

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE EQUINOS
SUBMETIDOS À BIÓPSIA HEPÁTICA COM AGULHA
TRU-CUT GUIADA POR ULTRASSOM**

Daniela Junqueira de Queiroz

Médica Veterinária

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE EQUINOS
SUBMETIDOS À BIÓPSIA HEPÁTICA COM AGULHA
TRU-CUT GUIADA POR ULTRASSOM**

Daniela Junqueira de Queiroz

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária**

2014

Queiroz, Daniela Junqueira de

Q3a Alterações clínicas e laboratoriais de equinos submetidos à biópsia hepática com agulha Tru-cut guiada por ultrassom / Daniela Junqueira de Queiroz. – – Jaboticabal, 2014

xvii, 43 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: José Corrêa de Lacerda Neto

Banca examinadora: Gesiane Ribeiro Leão Ferraz, Julio Carlos Canola

Bibliografia

1. Cavalo. 2. Fígado. 3. Biópsia percutânea. 4. Ultrassonografia. 5. Fluido peritoneal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-073:636.1

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Daniela Junqueira de Queiroz – Nascida em São Paulo, SP, no dia 08 de fevereiro de 1985, filha de Marco Antônio de Queiroz e Paula Junqueira de Queiroz. Em janeiro de 2010 graduou-se Médica Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP – Jaboticabal). Em fevereiro de 2012 concluiu o Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, na área de Clínica Médica de Grandes Animais, junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, pertencente à mesma instituição. Atua como docente das disciplinas de Técnica Cirúrgica e Anestesiologia, Semiologia e Laboratório Clínico e Clínica Médica e Terapêutica de Grandes Animais, do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário “Barão de Mauá”. Possui experiência na área de Clínica Médica de Equinos e Ruminantes e em Medicina Esportiva Equina. Atualmente é aluna regular do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica, da FCAV/UNESP – Jaboticabal.

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, em especial ao meu pai Marco Antônio e à minha mãe Paula, por todo amor, carinho e apoio incondicionais.

Aos meus cachorros Tobias (*in memorian*) e Baltazar (*in memorian*), por toda a alegria que me proporcionaram, e Jeremias, por me fazer ter vontade de voltar para casa todos os dias.

Às amigas Nathália, Cristiane, Angélica, Ana Elisa, Marina e Raquel, e aos amigos Fábio, Jairo e Bruno. Saibam que apesar da distância vocês estarão sempre em meu coração.

Aos moradores da República Nazarena e agregados por estarem sempre ao meu lado.

A todos os amigos do hospital veterinário, em especial Ana Maria, Cínthia, Cássia, Nara, Michele, Darcio, Vinícius, Yuri, Samuel e Gabriela por todos os bons momentos, pela paciência e amizade.

A todos os professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, em especial aos professores José Corrêa de Lacerda Neto, Júlio Carlos Canola, Luiz Carlos Marques, José Jurandir Fagliari, Mário Roberto Hatayde, José Wanderley Cattelan, José Antônio Marques e Delphim da Graça Macoris, por todos os ensinamentos e inspiração que são para mim.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário, sem os quais o trabalho seria muito mais difícil, para não dizer impossível.

Aos animais sem os quais eu não teria realizado meu grande sonho de me tornar Médica Veterinária.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, meu orientador, ao qual agradeço não só pelos ensinamentos, mas também pela amizade e aproveito para expressar meu carinho, admiração e respeito sinceros.

Ao Prof. Dr. Júlio Carlos Canola por toda a ajuda nesse trabalho e em tantos outros momentos. Também expresso minha admiração e respeito.

À Deborah Penteado Martins Dias, Lina Maria Wehrle Gomide e Nara Saraiva Bernardi, pela contribuição científica, paciência e ajuda na execução deste trabalho.

À Gabriela Bregadioli e Felipe Crialesi por toda a ajuda durante o experimento.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e a toda a equipe do Laboratório de Patologia Clínica, em especial à Mônica Ribeiro Sant'Anna Chaves, Nathan da Rocha Neves Cruz e Eugênio de Campos Filho, por toda a ajuda e paciência.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), minha segunda casa, por todas as oportunidades que vem me proporcionando ao longo dos últimos oito anos.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivos específicos	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Animais e manejo	12
4.2 Grupos experimentais	12
4.3 Exame físico	13
4.4 Colheita de sangue, hemograma e análises bioquímicas	13
4.5 Colheita e análise do fluido peritoneal	14
4.6 Biópsia hepática	14
4.7 Análise estatística	17
5 RESULTADOS	18
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÃO	35
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE EQUINOS SUBMETIDOS À BIÓPSIA HEPÁTICA COM AGULHA TRU-CUT GUIADA POR ULTRASSOM

RESUMO - As doenças hepáticas são bastante comuns nos animais pecuários e responsáveis por inúmeras perdas econômicas, associadas não apenas à morte como também à diminuição da produção e do rendimento e aos gastos com exames diagnósticos e tratamentos. Em equinos as afecções hepáticas são bastante frequentes, acometendo animais de todas as idades e raças, tanto machos quanto fêmeas. O diagnóstico das afecções hepáticas em animais domésticos é feito por análises bioquímicas, exame radiográfico e ultrassonográfico e exame histopatológico de fragmento do órgão colhido por meio de biópsia hepática. O objetivo com o presente estudo é avaliar as possíveis alterações clínicas e laboratoriais induzidas pela realização da técnica de biópsia hepática percutânea guiada por ultrassom em equinos. Para tanto foram utilizados oito equinos sem raça definida (SRD) adultos, machos ou fêmeas, entre 5 e 10 anos de idade, alocados aleatoriamente em dois grupos experimentais, cada grupo sendo composto por quatro animais. O modelo experimental utilizado foi o “crossing over”, assim os grupos experimentais foram invertidos após um período de descanso de seis meses. Os animais do primeiro grupo, denominado G1, foram submetidos à biópsia hepática, enquanto os animais do grupo denominado G2 serviram como grupo controle, sendo submetidos a todos os procedimentos, exceto à biópsia hepática. Foram realizadas colheitas de sangue e de fluido peritoneal para análise hematimétrica, leucométrica e bioquímica, além de exames físicos diários. As variáveis analisadas não apresentaram diferença estatística entre os grupos Controle e Biópsia, com excessão da coloração do fluido peritoneal que se tornou avermelhado após a biópsia. Conclui-se que a técnica de biópsia Tru-cut hepática é segura e eficiente, sendo indicada para o diagnóstico de enfermidades hepáticas difusas em equinos na rotina hospitalar.

Palavras-Chave: biópsia percutânea, cavalo, fígado, fluido peritoneal, ultrassonografia

CLINICAL AND LABORATORIAL CHANGES INDUCED BY THE TRU-CUT LIVER BYOPSY TECHNIQUE GUIDED BY ULTRASOUND

ABSTRACT - Liver diseases are very common in livestock animals and are responsible for numerous economic losses, associated not only with death but also with low production rates and expenses with diagnostic exams and treatments. Hepatic diseases in horses are relatively frequent and it can harm animals of all ages, sex and breeds. The diagnosis of liver affections in domestic animals is made with biochemical analyses, x-ray and ultrasound exams, and histopathological exam of liver fragment obtained by a liver biopsy. The aim of this study was to evaluate the possible clinical and laboratorial changes induced by the percutaneous liver biopsy technique guided by ultrasound in horses. Eight adult horses, male or female, ages ranged from 5 to 10 years, were used in this study. The animals were divided into two experimental groups: control group and biopsy group. Peritoneal fluid and blood samples were collected for hematimetric, leucometric and biochemicanalysis, besides the daily physical exams. The analyzed variables did not differ statistically in between the two groups, regardless the peritoneal fluid color witch became reddish after the biopsy was done. In conclusion, the Tru-cut liver biopsy technique is safe and efficient; its use for diagnoses purposes of hospital routine of liver diseases in horses is adequate

Keyword: horse, liver, percutaneous biopsy, peritoneal fluid, ultrasound

LISTA DE ABREVIATURAS

Alb: albumina

ALP: fosfatase alcalina

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

BD: bilirrubina direta

BI: bilirrubina indireta

bpm: batimentos por minuto

C: cavalo

CK: creatina quinase

CM: coloração de mucosas

EPM: erro padrão da média

FC: frequência cardíaca

FR: frequência respiratória

GB: grupo biópsia

GC: grupo controle

GGT: gama glutamiltransferase

GLDH: glutamato desidrogenase

Hb: concentração de hemoglobina

He: contagem global de hemácias

Ht: porcentagem de hematócrito

MI: motilidade intestinal

mpm: movimentos respiratórios por minuto

Pt: proteína total

s: segundos

SDH: sorbitol desidrogenase

SRD: sem raça definida

T: temperatura

TPC: tempo de preenchimento capilar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média \pm EPM da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm), da frequência respiratória (FR) em movimentos respiratórios por minuto (mpm), do tempo de preenchimento capilar (TPC) em segundos (s) e da temperatura retal (T) em graus Celsius ($^{\circ}$ C) de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....19

Tabela 2. Média \pm EPM da contagem global de hemácias (He), concentração de hemoglobina (Hb), porcentagem de hematócrito (Ht) e contagem global de plaquetas de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....20

Tabela 3. Média \pm EPM da contagem total de leucócitos e do número de basófilos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....21

Tabela 4. Média \pm EPM da concentração de fibrinogênio de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....22

Tabela 5. Média \pm EPM da concentração de AST (UI/L), ALP (UI/L), GGT (UI/L), bilirrubinas direta (BD) e total (BT), em mg/dL, CK (UI/L), proteína total (Pt), em g/dL e albumina (Alb), em g/dL, de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S)...24

Tabela 6. Média \pm EPM da concentração de células nucleadas ($\times 10^2/\mu\text{L}$), da concentração de neutrófilos segmentados ($\times 10^2/\mu\text{L}$), da concentração de linfócitos ($\times 10^2/\mu\text{L}$) e da concentração de macrófagos ($\times 10^2/\mu\text{L}$) no líquido peritoneal de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem fotográfica demonstrando o procedimento de colheita de tecido hepático de equino hígado, por meio de biópsia percutânea guiada por ultrassom....15
- Figura 2.** Imagem ultrassonográfica evidenciando agulha modelo Tru-cut (seta) inserida no parênquima hepático de equino hígado para colheita de tecido.....16
- Figura 3.** Imagem fotográfica demonstrando fragmento de tecido hepático de equino hígado colhido por meio de biópsia percutânea.....16
- Figura 4.** Variação dos valores médios \pm EPM da contagem global de leucócitos, em $10^3/\mu\text{L}$ (A); e de monócitos, em $10^2/\mu\text{L}$ (B) de equinos do grupo controle (GC – linha cinza) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB – linha vermelha). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....21
- Figura 5.** Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de fibrinogênio (mg/dL) de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....22
- Figura 6.** Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de ALP (UI/L)m em (A), e GGT (UI/L) de equinos do grupo controle (GC – linha cinza) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB – linha vermelha). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....24
- Figura 7.** Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de bilirrubina direta (BD), em mg/dL, de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram

realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).....25

Figura 8. Imagem fotográfica demonstrando o fluido peritoneal de um animal do GC (esquerda) e um animal do GB (direita) no M24 (A) e imagem fotográfica do fluido peritoneal do mesmo animal do GB no M72 (B).....26

Figura 9. Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de células nucleadas ($\times 10^2/\mu\text{L}$), em (A) e concentração de neutrófilos segmentados ($\times 10^2/\mu\text{L}$), em (B), de equinos do grupo controle (GC – linha cinza) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB – linha vermelha). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 24 (M24) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S.....)27

..

1 INTRODUÇÃO

As afecções hepáticas em equinos são bastante frequentes (WEST, 1996; SMITH et al., 2003), acometendo animais de todas as idades e raças, tanto machos quanto fêmeas (WEST, 1994). Em estudo realizado por Smith (2003), os animais com idade mediana, entre oito e onze anos, foram os mais acometidos. Algumas afecções são associadas a grupos específicos de animais, como por exemplo o caso do carcinoma de ductos biliares, de maior ocorrência em animais idosos (EAST & SAVAGE, 1998) e, da lipidose hepática, doença que acomete com maior frequência os pôneis machos (WEST, 1994).

Entre os exames complementares de afecções hepáticas em animais domésticos se encontram as análises bioquímicas, a radiologia e a ultrassonografia (RADOSTITS et al., 2002). Tais exames são eficientes na detecção de alterações do órgão e na graduação de severidade, porém, raramente fornecem diagnósticos específicos (BUNCH et al., 1985; BARR, 1995). Nesse contexto, o exame histológico de tecido hepático obtido por meio de biópsia é indispensável para o estabelecimento de diagnóstico e prognóstico precisos (BUNCH et al., 1985). A colheita seriada de amostras de tecido hepático por meio de biópsias demonstrou-se uma alternativa importante para a investigação da evolução de doenças tóxicas (COLODEL et al., 2000), para a análise de substâncias em estudos de nutrição animal (HIDIROGLOU & IVAN, 1993) e para estudos sobre a patogênese e a evolução de lesões hepáticas (NÉSPOLI et al., 2010).

