

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIOPSIA PULMONAR
TRANSTORÁCICA EM OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E OS
EFEITOS DO PROCEDIMENTO SOBRE O METABOLISMO
OXIDATIVO

ANDREZA AMARAL DA SILVA

Botucatu – SP
Fevereiro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIOPSIA PULMONAR TRANSTORÁCICA EM
OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E OS EFEITOS DO PROCEDIMENTO
SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO

ANDREZA AMARAL DA SILVA

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Débora Cristina
Damasceno

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

Silva, Andreza Amaral da.

Avaliação da técnica de biopsia pulmonar transtorácica em ovinos clinicamente sadios e os efeitos do procedimento sobre o metabolismo oxidativo / Andreza Amaral da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Co-orientador: Débora Cristina Damasceno

Assunto CAPES: 50501062

1. Pulmões - Biopsia - Ovino 2. Metabolismo oxidativo

CDD 636.30896

Palavras-chave: Biopsia pulmonar; Metabolismo oxidativo; Ovinos

Nome do Autor: Andreza Amaral da Silva

Título: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIÓPSIA PULMONAR TRANSTORÁCICA EM OVINOS CLINICAMENTE SADIOS E OS EFEITOS DO PROCEDIMENTO SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Simone Biagio Chiacchio
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Fernando José Benesi
Membro
Departamento de Clínica Médica
FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 19 de Fevereiro de 2009

Dedicatória

Aos meus pais, Carlos e Clarice, pela maior prova de amor que poderia ser dada, à renúncia dos próprios sonhos pelos filhos.

"O amor faz com que tudo, de repente, pareça possível"

H. Jackson Brown

Ao meu orientador Roberto Calderon Gonçalves, pela disponibilidade que sempre manifestou e a empatia com que recebeu as minhas idéias, estímulo que me permitiu vencer as inseguranças deste processo.

"Nosso maior desejo na vida é encontrar alguém que nos faça fazer o melhor que pudermos"

Ralph Waldo Emerson

"Só os sonhadores podem nos ensinar a voar"

Anne Marie Pierce

Agradecimentos

A Deus, por sua proteção e presença constante. Seré eternamente grata pelas oportunidades, por me permitir chegar até aqui e pelas pessoas que cruzaram meu caminho.

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

Aos meus Pais, Carlos e Clarice, exemplo de amor e dedicação, que sempre estiveram ao meu lado nas adversidades, me ensinando a transpor barreiras e permitindo a realização de meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Roberto Calderon Gonçalves, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência, credibilidade e confiança depositados em mim. Gostaria que soubesse que o admiro e o considero um exemplo de pessoa e de profissional, que sempre estimulou e contribuiu para o meu aprimoramento e desenvolvimento na área acadêmica. Por sua capacidade e sensibilidade de, a cada conversa, extrair de mim elementos e sentimentos que me tornam uma pessoa melhor, minha eterna gratidão.

A minha co-orientadora, Débora Cristina Damasceno, por me receber em seu laboratório de braços abertos, disponibilizar seus equipamentos e pela orientação na padronização das técnicas laboratoriais e na elaboração deste trabalho. Agradeço profundamente a gentileza, a generosidade, a confiança em mim depositada e o acolhimento.

Ao meu namorado e amigo, João Paulo Trinin Galocha, cuvinete atento de minhas dúvidas, aflições, desânimos e sucessos. Obrigada pelo apoio, pela confiança e valorização do meu trabalho, ainda que por muitas vezes, sem entender o que tudo aquilo significava. Foi o seu companheirismo que me deu coragem para transpor meus medos e a culpa pelo tempo que a cada dia te subtraía. Amo você!!

As minhas irmãs, Amanda e Amália, que souberam dar sua parcela de contribuição nessa jornada e procuraram, na amizade, com paciência, atenção e carinho, tornar possíveis meus objetivos. Meu sincero obrigado.

Aos meus familiares que, apesar da distância, sempre me incentivaram, e me deram forças nos momentos de desânimo e solidão. Um agradecimento especial ao meu primo Bruno da Silva Mendes, pelas constantes palavras de incentivo em nossas infindáveis conversas virtuais.

