
<i>Média ± sd</i>	34,20 ± 8,99	71,95 ± 31,95*
<i>Mediana</i>	36	80
<i>Máximo</i>	48	120
<i>Mínimo</i>	22	20
<i>Frequência Cardíaca</i>		
<i>Média ± sd</i>	105,10 ± 15,46	119,4 ± 25,77
<i>Mediana</i>	100	120
<i>Máximo</i>	160	160
<i>Mínimo</i>	92	88

* Significativo ao Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher (p<0,05).

¹ Sd: desvio padrão

Quadro 3. Frequências de observação e percentuais dos sinais clínicos de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011

Sinal Clínico	G1 (n=20)		G2 (n=20)	
	n	%	n	%
<i>Tosse</i>	0	0	17	85%*
<i>Secreção nasal</i>	0	0	18	90%*
<i>Dispnéia mista</i>	0	0	11	55%*
<i>Frêmito traqueal</i>	0	0	10	50%*
<i>Frêmito brônquico</i>	0	0	12	60%*
<i>Reflexo da tosse positivo</i>	0	0	19	95%*
<i>Ruído laringotraqueal aumentado</i>	0	0	19	95%*
<i>Ruído traqueobrônquico aumentado</i>	0	0	19	95%*
<i>Ruído broncobronquiolar aumentado</i>	0	0	10	50%*
<i>Área de silêncio pulmonar</i>	0	0	0	0
<i>Crepitação grossa</i>	0	0	15	75%*
<i>Crepitação fina</i>	0	0	11	55%*
<i>Ronco</i>	0	0	2	10%
<i>Sibilo</i>	0	0	10	50%*
<i>Roce pleural</i>	0	0	0	0
<i>Odor expiratório fétido</i>	0	0	2	10%
<i>Posição ortopnéica</i>	0	0	3	15%
<i>Hipertermia</i>	0	0	9	45%*
<i>Frequência respiratória aumentada</i>	10	50%	14	70%*
<i>Frequência cardíaca aumentada</i>	4	20%	13	65%

* Significativo ao Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher (p<0.05).

Quadro 4 Resultado da análise das variáveis hematológicas no sangue periférico de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011 (média e desvio padrão)

<i>Variáveis</i>	<i>G1 (n=20) Méd¹ ± Sd²</i>	<i>G2 (n=20) Méd ± Sd</i>
<i>Hemácias (x10⁶/μl)</i>	11,14 ± 1,35	11,47 ± 1,53
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	11,16 ± 1,32	11,31 ± 1,49
<i>Volume Globular (%)</i>	30,32 ± 3,63	30,55 ± 03,57
<i>Proteína Plasmática Total (g/dL)*</i>	7,06 ± 0,53	7,84 ± 1,02*
<i>Fibrinogênio (mg/dL)*</i>	267,0 ± 91,20	652 ± 127,30*
<i>Plaquetas (x10³/μl)</i>	582 ± 101	647 ± 132
<i>Leucócitos totais (x10³/μl)*</i>	8,170 ± 1,562	15,365 ± 2,578*
<i>Mielócitos/μl</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Metamielócitos/μl</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Bastonetes/μ</i>	13,00 ± 33,10	92,08 ± 147,20
<i>Segmentados/μ</i>	2902,00 ± 844,00	10110,00 ± 1796,00*
<i>Eosinófilos/μ</i>	355,00 ± 119,30	1899,00 ± 476,00*
<i>Linfócitos/μ</i>	4768,00 ± 1045,00	2878,00 ± 646,00*
<i>Monócitos/μ</i>	109,30 ± 85,10	301,00 ± 234,40*
<i>Basófilos/μ</i>	12,6 ± 31,34	39,10 ± 83,60

* Significativo ao Teste de Mann-Whitney (p<0,05).

¹Sd: desvio padrão.

Quadro 5. Resultado da análise das variáveis Superóxido Dismutase (SOD), Glutathiona Total (GSH-t), Glutathiona Peroxidase (GSH-Px) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de ovinos sadios (G1) e portadores de pneumonia (G2) da região de Botucatu/SP, 2011 (média e desvio padrão)

<i>Variáveis</i>	G1 (n=20) Média ± Sd	G2 (n=20) Média ± Sd
<i>SOD (UI/g Hb)</i>	8764,31 ± 3346	5927 ± 2674*
<i>GSH-t (μM/g Hb)</i>	7,96 ± 2,2	6,31 ± 2,48*
<i>GSH-Px (UI/mg Hb)</i>	0,58 ± 0,12	0,35 ± 0,1*
<i>TBARS (Nm/g Hg)</i>	262,1 ± 72,6	433,9 ± 149,1*

* Significativo ao Teste de Mann-Whitney (p<0,05).

¹ Sd: desvio padrão.