Apesar da importância da avaliação histológica de tecido hepático na determinação precisa do diagnóstico e prognóstico de inúmeras afecções do fígado de equinos, a técnica de colheita de fragmento hepático por biópsia foi pouco estudada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as possíveis alterações clínicas e laboratoriais induzidas pela realização da técnica de biópsia hepática percutânea guiada por ultrassom em equinos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia e a segurança da técnica de biópsia Tru-cut hepática guiada por ultrassom em equinos
- Avaliar se a biópsia hepática é capaz de causar reação inflamatória da cavidade abdominal, por meio da análise de fluido peritoneal
- Avaliar o hemograma e o perfil bioquímico de animais submetidos à biópsia Tru-cut hepática

3 REVISÃO DE LITERATURA

O fígado é a maior glândula do corpo. Sua localização varia entre as espécies, porém ele está sempre localizado logo atrás do diafragma (GETTY, 1986; KONIG, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; ROSS, 2008).

Nos equinos o fígado é bastante variável em forma e tamanho, pesando cerca de 5kg em cavalos atletas, correspondendo portanto a 1,5% do peso corporal, uma proporção muito menor do que a encontrada em carnívoros. Em relação à sua posição situa-se na parte mais cranial do abdômen, diretamente contra a face abdominal do diafragma. É nitidamente assimétrico em indivíduos jovens, nos quais aproximadamente 2/3 se encontram à direita do plano mediano. A parte mais caudal, que é também a mais dorsal, localiza-se ventralmente às extremidades vertebrais da décima sexta e décima sétima costelas do lado direito. As partes mais craniais e mais ventrais localizam-se contra a parte esquerda do vértice do diafragma. O eixo mais longo é, portanto, oblíquo (DYCE et al., 2010).

Em potros neonatos, o fígado é proporcionalmente muito maior, estendo-se no assoalho abdominal para além dos arcos costais, e é também mais simétrico. Em animais mais velhos é comum ocorrer atrofia, mais óbvia do lado direito, resultante, provavelmente, de pressões crônicas do cólon dorsal direito e da base do ceco. Com menor frequência o lobo esquerdo atrofia, talvez por pressão do estômago (DYCE et al., 2010).

O sistema de ductos dos equinos é marcado pela ausência de vesícula biliar, mas seu amplo calibre compensa isso. O ducto biliar se abre dentro do duodeno cranial na papila compartilhada com o ducto pancreático maior. A passagem oblíqua do ducto pela parede duodenal atua como um esfíncter e previne o influxo de ingesta (KONIG, 2004; DYCE et al., 2010).

O componente estrutural básico do fígado é a célula hepática, ou hepatócito. Estas células epiteliais estão agrupadas em placas interconectadas. O fígado é subdividido em lóbulos hexagonais, cada lóbulo é delimitado por um septo de tecido conjuntivo frouxo e, em cada canto do hexágono encontra-se o espaço porta que, por sua vez, contém pelo menos um ducto biliar, um vaso linfático, uma vênula ramo da veia porta e uma arteríola ramo da artéria hepática. O interior dos lóbulos é preenchido por cordões de hepatócitos circundados por canalículos biliares e

sinusóides, que são vasos irregularmente dilatados compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas. A veia porta contém sangue proveniente do trato digestivo, pâncreas e baço. A artéria hepática contém sangue proveniente do tronco celíaco da aorta abdominal. O ducto, revestido por epitélio cúbico, transporta bile sintetizada pelos hepatócitos, que eventualmente desemboca no ducto hepático. Um ou mais vasos linfáticos transportam linfa, que eventualmente entra na circulação sanguínea. Os hepatócitos estão radialmente dispostos no lóbulo hepático, arranjados como os tijolos de uma parede. Células endoteliais estão separadas dos hepatócitos adjacentes por uma lâmina basal descontínua e um espaço subendotelial conhecido como espaço de Disse, que contém microvilos dos hepatócitos. Fluidos provenientes do sangue percolam rapidamente a parede endotelial e fazem um contato íntimo com a parede dos hepatócitos, o que permite uma troca fácil de macromoléculas entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos e vice-versa. Esta troca é fisiologicamente importante não apenas devido ao grande número de macromoléculas (por ex., lipoproteínas, albumina, fibrinogênio) secretadas dos hepatócitos para o sangue, mas também porque o fígado capta e cataboliza muitas moléculas grandes. Os sinusóides contêm, além das células endoteliais, macrófagos conhecidos como células de Kupffer. Essas células têm como funções metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com processos imunológicos e destruir bactérias que eventualmente penetrem no sangue portal a partir do intestino grosso. Os sinusóides desembocam na veia centrolobular, a qual está localizada no centro do lóbulo e é o ramo inicial da veia hepática (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; REECE, 2008).

O fígado apresenta múltiplas funções, sendo a produção de bile e ácidos biliares somente uma dentre tantas outras realizadas por esse órgão. A secreção biliar serve para a emulsão das gorduras no intestino, por meio dos pigmentos biliares, produtos finais da redução da hemoglobina (KONIG, 2004). É responsável também pela produção da maioria das proteínas plasmáticas circulantes do organismo, como albumina, lipoproteínas, glicoproteínas, protrombina e fibrinogênio, pelo armazenamento e conversão de várias vitaminas e de ferro, pela degradação de medicamentos e toxinas, além de estar envolvido em diversas vias metabólicas

importantes, como as vias metabólica da glicose, da qual participa armazenando glicose sob a forma de glicogênio (ROSS, 2008).

A maior parte do sistema macrofágico está no fígado, sendo representado por macrófagos fixos, as células de Kupffer. Essas são altamente fagocíticas, removendo materiais estranhos que entram no sangue a partir do estômago e do intestino. Elas também removem debris teciduais, tais como eritrócitos velhos e frágeis (REECE, 2008).

Assim como os demais órgãos o fígado pode ser acometido por afecções. Define-se como doença hepática qualquer distúrbio capaz de causar lesão de hepatócitos, colestase ou ambas. Dentre esses distúrbios incluem-se hipóxia, doenças metabólicas, intoxicações, inflamações, neoplasias, traumatismos mecânicos e obstrução de ducto biliar intra ou extra-hepática. A doença hepática pode resultar em insuficiência hepática, caracterizada pela incapacidade do fígado em remover do sangue as substâncias que comumente excreta e pela menor produção de substâncias que comumente produz. Nem sempre a doença hepática provoca insuficiência, uma vez que o fígado tem grande quantidade de reserva e deve ocorrer perda de 70 a 80% da massa hepática funcional para que se instale a insuficiência (THRALL, 2007).

As lesões hepáticas podem ser classificadas como primárias ou secundárias. Com excessão do fígado gorduroso em bovinos, que ocorre em animais no início da lactação, raramente as doenças primárias acometem os grandes animais, a não ser como resultado de intoxicações. Quanto à extensão, o distúrbio pode ser focal ou difuso, ocorrendo as insuficiências hepáticas mais frequentemente nas afecções difusas do que nas focais. As doenças difusas do fígado podem ser classificadas em hepatites e em hepatoses, de acordo com as alterações histológicas que ocorrem e na dependência agente etiológico responsável (RADOSTITS et al., 2002).

Entre as possíveis manifestações clínicas observadas nas doenças hepáticas encontram-se icterícia, encefalopatia hepática, edema, emaciação, diarreia, constipação, fotossensibilização, diátese hemorrágica e dor abdominal (RADOSTITS et al., 2002).

A icterícia é causada pelo aumento da concentração sanguínea de bilirrubinas. É mais evidente na pele despigmentada, nas membranas mucosas e na esclera. Sua presença não é específica de doença hepática, podendo ser consequência de hemólise ou jejum prolongado (icterícia pré-hepática), ou ainda de obstrução dos ductos biliares (icterícia pós-hepática). Aproximadamente 10% dos equinos saudáveis apresentam icterícia leve, resultado da digestão normal de pigmentos carotenóides. Quando a elevação de bilirrubina resulta de lesão hepática esta se desenvolve devido à impossibilidade de conjugação da bilirrubina pelo fígado ou impedimento da excreção da bilirrubina conjugada pelos ductos biliares intra ou extra-hepáticos sendo, nesse caso, mais pronunciada (RADOSTITS, 2002; BARTON, 2007; EADES, 2009).

A encefalopatia hepática é uma condição clínica neuropsicótica caracterizada por anormalidade do estado mental associada à insuficiência hepática severa. Ocorre devido à inabilidade ou ineficiência do fígado lesionado em metabolizar e detoxificar potenciais neurotoxinas, de origem endógena ou exógena, como a amônia, a qual, em condições normais, é metabolizada em uréia (FURR & REED, 2008).

O diagnóstico de doença hepática é realizado com base nos sinais clínicos, em testes laboratoriais e exames de imagem, além de exame histopatológico de fragmento do órgão colhido por meio de biópsia. A biópsia hepática é considerada um exame específico para a avaliação da integridade do tecido hepático e é indispensável para a precisão do diagnóstico e do prognóstico (BERGERO, 2008).

Entre os testes laboratoriais se incluem a determinação da atividade sérica de enzimas que indicam lesão de hepatócitos ou colestase e a mensuração da concentração sérica de substâncias que são normalmente produzidas ou removidas do sangue pelo fígado, como amônia e bilirrubina (RADOSTITS et al., 2002; THRALL, 2007).

Os testes para a detecção de lesão de hepatócitos incluem a determinação das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Sorbitol Desidrogenase (SDH) e Glutamato Desidrogenase (GLDH). A ALT é uma enzima de extravasamento que é encontrada, em pequenas concentrações, livre no citoplasma dos hepatócitos de equinos e ruminantes e, em concentrações

moderadas, nas células musculares. Não é útil para detectar a doença hepática nas espécies retromencionadas (SCHEFFER & GONZÁLEZ, 2006; THRALL, 2007).

A AST é uma enzima de extravasamento que se apresenta em grandes concentrações nos hepatócitos e células musculares, esqueléticas e cardíacas, de todas as espécies. Por não se tratar de uma enzima hepato-específica deve ser dosada juntamente com outra enzima músculo-específica, como a Creatina Quinase (CK). Assim, aumentos na concentração de AST acompanhados de concentração normal de CK indicam lesão de hepatócitos. Porém, como a meia-vida da CK é menor do que a meia-vida da AST, é possível que se tenha, após uma lesão muscular, concentração aumentada de AST com concentração normal de CK. A meia-vida da AST é de aproximadamente 50 horas e a da CK é de aproximadamente 2 horas em equinos (THRALL, 2007; EADES, 2009).

A SDH é uma enzima de extravasamento que se encontra livre no citoplasma, está presente em altas concentrações nos hepatócitos de cães, gatos, equinos e ruminantes. É uma enzima hepato-específica que revela lesão hepatocelular sendo, portanto, mais fidedigna para o diagnóstico de lesões hepáticas (DIVERS, 2005; THRALL, 2007). Apresenta, porém, os inconvenientes de não existirem testes comerciais facilmente disponíveis e de sua estabilidade no soro em temperatura ambiente ser de apenas 5 horas e no soro congelado de 48 horas, o que inviabiliza seu uso na rotina laboratorial. A GLDH também é uma enzima hepato-específica, porém sua determinação é difícil e não é muito sensível para a maioria das doenças hepáticas (THRALL, 2007; EADES, 2009).

Para a detecção de colestase utiliza-se a determinação da atividade sérica de enzimas cujo aumento da produção é induzido pela estase biliar, conhecidas como enzimas de indução, e os testes de função hepática. Essas enzimas são a Fosfatase Alcalina (ALP) e a Gama-Glutamiltransferase (GGT). A ALP é uma enzima de indução sintetizada tanto pelo fígado como pelos osteoblastos, epitélio intestinal e renal, e placenta. Os hepatócitos respondem pela maior parte da produção e em equinos as principais causas de elevação da atividade de ALP estão associadas à colestase e à produção de osteoblastos. Nos equinos e ruminantes a ampla faixa de normalidade dessa enzima contribui para a menor sensibilidade no diagnóstico de hepatopatia (THRALL, 2007; FERNANDEZ & KIDNEY, 2008). A GGT também é uma

enzima de indução, sintetizada por quase todos os tecidos, com maior produção no pâncreas e no rim. Está presente em pequenas concentrações nos hepatócitos e no epitélio dos ductos biliares. A maior parte da GGT sérica é oriunda do fígado e, de acordo com Durham et al. (2003a), nos caso de colestase se nota aumento em sua produção e liberação, com conseqüente elevação da atividade sérica. Nos equinos e ruminantes sua limitada faixa de normalidade a torna mais valiosa do que a ALP para o diagnóstico de colestase (THRALL, 2007).

Os testes de função hepática abrangem a mensuração da atividade sérica de substâncias que são normalmente removidas do sangue pelo fígado e, em seguida, metabolizadas e/ou excretadas pelo sistema biliar como, por exemplo, a bilirrubina, os ácidos biliares, o colesterol e a amônia, e a medição do teor sérico de constituintes sanguíneos sintetizados, em geral, pelo fígado, como a albumina, as globulinas, a ureia e os fatores de coagulação.

A bilirrubina é um subproduto do metabolismo da hemoglobina e, em menor grau, do metabolismo de outros compostos que contêm porfirina (mioglobina, citocromo P 450, peroxidase, catalase). As hemácias senescentes são destruídas em uma taxa constante, contudo, nas doenças hemolíticas, a porcentagem de destruição é maior. As hemácias que atingem o final de sua meia-vida são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, o que ocorre principalmente no fígado, baço e medula óssea. Essas hemácias fagocitadas são destruídas e a hemoglobina é metabolizada. A porção globina da molécula de hemoglobina é transformada em aminoácidos enquanto a porção heme origina ferro e protoporfirina. A protoporfirina é transformada em biliverdina e em seguida em bilirrubina lipossolúvel no plasma, essa bilirrubina é transportada ao fígado por uma proteína carreadora (albumina, globulina) e penetra no hepatócito onde é conjugada com grupos de açúcar transformando-se em hidrossolúvel. A bilirrubina não conjugada recebe o nome de bilirrubina indireta (BI) ou bilirrubina pré-hepática. A bilirrubina conjugada recebe o nome de bilirrubina direta (BD) ou bilirrubina pós-hepática (THRALL, 2007).