Ao meu amigo Ulisses Stelmann. Dizer que o admiro e sou eternamente grata a você é muito pouco, nossa amizade merece mais!!! Obrigada por dizer, algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir e por ter me mostrado outro lado a considerar. Obrigada por me ensinar a valorizar mais o meu tempo e por saber que posso contar contigo e ter sua ajuda sempre que preciso. Obrigada por ser um amigo e tanto pra mim, de tantas diferentes e significativas formas. Que venham mais dez anos de amizade!

Ao meu amigo Luciano José Eloy. Agradeço a sua confiança em mim depositada quando todos me deram as costas. Por ter sempre algo para dizer e me fazer pensar, por me arrancar sorrisos nos maus momentos e me amparar nas vezes em que fraquejei. Os momentos mais difíceis que a vida trouxe junto com meu mestrado foram, sem dúvida, suavizados pela sua amizade, carinho e apoio. Meu sincero obrigado!

Ao Dr. Kleber Eduardo de Campos e a Ana Paula Spada, pós-graduanda da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela colaboração e presteza na realização das análises bioquímicas, assim como pela inestimável ajuda no esclarecimento de todas as minhas dúvidas.

Ao pós-graduando Danilo Otávio Laurenti Ferreira e a graduanda Bianca Paola Santarosa pela ajuda nas colheitas de amostras, mesmo nos horários mais impróprios. Em especial ao Danilo por disponibilizar os seus animais para o meu experimento.

Ao Prof. Júlio Lopes Sequeira e a doutoranda Camila Dias Porto pelas análises histológicas.

Ao Prof. Adriano Dias pela inestimável contribuição na realização dos cálculos estatísticos.

Aos professores do Departamento de Clínica Veterinária desta faculdade Alexandre Secorum Borges, Rogério Martins Amorim, Roberto Calderon Gonçalves e Simone Biagio Chiacchio. Obrigado pelo conhecimento compartilhado, pela acolhida, apoio e momentos de descontração durante o mestrado. Um agradecimento especial ao Prof. Alexandre Secorum Borges que gentilmente cedeu espaço físico em seu laboratório para que eu colocasse os equipamentos utilizados em meu experimento

Às secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, Marlene Dias Camargo e Izabel Cristina Castro, pela amizade, simpatia e serviços prontamente prestados sempre que solicitado.

Aos meus colegas de pós-graduação, Janaína Biava, Adriana Rino e Ulisses Stelmann, pelos momentos agradáveis, de descontração e de muito estudo que passamos juntos na nossa “pequena” e aconchegante sala.

Ao Marco Antônio Smão da Silva e Marcos Donizeti Gouveia, funcionários do Serviço de Clínica de Grandes Animais desta Faculdade, pelo imprescindível auxílio sempre que solicitado.

Aos residentes do Serviço de Clínica de Grandes Animais desta Faculdade pela ajuda prestada em diversos momentos.

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

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio Financeiro à Pesquisa e pela Bolsa de Estudos concedida, permitindo minha total dedicação ao mestrado.

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

"Uma longa viagem começa com um único passo"