A hiperbilirrubinemia pode ser de origem pré-hepática, hepática ou pós-hepática. A primeira é chamada também de hemolítica e acontece quando a taxa de hemólise aumenta liberando bilirrubina além da capacidade de penetração no

hepatócito. Neste caso se observa aumento na concentração sérica de BI. Esse tipo de hiperbilirrubinemia também ocorre em casos de jejum prolongado, sendo caracterizada por importantes elevações de BI (maiores que 15mg/dL) enquanto a bilirrubina direta, as enzimas hepáticas (GGT, AST e SDH) e os ácidos biliares permanecem dentro dos valores de referência (EADES, 2009). A hiperbilirrubinemia hepática ocorre quando há menor absorção ou conjugação de bilirrubina pelos hepatócitos em razão do menor fluxo de sangue no fígado, da redução acentuada da quantidade de hepatócitos ou de distúrbios na conjugação de bilirrubina pelos hepatócitos, ocorrendo aumento nas concentrações séricas de BI e BD. A hiperbilirrubinemia pós-hepática é observada em casos de colestase quando ocorre aumento marcante na concentração sérica de BD. Nesses casos pode também ser observado aumento da atividade sérica da ALP e da GGT (THRALL, 2007).

A amônia é transformada no fígado em uréia e sua concentração sérica aumenta quando há disfunção hepática, podendo, em casos extremos, levar a quadros de encefalopatia hepática (THRALL, 2007).

Além dos exames bioquímicos, o hemograma e o proteinograma também são úteis na identificação de processos inflamatórios. Os estádios iniciais da reação inflamatória incluem várias alterações que são denominadas respostas de fase aguda (GRUYS et al., 1994). Modificações que ocorrem no sítio inflamatório favorecem a liberação de citocinas, resultando em respostas sistêmicas como febre, leucocitose e síntese de proteínas na fase aguda (HEINDRICH et al., 1990; TAKIGUCHI et al., 1990; GODSON et al., 1996). O fibrinogênio é a proteína plasmática mais frequentemente analisada, apesar de não ser a principal proteína na fase aguda dos animais. O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas sanguíneas (KANEKO et al., 1997). As técnicas de eletroforese mais utilizadas em medicina veterinária têm como matrizes fitas de acetato de celulose (FAGLIARI et al., 1983; EDINGER et al., 1992) ou filmes de agarose (KEAY & DOXEY, 1982; MATTHEWS, 1982), as quais apresentam valor limitado porque permitem o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas. A técnica de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações proteicas extremamente baixas e a

identificação de 20 a 30 proteínas, necessitando de micro-quantidade de amostra (LAEMMLI, 1970; GORDON, 1995; FAVERO et al., 2011).

A cavidade peritoneal é revestida por uma membrana serosa composta por duas camadas chamadas de peritônio. O peritônio atua como uma barreira semi-permeável bidirecional, para a difusão de água e solutos de baixo peso molecular, entre o sangue e o fluido peritoneal (FP). O FP normal promove lubrificação para a movimentação dos órgãos intra-cavitários, além de refletir o estado fisiopatológico das superfícies mesotelial, parietal e visceral do peritônio (SMITH, 2002).

A análise do FP pode auxiliar no diagnóstico de afecções da cavidade peritoneal como peritonite (química ou infecciosa), infarto ou perfuração da parede do trato gastrointestinal, ruptura de bexiga, extravasamento biliar, hemorragia intraperitoneal e neoplasias, além de ser apontada como o exame auxiliar de escolha para o estabelecimento de diagnóstico e prognóstico em distúrbios gastrointestinais dos equinos (TULLENERS, 1983; NEVES et al., 2000), fornecendo dados complementares importantes por meio do exame físico e bioquímico, classificação e contagem das células e pela detecção de bactérias no líquido peritoneal, informando o provável grau de comprometimento da parede intestinal (SPIER & SNYDER, 1992) e direcionando a conduta clínica (MESSER, 1995).

A avaliação do FP deve incluir suas características físicas, especialmente cor, aspecto, densidade específica e tempo de coagulação e, sua composição bioquímica, com principal atenção à quantidade de células, morfologia e tipo celular (RADOSTITS et al, 2002). Assim, o FP contém células mesoteliais, linfócitos, neutrófilos, eritrócitos e, ocasionalmente, monócitos e eosinófilos, que se alteram frente à ocorrência de lesões envolvendo órgãos da cavidade abdominal (SMITH, 2002).

A reação do peritônio, que se reflete no FP, varia de acordo com a evolução da lesão, podendo um único exame ser perigosamente enganoso na indicação da ocorrência de lesões abdominais. Em casos agudos, o FP se altera rapidamente demonstrando alterações em intervalos tão curtos quanto uma hora. Assim, a avaliação seriada do FP pode ser necessária. O FP é obtido por meio da paracentese abdominal, sendo esta uma técnica prática, segura e eficiente (Tulleners, 1983; White, 1990; Neves et al., 2000).

A biópsia hepática é importante por ser o meio de diagnóstico *antemortem* mais sensível e específico nos casos de hepatopatias em seres humanos e equinos (MODRANSKY, 1986; SPYCHER et al., 2001; DURHAM et al., 2003b). Há pouco conhecimento quanto às possíveis alterações hematimétricas e bioquímicas decorrentes do procedimento de biópsia hepática guiada por ultrassonografia em equinos. Em bovinos submetidos à técnica observou-se aumento significativo da atividade da enzima AST 24 horas após a realização da biópsia, entretanto a atividade sérica das enzimas GGT e ALP não sofreu aumento após 24 e 96 horas. A proteína total apresentou aumento significativo de 0,24 g/dL, 96 horas após o procedimento (AMORIM et al., 2003). Em trabalho realizado por Duarte et al. (2009a) em caprinos, observou-se leucocitose com neutrofilia e aumento do fibrinogênio plasmático 24 horas após a realização da biópsia hepática. Em equinos submetidos à técnica de biópsia hepática por laparoscopia, observou-se leucocitose e aumento do fibrinogênio plasmático 24 e 72 horas após o procedimento (SILVA et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental realizado no presente estudo está de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP – Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 009789/12).

4.1 Animais e manejo

Foram utilizados oito equinos adultos, machos ou fêmeas, entre 5 e 10 anos de idade, sem raça definida, pertencentes ao rebanho experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Antes de iniciar o período experimental os animais foram pesados e passaram por exame físico (TAYLOR & HILLYER, 1997). Foram utilizados somente equinos em boas condições sanitárias e nutricionais, e após desverminação¹ e controle de ectoparasitas². Os animais foram mantidos em piquetes com volumoso, constituído de feno de tifton, sal mineral e água *ad libitum* e receberam ração balanceada equivalente a 30% da exigência energética, em cochos individuais, duas vezes ao dia.

4.2 Grupos experimentais

Os equinos foram alocados aleatoriamente em dois grupos experimentais, cada grupo sendo composto por quatro animais. O modelo experimental utilizado foi o “crossing over”, assim os grupos experimentais foram invertidos após um período de descanso de seis meses resultando em dois grupos, cada qual com oito animais, denominados grupo biópsia (GB) e grupo controle (GC). Os cavalos (C) do GB foram submetidos à biópsia hepática, enquanto os do GC foram submetidos a todos os procedimentos realizados nos animais do GB, exceto à biópsia hepática.

¹ Equalan®. Merial Saúde Animal LTDA. São Paulo, SP.

² Butox® P CE 25 – Intervet Brasil, Akzo Nobel Ltda. São Paulo, SP.

4.3 Exame físico

Os animais passaram por exame físico imediatamente antes da realização da biópsia e, diariamente, durante sete dias após o procedimento. Os parâmetros frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), coloração de mucosas (CM), tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura (T°C), motilidade intestinal (MI) e hidratação foram avaliados.

4.4 Colheita de sangue, hemograma e análises bioquímicas

Exames hematológicos e bioquímicos dos animais foram realizados antes e no decorrer da experimentação. Para tanto se colheram amostras de sangue mediante venipunção jugular, após antissepsia local adequada, com o uso de agulha 30x10. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante³, para a realização das análises bioquímicas, e em tubos com anticoagulante (EDTA),⁴ para a realização do hemograma. As colheitas de sangue foram realizadas imediatamente antes da realização da biópsia hepática (M0) e 12 (M12), 24 (M24), 48 (M48), 72 (M72) horas e uma semana (M1S) após o procedimento. Imediatamente após a colheita o sangue contendo anticoagulante foi encaminhado ao laboratório para análise hematimétrica e o soro sanguíneo foi devidamente envasado e estocado à temperatura de congelação para posterior análise bioquímica.

As contagens globais de hemácias e leucócitos, bem como a concentração de hemoglobina, foram obtidas com o auxílio de um contador automático de células. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de May-Grunwald, Giemsa e Metanol. Posteriormente, as preparações citoscópicas foram analisadas à microscopia óptica de luz, utilizando microscópio com aumento de 1000 vezes (imersão). A fórmula leucocitária absoluta foi calculada a partir das contagens global e porcentagem de células leucocitárias, por regra de três direta. Todas as dosagens foram realizadas com o auxílio de kits comerciais, conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Foram dosadas as

³ Serum Tube, No Additive, Silicone-Coated Interior - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

⁴ Plastic Whole Blood tube with spray-coated K₂EDTA - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

concentrações séricas das enzimas AST, GGT e ALP, além das concentrações de bilirrubina total e direta e da albumina. A proteína total foi dosada por refratometria.

4.5 Colheita e análise do fluido peritoneal

Para a colheita do líquido peritoneal realizou-se tricotomia mediana ventral, de 10 cm x 15 cm, seguida de antissepsia local. Em seguida, com uma lâmina de bisturi nº 24, realizou-se uma pequena incisão da pele e da linha alba, no plano mediano, por onde se introduziu uma cânula mamária de comprimento variável, até alcançar a cavidade peritoneal, colhendo-se o líquido em frascos estéreis, com e sem EDTA. As colheitas de fluido peritoneal foram realizadas imediatamente antes da biópsia (M0) e 24 (M24), 72 (M72) horas e uma semana (M1S) após.

O fluido peritoneal foi analisado macroscopicamente, imediatamente após a colheita, quanto à cor, ao odor e ao aspecto. A contagem do número total de leucócitos foi realizada em contador automático de células e para a contagem diferencial foram feitos esfregaços corados pela técnica de May-Grunwald Giemsa para a quantificação de neutrófilos segmentados, linfócitos e macrófagos.

4.6 Biópsia hepática

As amostras de fígado foram colhidas, pela técnica de biópsia hepática percutânea, com agulha cortante tipo Tru-cut (14G x 11,4cm x 20mm). O procedimento foi realizado com os animais em posição quadrupedal, contidos em tronco de contenção, após jejum hídrico e alimentar de doze horas. Uma área de 20 cm de largura por 25 cm de comprimento foi delimitada sobre o 12° e o 14° espaços intercostais, do lado direito, na intersecção de uma linha estabelecida desde a tuberosidade coxal até o ponto médio entre o cotovelo e a ponta da escápula, conforme descrito por Barton & Morris (2000). Essa área foi submetida à tricotomia e antissepsia com álcool iodado. Os animais foram sedados utilizando-se 0,02 mg/kg de butorfanol por via intravenosa. Em seguida foi realizada uma anestesia local infiltrativa empregando-se 5,0 mL de cloridrato de lidocaína 2,0% sem vasoconstrictor. Utilizou-se então uma agulha 40 x 12 para realizar a incisão da pele. Ambos os grupos foram submetidos aos procedimentos descritos até aqui. Apenas

no GB, em seguida, introduziu-se a agulha cortante tipo Tru-cut (14G x 11,4cm x 20mm), perfurando os músculos intercostais e alcançando o fígado. O local exato para a introdução da agulha foi definido com base nos achados ultrassográficos, evitando-se assim a perfuração de alças intestinais. A agulha foi direcionada à posição do cotovelo oposto e com o auxílio da ultrassonografia determinou-se a profundidade necessária para a penetração da agulha no parênquima hepático (SILVA et al., 1996; MEDEIROS et al., 2002; NAVARRE & PUGH, 2005), conforme demonstrado nas figuras 1 e 2. Na sequência, foram colhidos três fragmentos de tecido com aproximadamente dois centímetros (figura 3), tamanho adequado para a avaliação histológica. Os fragmentos foram acondicionados em recipiente contendo solução de formol a 10%.

Foram realizados curativos diários das feridas de pele, para ambos os grupos, mediante limpeza com iodo-povidine aquoso e aplicação de pomada repelente ao redor até completa cicatrização, que ocorreu em cinco dias.



Figura 1. Imagem fotográfica demonstrando o procedimento de colheita de tecido hepático de equino hígido, por meio de biópsia percutânea guiada por ultrassom.

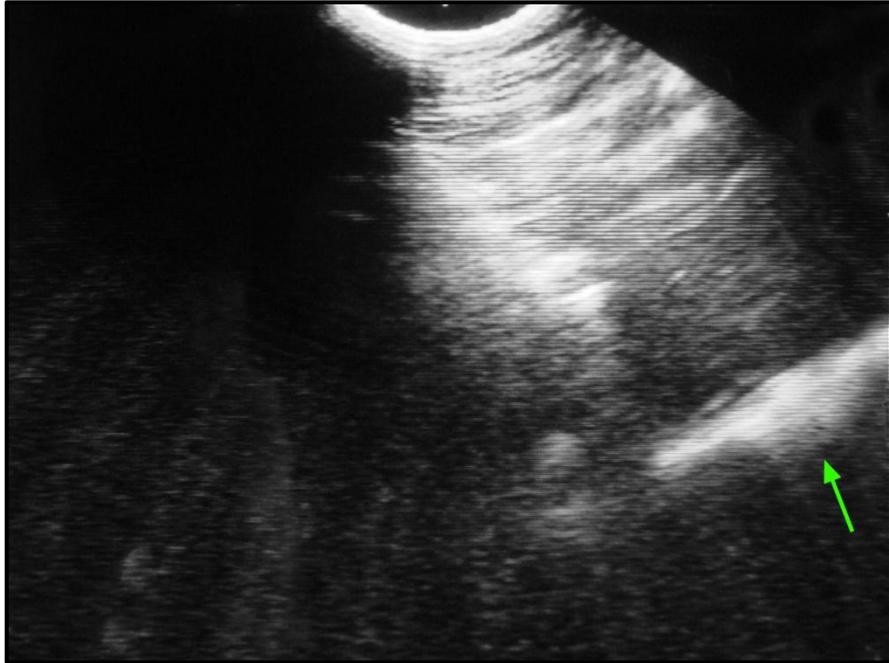


Figura 2. Imagem ultrassonográfica evidenciando agulha modelo Tru-cut (seta) inserida no parênquima hepático de equino hígado para colheita de tecido.

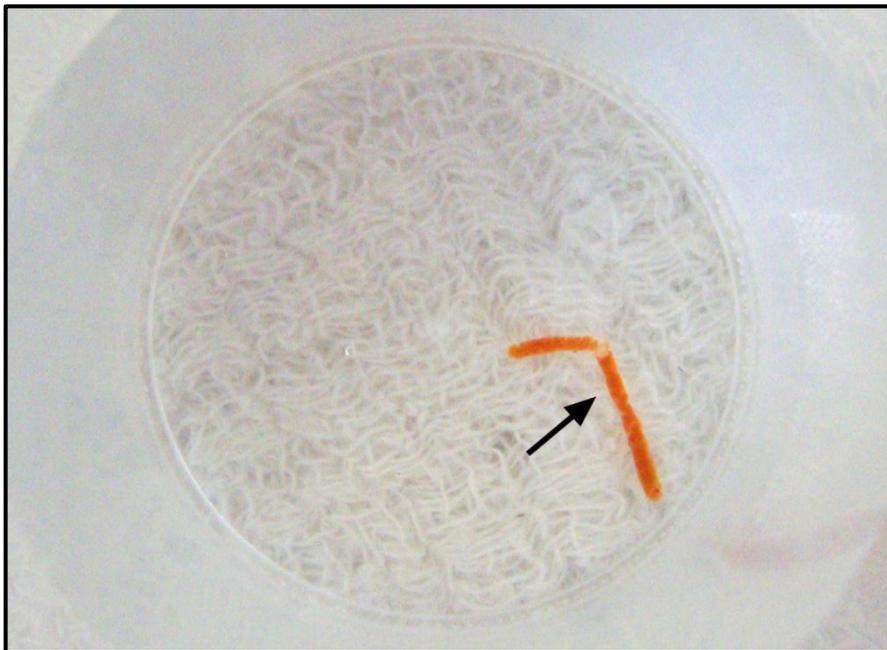


Figura 3. Imagem fotográfica demonstrando fragmento de tecido hepático de equino hígado colhido por meio de biópsia percutânea.

4.7 Análise estatística

Foram utilizados métodos descritivos para o cálculo da média e do erro padrão da média (EPM). As variáveis estudadas foram avaliadas quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk à 5% de significância, e foram consideradas normais. O delineamento utilizado foi de parcelas subdivididas, testando o fator tratamento nas parcelas e o fator momento nas subparcelas, com oito repetições (blocos-animal). Nessa situação, o quadrado médio da interação animal x tratamento foi usado como resíduo para testar o tratamento. Havendo diferença significativa entre médias, estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% utilizando o *Software SAS (Statistical Analysis System)*. Todos os resultados foram expressos em média±erro padrão da média.

5 RESULTADOS

Os procedimentos de biópsia hepática percutânea e as colheitas de sangue venoso foram realizadas conforme o proposto, não havendo nenhum tipo de intercorrência. Os fragmentos coletados apresentaram em torno de dois centímetros de comprimento, tamanho este adequado para a realização de exame histológico, após o qual se confirmou tratar de tecido hepático. As coletas de sangue também foram realizadas sem problemas em todos os animais e em todos os momentos. Em relação à coleta de líquido peritoneal, essa se mostrou improdutiva nos animais C6, C7 e C8 do GB, em todos os momentos, no animal C7 do GC no momento M1S e no animal C8 do GC em todos os momentos. Em relação ao local da punção abdominal todos os animais, tanto do GC quanto do GB, apresentaram edema discreto 24 horas após a realização da segunda paracentese, sendo que o animal C5 do GC e o animal C7 do GB apresentaram edema de grande dimensão após a segunda punção. No animal C8 do GC houve saída de epíplon, quando da retirada da cânula mamária, após a segunda e a terceira punções, e no C7 do GB a saída de epíplon ocorreu na primeira punção, a qual foi improdutiva. Observou-se também a diminuição gradativa da quantidade de fluido coletado, em todos os animais, a cada paracentese.

Os exames físicos realizados nos momentos M0, M12, M24, M48, M72 e M1S tiveram a finalidade de acompanhar as possíveis alterações clínicas em curso. Os parâmetros frequência cardíaca (FC), coloração de mucosas (CM), tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura (T) e motilidade intestinal (MI) não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. A coloração de mucosas, o TPC, a T, a motilidade intestinal e a hidratação permaneceram dentro da normalidade para a espécie, em ambos os grupos, ao longo de todo o período experimental. A frequência respiratória não apresentou diferença ($p>0,05$) entre os grupos nos diferentes momentos, porém variou ao longo do período experimental em ambos os grupos, encontrando-se acima dos valores fisiológicos para a espécie equina no animais do GC em todos os momentos, e nos animais do GB nos momentos M0, M48, M72 e M1S. A FC também se manteve acima dos valores fisiológicos para a espécie em todos os momentos, em ambos os grupos. Os

resultados de FC, FR, TPC e T nos diferentes grupos e momentos encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Média \pm EPM da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm), da frequência respiratória (FR) em movimentos respiratórios por minuto (mpm), do tempo de preenchimento capilar (TPC) em segundos (s) e da temperatura retal (T) em graus Celsius ($^{\circ}$ C) de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

Variáveis		M0	M12	M24	M48	M72	M1S
FC (bpm)	GC	42 \pm 2 ^{Aa}	37 \pm 2 ^{Aa}	37 \pm 4 ^{Aa}	35 \pm 4 ^{Aa}	36 \pm 3 ^{Aa}	36 \pm 3 ^{Aa}
	GB	45 \pm 3 ^{Aa}	43 \pm 3 ^{Aa}	41 \pm 3 ^{Aa}	42 \pm 3 ^{Aa}	45 \pm 2 ^{Aa}	42 \pm 3 ^{Aa}
FR (mpm)	GC	27 \pm 7 ^{Ab}	14 \pm 2 ^{Aa}	24 \pm 5 ^{Aab}	24 \pm 4 ^{Aab}	20 \pm 3 ^{Aab}	17 \pm 3 ^{Aab}
	GB	17 \pm 3 ^{Aab}	12 \pm 2 ^{Aa}	12 \pm 1 ^{Aa}	26 \pm 3 ^{Ab}	14 \pm 2 ^{Aa}	17 \pm 3 ^{Aab}
TPC (s)	GC	2 \pm 0 ^{Aa}	2 \pm 0,1 ^{Aa}	2 \pm 0,2 ^{Aa}	2 \pm 0,2 ^{Aa}	2 \pm 0,1 ^{Aa}	2 \pm 0,2 ^{Aa}
	GB	2 \pm 0,1 ^{Aa}	2 \pm 0 ^{Aa}	2 \pm 0 ^{Aa}	2 \pm 0,2 ^{Aa}	2 \pm 0,1 ^{Aa}	2 \pm 0 ^{Aa}
T ($^{\circ}$ C)	GC	37,3 \pm 0,2 ^{Aa}	37,2 \pm 0,2 ^{Aa}	37,0 \pm 0,1 ^{Aa}	37,1 \pm 0,2 ^{Aa}	37,3 \pm 0,1 ^{Aa}	37,1 \pm 0,2 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos.
Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos.

As variáveis hematimétricas, contagem global de hemácias (He) e porcentagem de hematócrito (Ht), assim como o número total de plaquetas não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os grupos nos diferentes momentos. A concentração de hemoglobina (Hb), no entanto, diferiu ($p < 0,05$) entre os grupos GC e GB apenas no M0. Tanto no grupo GC quanto no GB não houve diferença das variáveis He, Hb, Ht e plaquetas entre os momentos. Os valores de He, Hb, Ht e plaquetas nos diferentes grupos e momentos encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Média \pm EPM da contagem global de hemácias (He), concentração de hemoglobina (Hb), porcentagem de hematócrito (Ht) e contagem global de plaquetas de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

Variáveis		M0	M12	M24	M48	M72	M1S
He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	GC	7,65 \pm 0,43 ^{Aa}	7,68 \pm 0,30 ^{Aa}	7,50 \pm 0,37 ^{Aa}	7,24 \pm 0,41 ^{Aa}	7,39 \pm 0,47 ^{Aa}	7,47 \pm 0,46 ^{Aa}
	GB	8,23 \pm 0,58 ^{Aa}	7,86 \pm 0,56 ^{Aa}	7,40 \pm 0,68 ^{Aa}	7,58 \pm 0,42 ^{Aa}	7,52 \pm 0,55 ^{Aa}	7,98 \pm 0,60 ^{Aa}
Hb (g/dL)	GC	11,7 \pm 0,6 ^{Aa}	12,6 \pm 0,6 ^{Aa}	11,9 \pm 0,6 ^{Aa}	11,3 \pm 0,5 ^{Aa}	11,2 \pm 0,5 ^{Aa}	11,6 \pm 0,6 ^{Aa}
	GB	13,2 \pm 0,6 ^{Ba}	12,6 \pm 0,6 ^{Aa}	11,7 \pm 0,6 ^{Aa}	12,1 \pm 0,5 ^{Aa}	11,9 \pm 0,6 ^{Aa}	12,5 \pm 0,6 ^{Aa}
Ht (%)	GC	37,7 \pm 2,1 ^{Aa}	38,2 \pm 1,47 ^{Aa}	37,1 \pm 1,85 ^{Aa}	35,6 \pm 1,9 ^{Aa}	35,7 \pm 1,7 ^{Aa}	36,0 \pm 1,84 ^{Aa}
	GB	40,5 \pm 2,1 ^{Aa}	39,0 \pm 2,4 ^{Aa}	36,1 \pm 2,6 ^{Aa}	37,3 \pm 1,4 ^{Aa}	37,1 \pm 2,2 ^{Aa}	37,1 \pm 2,2 ^{Aa}
Plaqueta ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	GC	270 \pm 26 ^{Aa}	191 \pm 32 ^{Aa}	265 \pm 29 ^{Aa}	247 \pm 31 ^{Aa}	283 \pm 16 ^{Aa}	332 \pm 17 ^{Aa}
	GB	247 \pm 26 ^{Aa}	200 \pm 28 ^{Aa}	248 \pm 21 ^{Aa}	268 \pm 37 ^{Aa}	217 \pm 28 ^{Aa}	234 \pm 20 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos

Em relação ao leucograma, o número total de leucócitos não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos GC e GB nos diferentes momentos. Apenas no grupo GB observou-se aumento do número de leucócitos no M1S em relação ao M0 (figura 4A). O número total de leucócitos permaneceu dentro do intervalo normal para equinos ao longo de todo o período experimental. Quanto à contagem diferencial de células brancas observou-se diferença ($p < 0,05$) apenas em relação ao número de monócitos que, no GB, aumentou no M72 em relação ao M0 (figura 4B), permanecendo aumentado uma semana após a realização da biópsia (M1S), em relação ao momento basal (M0). As variáveis do leucograma encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Média \pm EPM da contagem total de leucócitos e do número de basófilos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