Lao-Tsé

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Representação dos resultados estatísticos descritivos das variáveis Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Total (GSH-t), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de ovinos antes da biopsia pulmonar e 30 minutos após o procedimento. Teste de Wilcoxon, considerando $p < 0,05$	33
-----------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de ovino. **A.** visão panorâmica de um fragmento pulmonar mostrando a organização tecidual (H & E, 40x); **B e C.** organização tecidual pulmonar: bronquíolos primários e terminais, ductos e sacos alveolares e alvéolos isolados (H & E, 40x e 100x, respectivamente); **D.** pneumonia intersticial crônica: aumento da celularidade, edema, infiltrado inflamatório misto moderado, composto por mononucleares e eosinófilos, além de focos hemorrágicos (H & E, 400x).....32
- Figura 2** Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Superóxido Dismutase (SOD) em hemácias de ovinos antes da biopsia pulmonar e 30 minutos após o procedimento.....34
- Figura 3** Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) em hemácias de ovinos antes da biopsia e 30 minutos após o procedimento.....34
- Figura 4** Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Glutaciona Total (GSH-t) em hemácias de ovinos antes da biopsia e 30 minutos após o procedimento.....35
- Figura 5** Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de ovinos antes da biopsia e 30 minutos após o procedimento.....35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAT	Catalase
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico
EDTA	Ácido Etilenodiamida Tetracético
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
GSH	Glutaciona Reduzida
GSH-Px	Glutaciona Peroxidase
GSH-Rd	Glutaciona Redutase
GSH-t	Glutaciona Total
GSSG	Glutaciona Oxidada
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
MDA	Malonaldeído
MED	Média
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Radical Superóxido
OH[•]	Radical Hidroxila
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
SOD	Súperóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

	Páginas
<i>Resumo</i>	12
<i>Abstract</i>	14
1. <i>Introdução</i>	16
2. <i>Revisão de Literatura</i>	17
2.1. <i>Biopsia Pulmonar</i>	17
2.2. <i>Espécies Reativas do Oxigênio e Estresse Oxidativo</i>	19
3. <i>Objetivos</i>	21
4. <i>Material e Métodos</i>	22
4.1. <i>Animais</i>	22
4.2. <i>Exame Clínico</i>	22
4.3. <i>Colheita do Material</i>	22
4.3.1. <i>Contenção</i>	22
4.3.2. <i>Colheita das Amostras</i>	23
4.3.2.1 <i>Amostra de Sangue</i>	23
4.3.2.2. <i>Biopsia Pulmonar</i>	23
4.4. <i>Processamento e Análise do Material</i>	24
4.4.1. <i>Exame da Carcaça</i>	24
4.4.2. <i>Exame do Fragmento</i>	24
4.4.2.1. <i>Histopatologia</i>	24
4.4.3. <i>Amostras de Sangue</i>	25
4.4.3.1. <i>Determinação da Hemoglobina</i>	26
4.4.3.2. <i>Determinação da Peroxidação Lipídica</i>	26

4.4.3.3. <i>Determinação da Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)</i>	26
4.4.3.4. <i>Determinação da Concentração de Glutathiona Total (GSH-t)</i>	27
4.4.3.5. <i>Determinação da Atividade Enzimática de Glutathiona-Peroxidase (GSH-Px)</i>	27
4.5. <i>Análise Estatística</i>	28
5. <i>Resultados</i>	28
6. <i>Discussão</i>	36
7. <i>Conclusão</i>	44
8. <i>Referências Bibliográficas</i>	45
9. <i>Anexos</i>	55
<i>Artigo Científico</i>	59

SILVA, A.A. **Avaliação da técnica de biopsia pulmonar transtorácica em ovinos clinicamente sadios e os efeitos do procedimento sobre o metabolismo oxidativo.** Botucatu, 2009. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RESUMO

Avaliou-se a segurança e a eficácia da técnica de biopsia pulmonar transtorácica percutânea e seus efeitos sobre o metabolismo oxidativo na espécie ovina. Foram utilizados 20 ovinos clinicamente sadios e destinados ao abate. Inicialmente, foram coletadas amostras de sangue da veia jugular em tubos de ensaio contendo heparina. Após a colheita, foi realizado o exame clínico seguido da biopsia pulmonar com agulha semi-automática no 7º espaço intercostal direito cerca de 5 cm acima do olécrano. Avaliou-se o número de tentativas para a realização do procedimento e o tamanho dos fragmentos. As amostras obtidas foram analisadas histologicamente. Uma nova colheita de sangue foi realizada 30 minutos após a biopsia, e as amostras levadas ao laboratório para a detecção indireta dos radicais livres [superóxido dismutase (SOD), glutatona total (GSH-t) e peroxidase (GSH-Px) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)]. Após o abate foi realizado o exame *pos mortem* para avaliação de complicações da técnica e das eventuais lesões provocadas. Entre todos os animais submetidos à biopsia apenas dois demonstraram resistência à técnica, sendo obtidos fragmentos pulmonares que mediram entre 4 mm a 7 mm de comprimento, com média de $1,8 \pm 1$ tentativas por fragmento. As principais alterações relacionadas à técnica foram: tosse, dispnéia inspiratória, elevação das frequências cardíaca e respiratória e aumento do ruído broncobronquiolar. Ao exame *pos mortem* observou-se hemorragia dos músculos intercostais e pleura visceral de tamanho variado em todos os cordeiros, além de feridas lineares de até 14 mm nos dois animais que não reagiram bem ao procedimento. Das 20 tentativas de execução da técnica, 18 obtiveram sucesso, enquanto que em duas o fígado foi equivocadamente puncionado. As amostras de tecido pulmonar foram consideradas representativas, pois foi possível a visualização de estruturas íntegras,