Variáveis		M0	M12	M24	M48	M72	M1S
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	GC	10,1 \pm 0,5 ^{Aa}	11,2 \pm 0,7 ^{Aa}	12,4 \pm 0,2 ^{Aa}	10,4 \pm 0,8 ^{Aa}	10,0 \pm 0,7 ^{Aa}	10,0 \pm 0,5 ^{Aa}
	GB	9,5 \pm 0,4 ^{Aa}	10,4 \pm 0,6 ^{Aab}	11,3 \pm 0,6 ^{Aab}	12,3 \pm 0,9 ^{Aab}	12,1 \pm 0,6 ^{Aab}	12,9 \pm 0,7 ^{Ab}
Basófilos (cél/s/ μL)	GC	24 \pm 16 ^{Aa}	75 \pm 31 ^{Aa}	52 \pm 20 ^{Aa}	39 \pm 39 ^{Aa}	15 \pm 15 ^{Aa}	26 \pm 17 ^{Aa}
	GB	21 \pm 17 ^{Aa}	55 \pm 21 ^{Aa}	0 \pm 0 ^{Aa}	42 \pm 20 ^{Aa}	16 \pm 16 ^{Aa}	29 \pm 19 ^{Aa}
Eosinófilos ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	GC	2,81 \pm 0,49 ^{Aa}	4,05 \pm 0,36 ^{Aa}	4,17 \pm 0,71 ^{Aa}	2,83 \pm 0,63 ^{Aa}	3,47 \pm 0,99 ^{Aa}	3,66 \pm 0,73 ^{Aa}
	GB	2,23 \pm 0,9 ^{Aa}	3,9 \pm 0,75 ^{Aa}	2,96 \pm 0,75 ^{Aa}	3,46 \pm 0,62 ^{Aa}	3,34 \pm 1,07 ^{Aa}	3,82 \pm 1,00 ^{Aa}
Bastonetes ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	GC	1,15 \pm 0,16 ^{Aa}	2,17 \pm 0,16 ^{Aa}	1,77 \pm 0,30 ^{Aa}	1,83 \pm 0,41 ^{Aa}	1,86 \pm 0,42 ^{Aa}	1,44 \pm 0,33 ^{Aa}
	GB	1,65 \pm 0,38 ^{Aa}	2,14 \pm 0,40 ^{Aa}	1,57 \pm 0,32 ^{Aa}	2,99 \pm 0,99 ^{Aa}	1,50 \pm 0,34 ^{Aa}	1,94 \pm 0,43 ^{Aa}
Segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	GC	6,30 \pm 0,33 ^{Aa}	7,80 \pm 0,53 ^{Aa}	8,33 \pm 0,15 ^{Aa}	7,19 \pm 0,68 ^{Aa}	6,59 \pm 0,50 ^{Aa}	6,71 \pm 0,40 ^{Aa}
	GB	6,57 \pm 0,80 ^{Aa}	7,11 \pm 0,40 ^{Aa}	16,36 \pm 0,81 ^{Aa}	8,28 \pm 0,79 ^{Aa}	8,16 \pm 0,94 ^{Aa}	9,51 \pm 0,76 ^{Aa}
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	GC	2,48 \pm 0,98 ^{Aa}	2,40 \pm 0,35 ^{Aa}	3,01 \pm 0,28 ^{Aa}	2,34 \pm 0,23 ^{Aa}	2,48 \pm 0,39 ^{Aa}	2,06 \pm 0,29 ^{Aa}
	GB	2,97 \pm 0,24 ^{Aa}	2,93 \pm 0,45 ^{Aa}	2,41 \pm 0,16 ^{Aa}	2,75 \pm 0,19 ^{Aa}	2,92 \pm 0,34 ^{Aa}	2,62 \pm 0,28 ^{Aa}
Monócitos ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	GC	3,21 \pm 0,47 ^{Aa}	3,45 \pm 0,46 ^{Aa}	3,96 \pm 0,40 ^{Aa}	3,24 \pm 0,41 ^{Aa}	3,92 \pm 0,52 ^{Aa}	3,62 \pm 0,55 ^{Aa}
	GB	2,86 \pm 0,65 ^{Aa}	2,95 \pm 0,36 ^{Aa}	3,61 \pm 0,61 ^{Aab}	5,06 \pm 0,69 ^{Aab}	5,59 \pm 0,54 ^{Ab}	5,43 \pm 0,72 ^{Ab}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos
Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos

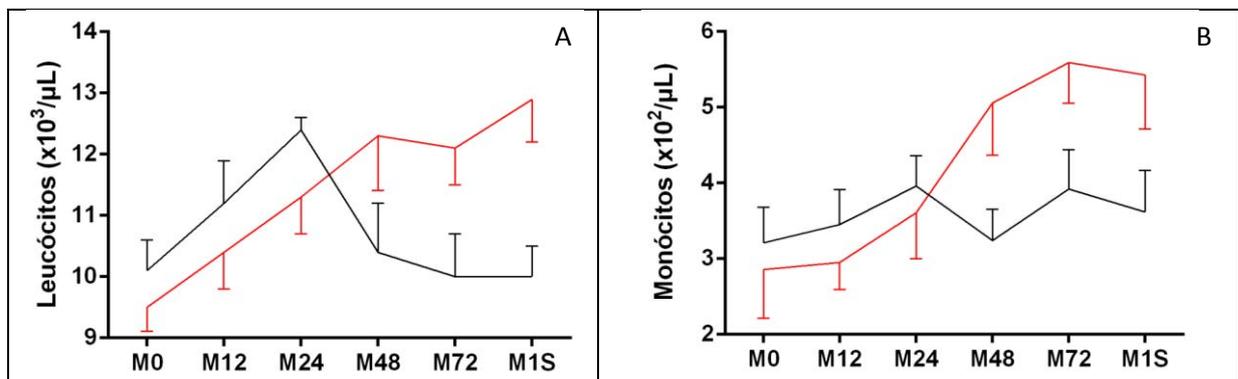


Figura 4. Variação dos valores médios \pm EPM da contagem global de leucócitos, em $10^3/\mu\text{L}$ (A); e de monócitos, em $10^2/\mu\text{L}$ (B) de equinos do grupo controle (GC – linha cinza) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB – linha vermelha). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

O fibrinogênio não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos GC e GB nos diferentes momentos. No GC observou-se um aumento da concentração no M48 e M72 em relação ao M0, além de uma diminuição no M1S. No GB observou-se um aumento da concentração no M48, em relação ao M0, seguida por uma diminuição no M1S (figura 5). Os valores de fibrinogênio em ambos os grupos, nos diferentes momentos, estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Média \pm EPM da concentração de fibrinogênio de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

Variável		M0	M12h	M24h	M48h	M72h	M1S
Fibrinogênio (mg/dl)	GC	225 \pm 41 ^{Aa}	275 \pm 36 ^{Aab}	200 \pm 27 ^{Aab}	300 \pm 50 ^{Ab}	187 \pm 23 ^{Ab}	100 \pm 50 ^{Aa}
	GB	175 \pm 25 ^{Aa}	262 \pm 32 ^{Aab}	225 \pm 53 ^{Aab}	287 \pm 67 ^{Ab}	212 \pm 23 ^{Aa}	150 \pm 27 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos
Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos

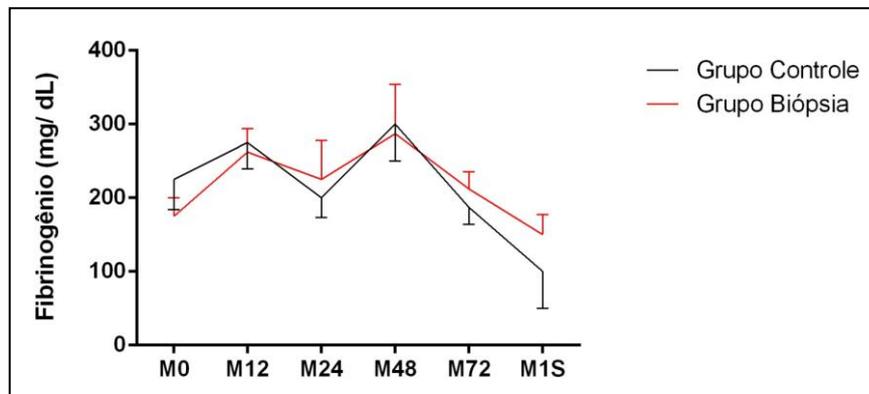


Figura 5. Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de fibrinogênio (mg/ dL) de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

A concentração de AST manteve-se dentro do intervalo de referência para a espécie equina durante todo o período experimental, em ambos os grupos, além de não se alterar ($p > 0,05$). A concentração de ALP também permaneceu dentro do intervalo normal para a espécie equina e não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos no diferentes momentos. No entanto, no GB, observou-se um aumento da concentração de ALP uma semana após a realização da biópsia, em relação ao momento basal ($p < 0,05$), conforme evidenciado na tabela 5 e na figura 6A. A concentração de GGT aumentou, no GB, uma semana após a realização da biópsia, em relação ao M12 (figura 6B). A concentração de BT permaneceu dentro do intervalo de referência para a espécie durante todos os momentos em ambos os grupos, e não variou ($p > 0,05$) entre os grupos, nos diferentes momentos. A concentração de BD aumentou no M72, no GB, em relação ao M48 (figura 7). A Pt e a Alb não diferiram entre os grupos GC e GB nos diferentes momentos. No GB observou-se diminuição da Pt no M24 em relação ao M12. Os valores médios, seguidos pelo desvio padrão da média das variáveis bioquímicas AST, ALP, GGT, BD, BT, Pt e Alb encontram-se descritos na tabela 5.

Tabela 5. Média \pm EPM da concentração de AST (UI/L), ALP (UI/L), GGT (UI/L), bilirrubinas direta (BD) e total (BT), em mg/dL, CK (UI/L), proteína total (Pt), em g/dL e albumina (Alb), em g/dL, de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

Variáveis		M0	M12	M24	M48	M72	M1S
AST (UI/L)	GC	233 \pm 17 ^{Aa}	290 \pm 24 ^{Aa}	207 \pm 30 ^{Aa}	238 \pm 14 ^{Aa}	249 \pm 9 ^{Aa}	256 \pm 20 ^{Aa}
	GB	228 \pm 20 ^{Aa}	257 \pm 13 ^{Aa}	201 \pm 26 ^{Aa}	279 \pm 18 ^{Aa}	289 \pm 20 ^{Aa}	270 \pm 30 ^{Aa}
ALP (UI/L)	GC	210 \pm 18 ^{Aa}	240 \pm 27 ^{Aa}	268 \pm 24 ^{Aa}	227 \pm 4 ^{Aa}	240 \pm 11 ^{Aa}	238 \pm 26 ^{Aa}
	GB	229 \pm 13 ^{Aa}	242 \pm 13 ^{Aab}	266 \pm 28 ^{Aab}	275 \pm 34 ^{Aab}	285 \pm 33 ^{Aab}	323 \pm 56 ^{Ab}
GGT (UI/L)	GC	23 \pm 1 ^{Aa}	23 \pm 0 ^{Aa}	25 \pm 2 ^{Aa}	23 \pm 2 ^{Aa}	21 \pm 1 ^{Aa}	26 \pm 3 ^{Aa}
	GB	23 \pm 1 ^{Aab}	22 \pm 0 ^{Aa}	25 \pm 1 ^{Aab}	24 \pm 2 ^{Aab}	24 \pm 1 ^{Aab}	30 \pm 3 ^{Ab}
BD (mg/dL)	GC	0,54 \pm 0,04 ^{Aa}	0,51 \pm 0,05 ^{Aa}	0,50 \pm 0,03 ^{Aa}	0,60 \pm 0,09 ^{Aa}	0,52 \pm 0,13 ^{Aa}	0,55 \pm 0,11 ^{Aa}
	GB	0,59 \pm 0,04 ^{Aab}	0,49 \pm 0,04 ^{Aab}	0,55 \pm 0,06 ^{Aab}	0,41 \pm 0,05 ^{Aa}	0,74 \pm 0,11 ^{Ab}	0,58 \pm 0,09 ^{Aab}
BT (mg/dL)	GC	1,39 \pm 0,14 ^{Aa}	1,46 \pm 0,15 ^{Aa}	1,34 \pm 0,13 ^{Aa}	1,46 \pm 0,19 ^{Aa}	1,30 \pm 0,25 ^{Aa}	1,74 \pm 0,42 ^{Aa}
	GB	1,39 \pm 0,09 ^{Aa}	1,19 \pm 0,08 ^{Aa}	1,37 \pm 0,11 ^{Aa}	0,95 \pm 0,08 ^{Aa}	1,41 \pm 0,23 ^{Aa}	1,40 \pm 0,17 ^{Aa}
CK (UI/L)	GC	343 \pm 60 ^{Aa}	328 \pm 77 ^{Aa}	583 \pm 46 ^{Aa}	425 \pm 116 ^{Aa}	319 \pm 89 ^{Aa}	317 \pm 52 ^{Aa}
	GB	193 \pm 25 ^{Aa}	223 \pm 16 ^{Aab}	395 \pm 79 ^{Aab}	322 \pm 96 ^{Aab}	593 \pm 240 ^{Ab}	285 \pm 95 ^{Aab}
Pt (g/dL)	GC	7,5 \pm 0,1 ^{Aa}	7,6 \pm 0,2 ^{Aa}	7,4 \pm 0,1 ^{Aa}	7,2 \pm 0,1 ^{Aa}	7,2 \pm 0,1 ^{Aa}	7,3 \pm 0,1 ^{Aa}
	GB	7,5 \pm 0,1 ^{Aab}	7,5 \pm 0,2 ^{Ab}	7,0 \pm 0,2 ^{Aa}	7,3 \pm 0,1 ^{Aab}	7,4 \pm 0,1 ^{Aab}	7,3 \pm 0,1 ^{Aab}
Alb (g/dL)	GC	2,2 \pm 0,1 ^{Aa}	2,3 \pm 0,1 ^{Aa}	2,2 \pm 0,1 ^{Aa}	2,5 \pm 0,2 ^{Aa}	2,3 \pm 0,2 ^{Aa}	2,3 \pm 0,2 ^{Aa}
	GB	2,0 \pm 0,1 ^{Aa}	2,2 \pm 0,2 ^{Aa}	2,1 \pm 0,1 ^{Aa}	2,6 \pm 0,2 ^{Aa}	2,5 \pm 0,1 ^{Aa}	2,3 \pm 0,1 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos
Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos

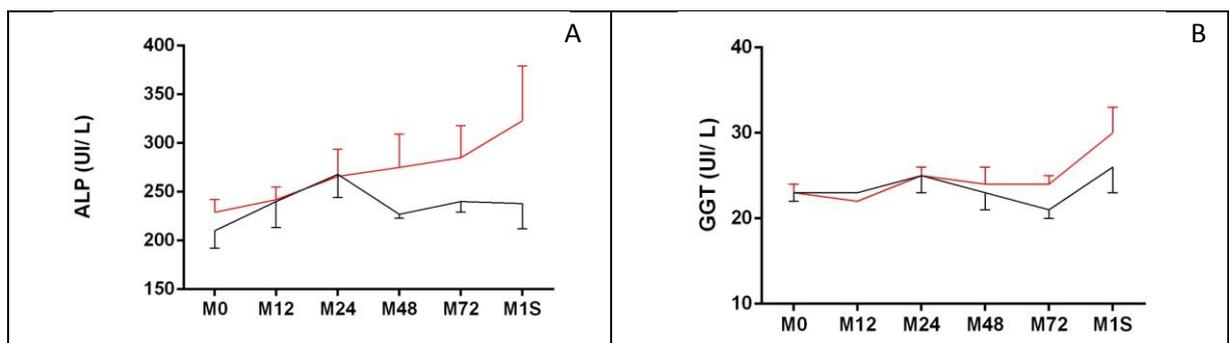


Figura 6. Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de ALP (UI/L) em (A), e GGT (UI/L) de equinos do grupo controle (GC – linha cinza) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB – linha vermelha). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

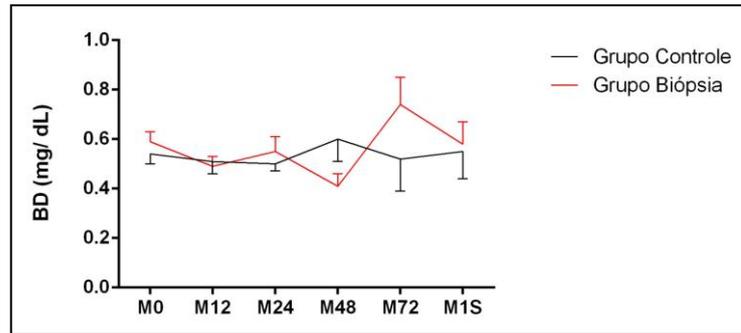


Figura 7. Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de bilirrubina direta (BD), em mg/dL, de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

Em relação ao fluido peritoneal os parâmetros macroscópicos odor e aspecto não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. O odor não se alterou, em ambos os grupos experimentais, durante todo o período experimental. O aspecto não apresentou diferenças entre o GC e o GB, porém, em ambos os grupos o fluido peritoneal, que era límpido no M0, tornou-se turvo nos momentos M24 e M72, voltando a ser límpido no M1S nos dois grupos. A coloração se diferenciou entre os grupos GC e GB também nos momentos M24 e M72 (figuras 8A e 8B). No M0 o fluido peritoneal era amarelo palha em ambos os grupos. Nos momentos M24 e M72 encontrava-se avermelhado nos animais do GB, diferenciando-se do GC, no qual a coloração do fluido permaneceu inalterada. No M1S a coloração do fluido peritoneal do GB voltou a ser amarelo palha, não havendo então diferença entre os grupos neste momento.

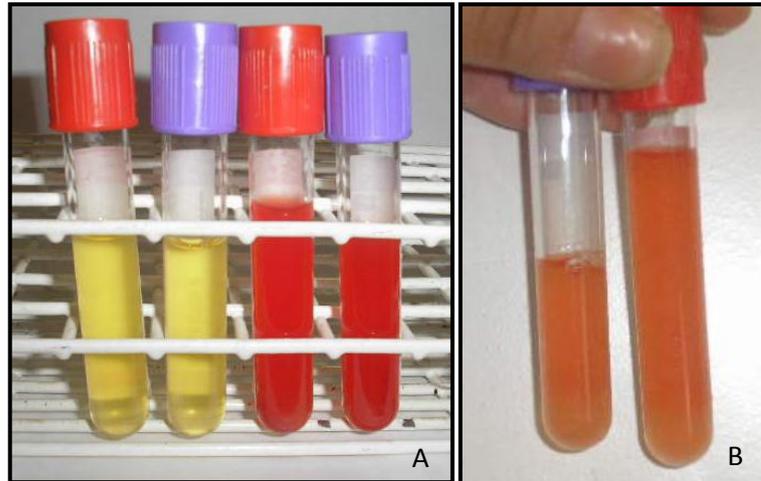


Figura 8. Imagem fotográfica demonstrando o fluido peritoneal de um animal do GC (esquerda) e um animal do GB (direita) no M24 (A) e imagem fotográfica do fluido peritoneal do mesmo animal do GB no M72 (B).

Em relação à celularidade do fluido peritoneal, o número total de células nucleadas não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos GC e GB e permaneceu dentro do intervalo considerado normal para equinos durante todo o período experimental (figura 9A). A contagem diferencial de células no fluido peritoneal também não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos nos momentos avaliados. Para ambos os grupos, em relação ao momento basal, o número de neutrófilos segmentados aumentou no M24, apresentou discreta diminuição no M72 e, uma semana após a realização do procedimento (M1S), apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação a M0, M24 e M72 (figura 9B). A contagem de linfócitos e macrófagos permaneceu a mesma, em ambos os grupos, nos diferentes momentos avaliados. Os valores de células nucleadas totais, neutrófilos segmentados, linfócitos e macrófagos do fluido peritoneal, em ambos os grupos, nos diversos momentos, encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Média \pm EPM da concentração de células nucleadas ($\times 10^2/\mu\text{L}$), da concentração de neutrófilos segmentados ($\times 10^2/\mu\text{L}$), da concentração de linfócitos ($\times 10^2/\mu\text{L}$) e da concentração de macrófagos ($\times 10^2/\mu\text{L}$) no líquido peritoneal de equinos do grupo controle (GC) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 12 (M12), 24 (M24) 48 (M48) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

Variáveis	Grupos	M0	M24	M72	M1S
Cél. nucl. ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	GC	17,6 \pm 3,28 ^{Aa}	23,00 \pm 5,69 ^{Aa}	17,3 \pm 3,38 ^{Aa}	10,50 \pm 1,50 ^{Aa}
	GB	22,50 \pm 2,90 ^{Aa}	33,00 \pm 3,42 ^{Aa}	22,75 \pm 3,64 ^{Aa}	14,75 \pm 2,17 ^{Aa}
Segmentados ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	GC	8,20 \pm 1,73 ^{Aa}	11,39 \pm 3,44 ^{Aa}	9,71 \pm 2,53 ^{Aa}	3,75 \pm 1,05 ^{Ab}
	GB	9,79 \pm 1,90 ^{Aa}	21,21 \pm 2,71 ^{Aa}	12,15 \pm 2,50 ^{Aa}	5,96 \pm 0,94 ^{Ab}
Linfócitos ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	GC	0,90 \pm 0,39 ^{Aa}	0,62 \pm 0,31 ^{Aa}	1,44 \pm 1,08 ^{Aa}	0,38 \pm 10,1 ^{Aa}
	GB	0,78 \pm 0,16 ^{Aa}	2,91 \pm 1,28 ^{Aa}	0,47 \pm 0,13 ^{Aa}	0,32 \pm 0,09 ^{Aa}
Macrófagos ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	GC	8,5 \pm 1,16 ^{Aa}	10,80 \pm 2,18 ^{Aa}	6,11 \pm 0,46 ^{Aa}	6,26 \pm 0,23 ^{Aa}
	GB	11,94 \pm 1,42 ^{Aa}	8,41 \pm 4,70 ^{Aa}	9,90 \pm 1,86 ^{Aa}	8,48 \pm 1,66 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos
Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos

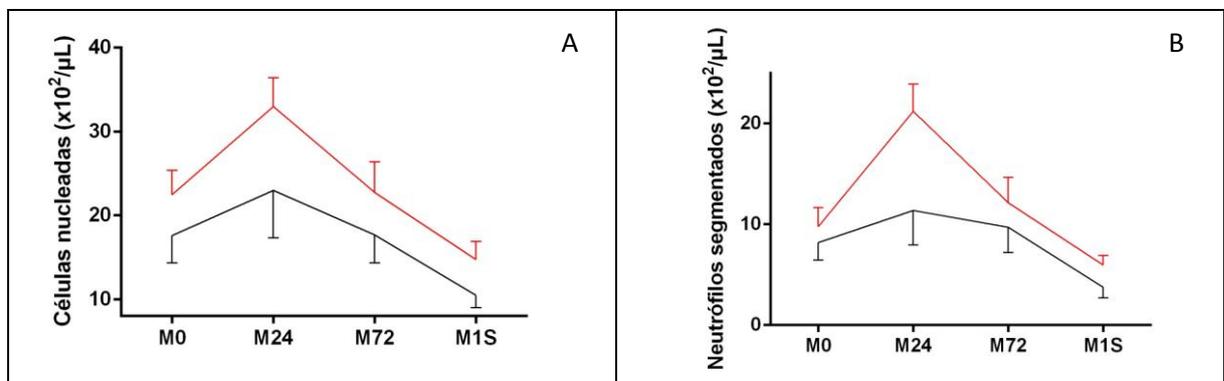


Figura 9. Variação dos valores médios \pm EPM da concentração de células nucleadas ($\times 10^2/\mu\text{L}$), em (A) e concentração de neutrófilos segmentados ($\times 10^2/\mu\text{L}$), em (B), de equinos do grupo controle (GC – linha cinza) e do grupo submetido à colheita de tecido hepático por meio de biópsia percutânea (GB – linha vermelha). As avaliações foram realizadas imediatamente antes (M0) e 24 (M24) e 72 (M72) horas após os procedimentos, assim como ao final de uma semana (M1S).

6 DISCUSSÃO

técnica de biópsia hepática percutânea em equinos e ruminantes foi descrita por Pearson & Graig (1980), que enfatizaram sua segurança, eficácia e importância como método diagnóstico, qualidades essas que se confirmaram no presente trabalho. Ao longo dos anos diversas técnicas de biópsia hepática vêm sendo estudadas, a fim de se estabelecer suas vantagens e desvantagens, e facilitar a escolha do clínico quando se apresenta a necessidade de utilizá-las. As técnicas se diferenciam pelo modo como se acessa a cavidade abdominal, que pode ser por via percutânea (GRÖHN & LINDBERG, 1982; MEDEIROS et al., 2002; AMORIM et al., 2003; NÉSPOLI et al., 2010; MELO et al., 2012; MOLGAARD et al., 2012; TADROS et al., 2013), por laparotomia ou por laparoscopia (SILVA et al., 2002; DUARTE et al., 2009a; DUARTE et al. 2009b; NÉSPOLI et al., 2010); pela maneira como se coleta o fragmento, que pode ser com agulha Tru-cut (DUARTE et al., 2009a; DUARTE et al. 2009b; NÉSPOLI et al., 2010; KASSEM et al., 2011; MELO et al., 2012; MOLGAARD et al., 2012), com agulha de Menghini (GRÖHN & LINDBERG, 1982; BRAGA et al., 1985; NÉSPOLI et al., 2010), com pinças (HIDIROGLOU & IVAN, 1993; NÉSPOLI et al., 2010) ou ainda com agulha composta de mandril e cânula (AMORIM et al., 2003). No caso da técnica percutânea, essa ainda pode ser às cegas (GRÖHN & LINDBERG, 1982; AMORIM et al., 2003; MOLGAARD et al., 2012) ou guiada por ultrassom (MEDEIROS et al., 2002; MELO et al., 2012).

No presente estudo a biópsia percutânea se mostrou segura e eficiente, estando de acordo com o observado por Amorim et al. (2003) em estudo realizado com bovinos, com Novais et al. (2009) com ovinos e com Tostes & Bandarra (2002) com cães. Em 2002 Silva et al. avaliaram a técnica de biópsia hepática em equino por laparoscopia e concluíram que também se tratava de uma técnica segura, porém com as desvantagens do alto custo do equipamento e necessidade de sedação, corroborando com Jones et al. (1985).

Neste modelo experimental a biópsia foi realizada utilizando-se agulha Tru-cut, assim como em experimento realizado por Duarte et al. (2009a) com caprinos. Os fragmentos foram obtidos de maneira fácil e rápida, e se mostraram adequados para o exame histológico, o qual confirmou tratar-se de tecido hepático, corroborando com o que foi observado por Néspoli et al. (2010). De acordo com

Buckley et al. (1986), Tostes & Bandarra (2002) e Néspoli et al. (2010) a colheita de material utilizando-se o sistema de guilhotina, como no caso da colheita com agulha Tru-cut, é mais eficiente do que o método aspirativo utilizando-se agulha de Menghini, estando associado a melhores taxas de recuperação de amostras

Os animais foram submetidos a jejum hídrico e alimentar de 12 horas, período inferior ao do jejum realizado no experimento de Melo et al. (2012). No presente estudo optou-se por um período menor de jejum para evitar alterações de variáveis bioquímicas séricas, como a BT e a BI, as quais têm suas concentrações aumentadas em casos de jejum prolongado (RADOSTITS, 2002; BARTON, 2007; EADES, 2009). Esse período de jejum se mostrou suficiente no que tange o protocolo anestésico utilizado, porém não foi suficiente para promover o esvaziamento de todo o trato gastrointestinal, causando certa dificuldade durante as biópsias uma vez que foi necessário desviar de alças intestinais repletas de alimentos. O protocolo anestésico, baseado na utilização de butorfanol, opióide agonista-antagonista sintético derivado da morfina, por via intravenosa e anestesia local infiltrativa com cloridrato de lidocaína, mostrou-se seguro e eficaz, uma vez que o butorfanol promove analgesia e sedação e o cloridrato de lidocaína promove anestesia local (GEISER, 1990).

Os parâmetros frequência cardíaca (FC), coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura (T°C), motilidade intestinal e hidratação não apresentaram diferença entre os grupos experimentais, evidenciando que, apesar de se tratar de uma técnica invasiva, a biópsia não foi capaz de causar alterações inflamatórias sistêmicas, as quais seriam identificadas por taquicardia, taquipnéia, mucosas congestas, TPC aumentado e febre, podendo culminar com diminuição da resistência periférica e consequente hipotensão, levando à diminuição do fluxo sanguíneo e aporte de oxigênio aos tecidos. A coloração de mucosas, o TPC a T°C, a motilidade intestinal e a hidratação permaneceram dentro da normalidade para a espécie, em ambos os grupos, ao longo de todo o período experimental.

A frequência respiratória variou durante os diferentes momentos, encontrando-se acima dos valores fisiológicos para a espécie equina durante todo o período experimental, em ambos os grupos. A FC também se manteve acima dos

valores fisiológicos para a espécie em todos os momentos, em ambos os grupos. O stress, causado pela contensão e manipulação diárias, pode ser incriminado como a causa da taquicardia e da taquipnéia, uma vez que determina a liberação, pela medula adrenal, de grande quantidade de catecolaminas no sangue. Além do aumento das frequências cardíaca e respiratória, as catecolaminas também são responsáveis pela liberação de glicose pelo fígado e pelo aumento de linfócitos circulantes (BONDAN & ORSINI, 2006; CARRAMENHA & CARREGARO, 2012).

Apesar de apenas ter sido instituída avaliação clínica para a mensuração da dor durante e após a realização das biópsias sugere-se que os animais não apresentaram dor em grau considerável, uma vez que não apresentaram sinais de desconforto, tais como olhar para o flanco, permanecer em decúbito, cavar, tanto durante quanto após a realização do procedimento, além de não haverem diminuído a ingestão de alimentos nos dias subsequentes. Em humanos a dor após a realização de biópsias hepáticas está bem documentada (Janes & Lindor, 1993; Eisenberg et al., 2003), assim como em bovinos (Molgaard et al., 2012). O procedimento de biópsia hepática envolve a perfuração de pele, músculos, peritônio e víscera, diferentemente de outros tipos de biópsias comumente realizadas, as quais envolvem apenas a perfuração da pele e/ou músculos (Carn, 1995; Malau-Aduli et al., 1998), o que pode presupor um maior desconforto advindo do procedimento.

A manutenção dos valores normais de He, Hb, Ht e contagem global de plaquetas nos dias subsequentes ao procedimento demonstra que a biópsia hepática não causa hemorragia em grau suficiente para alterar as variáveis hematimétricas, assim como observado por Amorim et al. (2003) e Duarte et al. (2009a).

No presente trabalho a avaliação do leucograma não evidenciou alterações, corroborando com outros estudos semelhantes (HARVEY et al., 1984; AMORIM et al., 2003). Apenas no GB observou-se aumento do número de leucócitos no M1S em relação ao M0, caracterizado por aumento do número de monócitos; esse aumento, porém, não caracterizou leucocitose, com os valores permanecendo dentro do intervalo de referência para a espécie equina. Estudo realizado por Amorim et al. (2003) com bovinos também não evidenciou leucocitose, porém revelou diminuição

dos neutrófilos 96 horas após a realização da biópsia, diferindo do observado no presente estudo, no qual não se observou diminuição de neutrófilos, em nenhum momento, em relação ao M0. Silva et al. (2002) observou um discreto aumento no número total de leucócitos ao realizar biópsia hepática em equinos por laparoscopia, sugerindo que essa técnica causa uma inflamação de maior magnitude, quando comparada à biópsia percutânea com agulha Tru-cut.

A resposta leucocitária de ambos os grupos pode ser dividida em duas fases distintas. Em uma primeira fase, correspondente às primeiras 24 horas após a realização dos procedimentos, observou-se aumento do número de leucócitos, embora esse não fosse significativo. Esse aumento pode ser atribuído ao stress, uma vez que ocorreu em ambos os grupos. Em uma segunda fase, a qual se inicia após as primeiras 24 horas, essa tendência ao aumento deixou de existir no GC, enquanto no GB permaneceu até o M1S, quando de fato o número de leucócitos aumentou, em relação ao M0. Uma vez que esse aumento de leucócitos só foi observado no GB, pode ser atribuído à resposta inflamatória induzida pela biópsia hepática. As células responsáveis pelo aumento no número total de leucócitos foram monócitos, corroborando com o observado por Amorim et al. (2003). Os monócitos são células que migram para os tecidos, onde originam os macrófagos, os quais são responsáveis, entre outras funções, pela ação fagocítica, regulação da inflamação e reparo tecidual (THRALL, 2007).

O fibrinogênio aumentou em ambos os grupos 48 horas após a realização dos procedimentos, diminuindo para valores abaixo dos basais após uma semana, diferindo do demonstrado por Murata et al. (2004), segundo o qual o fibrinogênio é uma proteína de fase aguda que apresenta pico entre sete e dez dias após o estímulo inflamatório, podendo permanecer elevada por semanas. Esta observação difere do encontrado no presente estudo, no qual a maior concentração de fibrinogênio ocorreu 48 horas após o estímulo, provavelmente devido à baixa intensidade do estímulo. Difere também do observado por Silva et al. (2002) e por Duarte et al. (2009a) que encontraram aumento na concentração de fibrinogênio 24 horas após a realização da biópsia hepática.

Em relação às variáveis bioquímicas a atividade sérica da AST não aumentou, estando de acordo com o relatado por Silva et al. (2002) e por Duarte et

al. (2009). Resultado diferente desse foi reportado por Amorim et al. (2003) e Néspoli et al. (2010) que observaram aumento da concentração sérica de AST em bovinos e ovinos, respectivamente. Por ser uma enzima de extravasamento presente em grandes quantidades nos hepatócitos, a AST tem sua atividade sérica aumentada diante de injúrias do parênquima hepático, quando há destruição de hepatócitos (AMORIM et al., 2003; THRALL, 2007). Uma vez que no presente estudo não se observaram aumentos de AST pode-se inferir que a lesão no fígado causada pela biópsia foi de pequena extensão ou pontual.

A atividade sérica das enzimas ALP e GGT aumentou uma semana após a biópsia, diferindo do observado em outros estudos semelhantes, tanto com equinos quanto com ruminantes (SILVA et al., 2002; AMORIM et al., 2003; DUARTE et al., 2009a; NÉSPOLI et al., 2010). O aumento da produção dessas enzimas é induzido pela estase biliar e, portanto, a dosagem de ALP e GGT é realizada a fim de se detectar colestase (THRALL, 2007). A concentração de BD também aumentou após a biópsia e esse aumento, associado ao aumento da ALP e da GGT sugere a ocorrência de colestase, a qual pode ter sido induzida pela reação inflamatória ocasionada, a qual causou edema do parênquima hepático com consequente diminuição da luz dos ductos biliares intra-hepáticos, resultando em estase biliar. Essa colestase, no entanto, foi discreta, uma vez que as concentrações de ALP e GGT se mantiveram dentro do intervalo considerado normal para equinos e a concentração de BD atingiu valores pouco acima dos considerados normais. Além do mais não foram observados sinais clínicos condizentes com colestase, como icterícia e dor abdominal.

No presente estudo a técnica de paracentese abdominal para obtenção de FP demonstrou eficiência e segurança, mesmo tendo sido realizada em série, reforçando a praticidade e confiabilidade descritas por White (1990) e Tulleners (1983).

No momento que antecedeu a biópsia hepática (M0) o FP de ambos os grupos encontrava-se amarelo palha, com aspecto límpido e ausência de depósitos de fibrina, demonstrando a integridade do endotélio vascular e do peritônio, de acordo com Swanwick & Wilkinson (1976), que afirmaram que o tipo, a quantidade de células e a concentração de proteínas presentes influenciam na constituição do

FP, diferenciando o normal daquele presente em processos inflamatórios ou de peritonite. A diferença na coloração do FP do GB 24 e 72 horas após a realização da biópsia se deve ao sangramento do parênquima hepático causado pela biópsia.

O aspecto turvo, observado no FP de ambos os grupos 24 e 72 horas após a realização dos procedimentos é decorrente possivelmente do aumento do número de células nucleadas, uma vez que essas células migraram do sangue para o FP devido à inflamação local causada pela paracentese abdominal. Após uma semana houve diminuição dessas células nucleadas, devido ao consumo das mesmas, o que fez com que o FP voltasse a apresentar o aspecto límpido observado no momento que antecedeu os procedimentos, em ambos os grupos.

A composição celular do FP no momento basal não diferiu dos valores reportados para equinos sãos (Bach & Ricketts, 1974; McGrath, 1975; Swanwick & Wilkinson, 1976; Nelson, 1979; Brownlow et al., 1981), caracterizada por número maior de neutrófilos e de células mononucleares, raros eosinófilos e um pequeno número de linfócitos. A contagem de leucócitos totais normal do FP de equinos deve apresentar-se entre 500/ μ l e 5.000/ μ l (RADOSTITS et al., 2002; SLOVIS, 2009; SMITH, 2002; WHITE, 2008), assim como observado no presente estudo em todos os momentos avaliados, para ambos os grupos.

O aumento do número de neutrófilos segmentados 24 horas após a realização dos procedimentos em ambos os grupos se deve ao fato dessas células serem o principal tipo de células presente nos processos inflamatórios agudos, atuando rápida e efetivamente na defesa celular primária contra microorganismos (BROWNLOW, 1983) por meio de seus movimentos amebóides rápidos, de sua intensa atividade fagocitária e do conteúdo enzimático presente nas suas granulações lisossômicas, o qual contém, entre outras, proteínas catiônicas que possuem efeito quimiotático sobre os monócitos e inibem o deslocamento dos neutrófilos e eosinófilos (PARODI, 1997). Segundo Ryan & Majno (1977) o acúmulo dos neutrófilos pode ser observado 4h após o estímulo, persistindo de acordo com o tipo e a intensidade deste estímulo.

Assim, sugere-se que esse aumento de neutrófilos no FP se deve à inflamação local da parede abdominal causada pela paracentese. Este procedimento, realizado em série, visando avaliar alterações na cavidade abdominal

causadas pela biópsia hepática, pode ter sido o precursor do aumento do número de neutrófilos segmentados em um primeiro momento (M24), uma vez que estes migraram do sangue para o líquido peritoneal. Após uma semana o número de neutrófilos diminuiu em consequência do consumo progressivo destas células e, essa rápida diminuição sugere baixa intensidade do estímulo causador da inflamação. Caso o estímulo fosse intenso, a contagem de neutrófilos segmentados no FP permaneceria elevada, visto que a função primordial dos mesmos é a defesa celular primária (BROWNLOW, 1983).

A ausência de diferenças na celularidade do FP entre os grupos indica que, apesar de invasiva, a biópsia Tru-cut hepática não promove danos teciduais suficientes para desencadear reação inflamatória difusa da cavidade abdominal, a qual seria identificada por alterações na contagem total e diferencial de leucócitos no fluido peritoneal dos animais biopsados em relação aos animais do GC.

7 CONCLUSÃO

Apesar de invasiva, a técnica de biópsia hepática com agulha Tru-cut guiada por ultrassom não promove danos teciduais suficientes para desencadear reação inflamatória sistêmica, a qual seria identificada por alterações no exame físico, no hemograma e nas características macro e microscópicas do fluido peritoneal.

Também se trata de uma técnica fácil, rápida e economicamente viável, além de eficaz, visto que todos os fragmentos obtidos foram adequados para o exame histológico.