incluindo bronquíolos e alvéolos. Trinta minutos após a biópsia houve redução nas atividades de SOD e de GSH-Px, não sendo verificada alteração significativa nas concentrações de GSH-t e de TBARS após o procedimento. A biópsia pulmonar mostrou-se segura e eficaz para obtenção amostras pulmonares com fins de diagnóstico histológico, sem causar alterações significativas no metabolismo oxidativo e danos teciduais expressivos.

Palavras-chave: Ovinos; biópsia pulmonar; metabolismo oxidativo.

SILVA, A.A. **Evaluation of the transthoracic lung biopsy technique in clinically healthy sheep and the effects of the procedure on the oxidative metabolism.** Botucatu, 2009. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

ABSTRACT

It was evaluated the safety and effectiveness of the percutaneous transthoracic lung biopsy technique and its effects of the procedure on oxidative metabolism in sheep. It was used 20 clinically healthy sheep. Initially, blood samples were collected from the jugular vein in test tubes containing heparin. After collecting the blood, the clinical examination was carried out followed by lung biopsy with a semi-automatic needle biopsy. The number of attempts and size of the fragments were measured and the samples were analyzed histologically. New blood samples were collected 30 minutes after the biopsy. All blood samples were taken to the laboratory for the indirect detection of free radicals [superoxide dismutase (SOD), total glutathione (GSH-t), glutathione peroxidase (GSH-Px) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)]. After the slaughter, a post mortem examination assessed the technical complications and possible injuries. Among all animals underwent biopsy only two did not tolerate the technique. It were obtained Lung fragments from 4 mm to 7 mm and it were required on average 1,8 attempts. The main changes related to the procedure were: cough, labored breathing, increased heart and breathing rate and increased broncobronquiolar noise. The post-mortem examination revealed bleeding of the intercostal muscles and visceral pleura of various sizes in all lambs, and a wound up to 14 mm in the lung of two animals that did not tolerate the procedure. From 20 attempts to implement the technique, 18 were successful, while in two of them the liver was mistakenly punctured. Samples of lung tissue were representative. It was possible to visualize intact structures, including bronchioles and alveoli. The activity of SOD and GSH-Px decreased thirty minutes after the biopsy. There were no changes in GSH-t and TBARS concentrations after the procedure. The percutaneous transthoracic lung biopsy

technique showed to be safe and effective for obtaining lung samples for histological diagnosis without causing significant changes in oxidative metabolism and expressive tissue damage.

Key words: Ovine, lung biopsy, oxidative stress

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a ovinocultura reapareceu principalmente na região Sudeste do Brasil, como solução econômica para os pecuaristas de pequeno e médio porte. Na última década tem se verificado não só aumento no efetivo dos rebanhos, mas também no número de propriedades envolvidas nesta atividade. A principal causa disso é o aumento no consumo de carne ovina, mais especificamente da carne de cordeiro, viabilizando sistemas de produção animal em pequenas propriedades e tornando-se mais uma alternativa de investimento no meio agropecuário.