Sendo assim, conclui-se que quando realizada de maneira adequada, essa técnica é segura e eficiente, sendo adequada e recomendada para o diagnóstico de enfermidades hepáticas em equinos na rotina hospitalar.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, R.M.; BORGES, A.S.; KUCHEMUCK, M.R.G.; TAKAIRA, R.K.; ALENCAR, N.X. Bioquímica sérica e hemograma de bovinos antes e após a técnica de biópsia hepática. **Ciência Rural**, v.33, p.519-523, 2003.
- BACH, L.G., RICKETTS, S.W. Paracentesis as an aid to the diagnosis of abdominal disease in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.6, p.116-121, 1974.
- BARR, F. Percutaneous biopsy of abdominal organs under ultrasound guidance. **J. Small Animal Practice**, v.36, p.105-113, 1995.
- BARTON, M.H.; MORRIS, D.D. Doenças do fígado In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna equina**. R. Janeiro: Koogan, cap.13. 2000. p.608-634.
- BARTON, M.H. Liver disease in the horse: clinical signs and diagnostic aids. **DVM Newsmagazine**, 2007.
- BONDAN, E.F.; ORSINI, H. Fisiopatologia do estresse em animais selvagens em cativeiro e suas complicações no comportamento e bem-estar animal. **Revista de Ciências do Instituto da Saúde**, v.24, n.1, p.07-13, 2006.
- BRAGA, M.M.; CASTILHOS, L.M.L.; SANTOS, M.N. Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. **Ciência Rural**, v.15, n.1, p.79-88, 1985.
- BROWNLOW, M.A., HUTCHINS, D. R., JOHNSTON, K. G. Reference values for equine peritoneal fluid. **Equine Veterinary Journal**, v.13, p.127-130, 1981.
- BROWNLOW, M.A. Polymorphonuclear neutrophil leucocytes of peritoneal fluid. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.22-24, 1983.
- BUNCH, S.E.; POLAK, D.M.; Hornbuckle, W.E. A modified laparoscopic approach for liver biopsy in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.187, p.1032-1035, 1985.
- CARN, V.M. An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples. **Journal of Virology Methods**, v.51, p.95-102, 1995.

CARRAMENHA, C.P.; CARREGARO, A.B. Estresse e morte súbita em medicina veterinária. **ARS Veterinária**, v.28, n.2, p.90-99, 2012.

COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; PILATI, C. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.31-38, 2000.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010. p.545-562.

DUARTE A.L.L.; CATTELAN, J.W.; ARAÚJO, M.G.; CATTELAN, R.J.G.; MALHEIROS, E.B.; VICENTE, W.R.R. Hemograma e bioquímica sérica de caprinos submetidos à biópsia hepática com agulha Tru-cut guiada por videolaparoscopia. **Ars Veterinária**, v.25, n.2, p.47-53, 2009a.

DUARTE, A.L.L.; CATTELAN, J.W.; BEZERRA, M.B.; VICENTE, W.R.R.; CORDEIRO, M.F. Biópsia hepática com agulha Tru-cut guiada por videolaparoscopia em caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.12-19, 2009b.

DURHAM, A.E.; NEWTON, J.R.; SMITH, K.C.; HILLYER, M.H.; HILLYER, L.L.; SMITH, M.R.W.; MARR, C.M. Retrospective analysis of historical, clinical, ultrasonographic, serum biochemical and haematological data in prognostic evaluation of equine liver disease. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.6, p.542-547, 2003a.

DURHAM, A.E.; SMITH, K.C.; NEWTON, J.R.; HILLYER, L.L.; SMITH, M.R.W.; MARR, C.M. Development and application of a scoring system for prognostic evaluation of equine liver biopsies. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.534-540, 2003b.

EADES, S. Cases of equine hepatic disease (Proceedings). **CVC in Baltimore proceedings**, 2009.

EAST, L.M.; SAVAGE, C.J. Abdominal neoplasia (excluding urogenital tract). **Veterinary Clinical North America: Equine Practice**, v.14, p.475-493, 1998.

EDINGER, V.H.; MILLER, I.; STANEK, C. Electrophoretic serum protein patterns in laminitic horses. **Dtsch Tierarztl Wsch**, v.99, p.426-430, 1992.

EISENBERG, E.; KONOPNIKI, M.; VEITSMAN, E.; KRAMSKAY, R.; GAITINI, D.; BARUCH, Y. Prevalence and characteristics of pain induced by percutaneous liver biopsy. **Anesthesia and Analgesia**, v.96, p.1392-1396, 2003.

FAGLIARI, J.J.; FERREIRA NETO, J.M.; LUCAS, A. Proteinograma total e fracionamento eletroforético do soro de bezerros Guzerá passivamente imunizados contra paratifo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, p.317-332, 1983.

FAVERO, D.H.M.F.; DIAS, D.P.M.; FERINGER-JUNIOR, W.H.; BERNARDI, N.S.; LACERDA-NETO, J.C. Proteínas séricas de potros da raça Puro Sangue Árabe recém-desmamados ou com mais de trinta dias de desmame. **Pesquisa veterinária Brasileira**, v.31, p.89-93, 2011.

FELDMAN, B., ZINKL, J., JAIN, N. **Schalm' veterinary hematology**. 5ed. Philadelphia: Lippcott Williams &Wilkins, p.1344, 2000.

GEISER, D.R. Chemical restraint and analgesia in the horse. **Veterinray Clinics of North America: Equine Practice**, v.6, n.3, p.495-512, 1990.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1986. p.460-463.

GODSON, D.L.; CAMPOS, M.; ATTAHPOKU, S.K. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary immunology**, v.51, p.277-292, 1996.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIIOUS, E. Reprodutibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.35-39, 1971.

GORDON, A.H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. New York: Elsevier. 1995. 213 p.

GRÖHN, Y. & LINDBERG, L.A. Methodological aspects of the microscopy of bovine liver biopsies. **Journal of Comparative Pathology**, v.92, p.567-578, 1982.

GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSSAINT, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, v.64, p.1009-1018, 1994.

HARVEY, R.B.; LOVERING, S.L.; BAILEY, E.M.; NORMAN, J.O. The influence of multiple liver biopsies on hematologic and serum biochemical values of sheep. **Cornell Veterinary**, v.74, p.322-330, 1984.

HEINDRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemistry Journal**, v.265, p.62-636, 1990.

HIDIROGLOU, M.; IVAN, M. Liver biopsy in sheep. **Veterinary Research**, v.24, p.260-265, 1993.

HURCOMBE, S. Equine hepatic encephalopathy. *In: Equine Neurology*. 1 ed. Iowa: Blackwell. 2008. p.257-258.

JANES, C.H.; LINDOR, K.D. Outcome of patients hospitalized for complications after outpatient liver biopsy. **Annual Internal Medicine**, v.118, p.96-98, 1993.

JONES, B.D., HITT, M., HURST, T. Hepatic biopsy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.15, n.1, p.39-65, 1985.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p.322-337.

KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 ed. San Diego: Academic. 1997. 932 p.

KASSEM, M.M.; EL-GENDY, S.A.A.; ABDEL-WAHED, R.E.; EL-KAMMAR, M. Laparoscopic anatomy of caprine abdomen and laparoscopic liver biopsy. **Research in Veterinary Science**, v.90, p.9-15, 2011.

KEAY, G.; DOXEY, D.L. Species characteristics of serum proteins demonstrated after agarose gel electrophoresis. **Veterinary Research Communications**, v.5, p.263-270, 1982.

KONIG, H. E. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed. 2004. p.69-79.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

MALAU-ADULI, A.E.O.; SIEBERT, E.B.; BOTTEMA, C.D.K.; PITCHFORD, W.S. Breed comparison of the fatty acid composition of muscle phospholipids in Jersey and Limousin cattle. **Journal of Animal Science**, n.76, p.766-773, 1998.

MATTHEWS, A.G. Serum protein alectrophoresis in horses and ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.14, p.322-324, 1982.

MCGRATH, J.P. Exfoliative cytology of equine peritoneal fluid. An adjunct to haematological examination. **Process 1st Int. Symp. Equine Haem.**, p.408-416, 1975.

MEDEIROS, M.B.A.; SOUZA, F.F.; NETO, P.I.N.; COELHO, K.I.R. Técnica de biópsia hepática guiada pelo ultrassom em bezerros. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.5, n.1, p.94-99, 2002.

MELO, A.A.; HATAYDE, M.R.; CANOLA, J.C.; GARRIDO, E.; CIFUENTES, D. Intoxicação experimental de equinospor sementes de *Crotalaria spectabilis*. **Brazilian Journal of Equine Medicine**, n.40, p.10-14, 2012.

MESSER, N.T. The use of laboratory tests in equine practice. **Veterinary Clinical North American: Equine Praticce**, v.11, n.3, p.345-350, 1995.

MODRANSKY, P.D. Ultrasound-guided renal and hepatic biopsy techniques. **Veterinary Clinical North American: Equine Praticce**, v.2, p.115-125, 1986.

MOLGAARD, L.; DAMGAARD, B.M.; BJERRE-HARPOTH, V.; HERSKIN, M.S. Effects of percutaneous liver biopsy on dairy cow behaviour. **Research in Veterinary Science**, v.93, p.1248-1254, 2012.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004.

NAVARRE, C.B.; PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1 ed. São Paulo: Roca. 2005. p.99-103.

NELSON, A.W. Analysis of equine peritoneal fluid. **Veterinary Clinical North American: Large Animal Practice**, v.1, p.267-274, 1979.

NÉSPOLI, P.B.; GHELLER, V.A.; PEIXOTO, P.V.; FRANÇA, T.N.; CARVALHO, A.U.; ARAÚJO, D.K.G.; MALM, C. Avaliação de técnicas de biópsia hepática em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.29-36, 2010.

NEVES, M.M.; MARQUES JUNIOR, A.P.; ALVES, G.E.S.; FARIA, E.P. Valores referenciais da análise do líquido peritoneal de equinos sadios. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.809-811, 2000.

NOVAIS, E.P.F.; RECKZIEGEL, G.C.; PALERMO, J.G.C; MOSCARDINI, A.R.C.; MUSTAFA, V.S.; CASTRO, M.B.; BORGES, J.R.J.; GODOY, R.F. Biópsia hepática no diagnóstico da esteatose em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**. Suplemento 1, 2009. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.

PARODI, A.L. História natural da reação inflamatória. In: **Compêndio dos AINS (antiinflamatórios não esteróides)**. Schering-Plough Veterinária, 1997. p.9-18.

PEARSON, E.G. & GRAIG, A.M. The diagnosis of liver diseases in equine and food animals. **Mod. Veterinary Practice**, v.63, n.3, p.233-238, 1980.

RYAN, B.G., MAJNO, G. Acute Inflammation. **American Journal of Pathology**, v.86, p.185-274, 1977.

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. 1737 p.

REECE, W.O. **Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos**. 3 ed. São Paulo: Roca. 2008. p.425-426.

ROSENFELD, G. "Etilenodiamina tetracética dissódico (EDTA) como anticoagulante para técnica hematológica." **Revista Clínica**, p.65-71, 1955.

ROSS, M.H. **Histologia: texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p.581-595.

SCHEFFER, J.F.S.; GONZÁLEZ, F.H.D. Enzimologia clínica em medicina veterinária. Disponível em <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/index.htm>. 2006.

SILVA, L.C.L.C.; STOPIGLIA, A.J.; FANTONI, D.T. Técnica de biópsia hepática em equino por laparoscopia. **Ciência Rural**, v.32, p.459-465, 2002.

SILVA, L.C.L.C.; FERREIRA, M.A.; GOMEZ, H.M. Biópsia hepática em ovino por via laparoscópica. In: **Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária**, Ribeirão Preto. Santa Maria: CBCAV, p.108-109, 1996.

SMITH, B.P. **Large animal internal medicine: diseases of horses, cattle, sheep and goats**. 3.ed., St Louis: Mosby, 2002. 1735pp.

SMITH, M.R.W.; STEVENS, K.B.; DURHAM, A.E.; MARR, C.M. Equine hepatic disease: the effect of patient- and case- specific variables on risk and prognosis. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.549-552, 2003.

SLOVIS, N. Clinical assessment of adult colic. **11th WEVA Proceedings**, Guarujá, Brazil, 2009.

SPIER, S.J.; SNYDER, J.R. Physical and laboratory evaluations of the horse with colic. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 3.ed. New York : Saunders, 1992. p.193.

SPYCHER, C., ZIMMERMAN, A. and REICHEN, J. The diagnostic value of liver biopsy. **Gastroenterology**, v.1, p.12-17, 2001.

SWANWICK, R.A., WILKINSON, J.A. A clinical evaluation of abdominal paracentesis in the horse. **Australian Veterinary Journal**, v.52, p.109-117, 1976.

TAKIGUCHI, M.; FUJINAGA, T.; NAIKI, M. Isolation, characterization, and quantitative analyses of c-reactive protein from horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p.1215-1220, 1990.

TADROS, E.M.; FRANK, N.; DONNELL, R.L. Effects of equine metabolic syndrome on inflammatory responses of horses to intravenous lipopolysaccharide infusion. **American Journal of Veterinary Research**, v.74, n.7, p. 1010-1019, 2013.

TAYLOR, F.G.R. e HILLYER, M.H. **Diagnostic techniques in equine medicine** London: WB Saunders. 1997. p. 384.

THRALL, A.M. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca. 2007.

TOSTES, R.A.; BANDARRA, E.P. Biópsia hepática em cães: relação entre qualidade da amostra e grau de conclusão do diagnóstico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.5, 2002.

TULLENERS, E.P. Complications of abdominocentesis in the horse. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.182, n.3, p.232-234, 1983.

WEST, H.J. The evaluation of hepatobiliary disease in horses and cattle. **FRCVS Thesis**, London, 1994.

WEST, H.J. Clinical and pathological studies with hepatic disease. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.146-156, 1996.

WHITE, N.A. Determining the diagnosis and prognosis of the acute abdominal. In : WHITE, N.A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia : Lea & Fabiger, 1990. p. 101-140.