Atualmente, as doenças respiratórias são consideradas um sério problema de sanidade na ovinocultura, apresentando altos índices de morbidade e mortalidade (MARTIN, 1996; CUTLIP et al., 1998), sendo responsáveis por 10 a 40% das mortes em animais adultos (VIEIRA et al., 1993) e por 17% das mortes durante o período perinatal (ROOK et al., 1990).

No processo diagnóstico de diversas enfermidades do sistema respiratório é imprescindível a realização de anamnese criteriosa e exame físico minucioso do aparelho respiratório (GONÇALVES, 2004). Quando estes recursos semiológicos não são suficientes para uma conduta diagnóstica adequada, é preciso lançar mão de procedimentos que ajudem o clínico na busca pelo diagnóstico. Para tanto, os exames complementares auxiliam não só no diagnóstico, mas também no prognóstico, plano terapêutico e preservação do paciente.

A biopsia pulmonar pode ser empregada como auxílio diagnóstico, com a efetividade confirmada do procedimento na obtenção de fragmentos adequados para o exame histopatológico e microbiológico (PORTO, 1991). Todavia, a biopsia pulmonar é um procedimento pouco efetuado na medicina veterinária, talvez pela insegurança dos veterinários em realizar a técnica correta. Apesar disso, já foi comprovado que a biopsia pulmonar auxilia na diferenciação de alterações inflamatórias, alérgicas, enfisematosas, edematosas e neoplásicas em várias espécies animais (BRAUN et al., 1999; PUGH, 2005), inclusive na espécie ovina (BRAUN et al., 2000).

Na última década foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel das Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) em processos patológicos

que envolvem o trato respiratório de animais, sobretudo na espécie eqüina (ART et al., 1999; KIRSCHIVINK et al., 2002; DEATON et al., 2004). Amostras de tecido pulmonar, obtidas a partir de biopsia, têm sido utilizadas com sucesso para determinar os danos provocados pelas EROs no parênquima pulmonar de humanos (SLADE et al., 1985; COMHAIR et al., 2005), ratos (FORMAN & FISHER, 1981; SLADE et al., 1985) e ovinos (IKEDA et al., 1998; MALHOTRA et al., 2002). Em contrapartida, não existem relatos que avaliem o papel da técnica de biopsia pulmonar no desequilíbrio do estado oxidativo, permitindo assim a formação de grandes quantidades de EROs, o que poderia agravar o quadro clínico do paciente devido ao seu já comprovado envolvimento na patogenia e progressão de algumas dessas doenças.

Levando em conta o crescente desenvolvimento da ovinocultura no Brasil, a alta ocorrência de doenças respiratórias nesses animais, e as evidências de que os radicais livres representem um grande papel no desenvolvimento de algumas afecções respiratórias, é de suma importância o estudo de métodos que complementem o diagnóstico clínico e auxiliem a realização de um diagnóstico precoce, bem como seus possíveis efeitos sobre o estado oxidativo desses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biopsia Pulmonar

A biopsia pulmonar é um procedimento invasivo de elucidação diagnóstica que consiste na remoção de tecido pulmonar vivo para exame macro e microscópico, envolvendo o processamento laboratorial do material, a confecção de lâminas seguida de análise e descrição microscópica (PORTO, 1991). Quando há suspeita de enfermidades de etiologia infecciosa, a amostra de tecido recolhida pode ainda ser submetida à cultura de fungos e de bactérias, bem como a testes de sensibilidade a antibióticos. (SAVAGE et al., 1998; BRAUN et al., 2000). As informações obtidas através da biopsia são úteis ao clínico na definição de um diagnóstico, permitindo a tomada de decisões sobre o tratamento e o prognóstico do paciente (STONE 1995).

A história da biópsia pulmonar data de 1883, quando Leyden, para a identificação de microorganismos em três casos de pneumonia, realizou a primeira biópsia pulmonar aspirativa por acesso transtorácico. Três anos depois, Menetrier (1886) foi o primeiro a diagnosticar carcinoma de pulmão utilizando esta mesma técnica (PORTO, 1991; UNVER et al., 2006). Depois disso, devido à alta frequência de complicações observadas, conseqüentes ao grosso calibre das agulhas utilizadas, e pela falta de orientação visual do ponto e do trajeto da punção, o método não teve aceitação generalizada e acabou caindo em desuso. Apesar do insucesso inicial, em 1963 Dahlgren e Nordenstrom reafirmaram a serventia do procedimento, com sua utilização associada a técnicas de imagem em tempo real, e passa então a ser amplamente empregada tornando-se uma prática rápida e efetiva para o diagnóstico de afecções pulmonares (PORTO, 1991; MOORE, 2005; UNVER et al., 2006). Os dispositivos automáticos para a execução de biópsias foram introduzidos em 1982 por Lindgren, com sua efetividade comprovada na obtenção de fragmentos de alta qualidade para o exame histopatológico em diversos órgãos (WAGNER et al., 1995). Hopper et al. (1990) demonstraram a superioridade diagnóstica desses aparelhos diante das agulhas convencionais na execução de punção abdominal em humanos.

Com relação às vias de acesso, as biópsias pulmonares podem ser transbronquial, conduzidas com auxílio de um endoscópio, transtorácica e aberta, onde o pulmão é exposto mediante toracotomia (NEFF, 1980). A biópsia pulmonar transtorácica, especificamente, pode ser aspirativa ou lancetante. No primeiro caso usa-se uma agulha simples e se retira um suco de tecidos para estudos citopatológicos e microbiológicos. Na punção lancetante consegue-se um cilindro maciço de tecido também para exames histopatológicos e microbiológicos (PORTO, 1991).

A biópsia pulmonar tem valor diagnóstico, sendo demonstrada boa correlação entre os achados histopatológicos e microbiológicos com o quadro clínico, em eqüinos (RAPHEL & GUDSON, 1981; NAYLOR et al., 1992; DOUCET & VIEL, 2002; VINNER et al., 2006) bovinos (SILVA, 2005; PRINGLE, 1992), ovinos (BRAUN et al., 2000), cães (ROUDEBUSH et al., 1981; TESKE et al., 1991; WOOD et al., 1998; DeBERRY et al., 2002) e gatos (MACMILLAN et al., 1988; WOOD et al., 1998).

A indicação da biópsia pulmonar se reserva àqueles pacientes que necessitam de um diagnóstico histológico e/ou microbiológico para um direcionamento do manejo e de suas terapias e animais com enfermidades respiratórias difusas e de causa indeterminada, sobretudo quando a progressão da doença é um fator decisivo. Entretanto, por ser um método diagnóstico invasivo, o clínico só deve lançar mão deste recurso quando outros procedimentos menos invasivos falharam em fornecer um diagnóstico preciso. (RAPHEL e GUNSON, 1981; CANZIAN et al., 2006). Por outro lado, a biópsia pulmonar não é um procedimento recomendado para pacientes com intensa taquipnéia, acessos de tosse freqüentes, função pulmonar diminuída, distúrbios de coagulação e animais incapazes cooperar com o procedimento (NEFF, 1980; GRODE et al., 1993; ROY e LAVOIE, 2003).

Apesar de a biópsia pulmonar ser um procedimento simples e de ampla aplicabilidade, alguns profissionais ainda sentem-se inseguros quanto a sua realização, principalmente por causa das possíveis complicações decorrentes do procedimento, embora complicações graves sejam incomuns (ZAVALA & BEDELL, 1972; GERAGHTY et al., 2003). Complicações freqüentemente associadas à execução da técnica incluem epistaxe e hemoptise transitórias e pneumotórax, não tendo sido relatadas complicações em longo prazo (WARNER, 1990; NAYLOR et al., 1992).

2.2. Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) e Estresse Oxidativo

O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR e ERZURUM, 2002). Entretanto, uma pequena quantidade de oxigênio consumida (2 a 5%) é reduzida por vias metabólicas normais, produzido uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, denominadas espécies reativas do oxigênio (EROs) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002). Entre os principais metabólitos reativos do oxigênio produzidos durante este processo podemos destacar o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), sendo que a principal fonte produtora destas EROs é a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; MOLINA, 2003).

Sob condições normais, o balanço entre os antioxidantes e as EROs é suficiente para garantir o bom funcionamento do organismo. Entretanto, um acréscimo na concentração de EROs ou um decréscimo no sistema antioxidante pode destruir este equilíbrio. Este estado de desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo (WRIGHT et al., 1994; KIRSCHVINK e LEUKEUX, 2005; VALKO et al., 2007), condição em que as EROs podem provocar lesões teciduais (KINULLA et al., 1995), danificando organelas celulares, ácidos nucléicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007).

De todas as ações deletérias associadas ao estresse oxidativo, a oxidação das membranas celulares, processo conhecido como peroxidação lipídica, talvez seja a que tenha maior impacto. A lipoperoxidação envolve o ataque das EROs aos ácidos graxos insaturados das membranas, levando à perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas à célula no espaço extracelular, lesionando os tecidos (SJÖDIN et al., 1990; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; DAMASCENO et al., 2002).

Contudo, o organismo não é uma vítima passiva do ataque das EROs. Pelo contrário, ele conta com um complexo mecanismo de defesa antioxidante responsável pela manutenção da homeostase entre a produção e a eliminação de EROs (WRIGHT et al., 1994). De modo geral, os agentes antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos constituem a primeira defesa endógena de neutralização das EROs e incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GSH-Px) e a glutatona redutase (GSH-Rd) e entre os não-enzimáticos podemos destacar as vitaminas E e C, glutatona reduzida (GSH), carotenos, ácido úrico e proteínas quelantes de metais de transição. (DAMASCENO et al., 2002). Apesar da defesa antioxidante básica oferecida pelas enzimas antioxidantes, a variação individual nos níveis de cada uma dessas enzimas mostra-se importante no agravamento das doenças relacionadas aos agentes oxidantes (KINNULA & CRAPO, 2003).

Inflamação é uma resposta de defesa do organismo que ocorre após o dano celular, entretanto, uma resposta inflamatória extensa, prolongada ou não regulada é altamente prejudicial ao organismo. O processo inflamatório inclui a participação de diferentes tipos celulares, principalmente células com função fagocitária. Durante o processo de fagocitose há liberação de grande quantidade de EROs pelas células fagocíticas, evento conhecido como explosão respiratória. As EROs liberadas durante a explosão respiratória são, provavelmente, as principais responsáveis pelos danos teciduais decorrentes do processo inflamatório. Além de provocar injúria tecidual, as EROs atuam também como mediadores inflamatórios, potencializando a resposta inflamatória. Quando o pulmão e o sangue estão sob estresse oxidativo há ativação de vias metabólicas que culminarão com a cascata da inflamação. Células inflamatórias são então recrutadas para a microcirculação pulmonar e direcionadas às vias aéreas posteriores tornando-se ativas e passando a produzir EROs em resposta aos estímulos inflamatórios (RAHMAN e MACNEE, 2000), amplificando seus efeitos nesses tecidos.

Diante do que foi exposto é possível acreditar que técnicas invasivas como a biopsia pulmonar possam resultar em resposta inflamatória aguda acarretando aumento na produção de EROs nos pulmões e no sangue, provocando danos teciduais graves.

3. OBJETIVOS

São objetivos deste estudo:

1. Avaliar a segurança da técnica de biopsia pulmonar percutânea transtorácica e sua eficácia na obtenção de amostras adequadas que permita a análise histopatológica do fragmento;
2. Comparar a ocorrência de complicações decorrentes da técnica de biopsia pulmonar entre ovinos clinicamente sadios;
3. Determinar a metodologia para análise de antioxidantes e da lipoperoxidação em hemácias de ovinos clinicamente sadios;

4. Estabelecer os principais marcadores do estresse oxidativo em hemácias de ovinos clinicamente saudáveis;

5. Avaliar o efeito da biópsia pulmonar percutânea transtorácica sobre os antioxidantes e sobre a peroxidação lipídica em hemácias de ovinos clinicamente saudáveis;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 20 ovinos clinicamente saudáveis, independentemente de sexo, raça e idade, procedentes da região de Botucatu-SP, e destinados ao abate.

4.2. Exame Clínico

Todos os animais foram submetidos ao exame clínico imediatamente antes e após a biópsia pulmonar, utilizando-se protocolo adotado por Viana (2003), conforme apresentado no Anexo 1 e critério clínico de Gonçalves (2004). Os resultados foram anotados em fichas individuais.

4.3. Colheita do Material

4.3.1. Contenção

Os animais foram contidos por cabresto e manualmente, com auxílio de ajudante, mantidos em pé, durante todo o período da colheita de materiais.

4.3.2. Colheita das Amostras

4.3.2.1. Amostra de Sangue

Foram colhidos da veia jugular, 5mL de sangue, em tubos de ensaio heparinizados, imediatamente após a contenção, antes da realização do exame físico, visando minimizar os efeitos do estresse desse procedimento sobre os animais. Novas amostras de sangue foram colhidas da mesma forma, 30 minutos após a biópsia, com a finalidade de verificar os efeitos da biópsia pulmonar e as suas conseqüências sobre a produção de EROs. Em seguida, as amostras de sangue foram armazenadas a 10° C em recipiente apropriado com gelo e encaminhadas ao laboratório de pesquisa experimental de Ginecologia e Obstetrícia da FMB-UNESP, para a detecção de biomarcadores do estresse oxidativo [SOD, glutathiona total (GSH-t), GSH-Px e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)].

4.3.2.2. Biópsia Pulmonar

O ponto de punção para a biópsia pulmonar foi demarcado no sétimo espaço intercostal do antímero lateral direito, aproximadamente 5 cm acima do olécrano. A seguir foi feita tricotomia e antisepsia da pele com solução de iodo povidine a 1%, seguido de anestesia local da pele do espaço intercostal, tecido subcutâneo, músculos intercostais e pleura parietal, utilizando-se 5 mL de solução de lidocaína a 2%. Alguns minutos depois realizou-se, com bisturi, incisão na pele e tecido subcutâneo, entre os espaços intercostais. Uma agulha de biópsia do tipo semi-automática¹ foi inserida, imediatamente cranial à costela, em ângulo vertical à superfície corporal, evitando-se os vasos e nervos intercostais.

Amostras do tecido pulmonar foram colhidas de acordo com Finn-Bodner e Hathcock (1993) e Braun et al. (1999), como em bovinos. Quando não se obteve nenhum fragmento do parênquima após a punção, repetiu-se o procedimento até que se conseguisse amostra satisfatória do tecido pulmonar.

¹ BD 16 G X 15 cm; Euromed Cateteres®

Analisou-se o número de tentativas para a execução do procedimento. Imediatamente após a punção, o fragmento adquirido foi conservado em recipiente contendo formalina a 10% até que fosse submetido à análise histopatológica.

Nenhuma medicação foi administrada aos animais e nenhuma atenção especial foi dada ao sítio da biópsia, uma vez que todos os animais foram abatidos logo após o procedimento.

4.4. Processamento e Análise do Material

4.4.1. Exame da Carcaça

Após o abate, os animais foram analisados por inspeção no exame *pos mortem* do matadouro para avaliação de complicações decorrentes da técnica. Considerando-se o escore de gravidade da lesão descrito por Silva (2005), adaptado de Braun et al. (1999), as hemorragias encontradas na pleura visceral, atribuídas à biópsia foram consideradas da seguinte forma:

- Escore 1: lesão pleural com área até 4mm²
- Escore 2: lesão pleural com área entre 4,1 e 25mm²
- Escore 3: Lesão pleural com área superior a 25,1mm²

A área total das lesões provocadas por hemorragia sub-pleural também foi avaliada.

4.4.2. Exame do Fragmento

As amostras obtidas foram submetidas ao exame macroscópico, avaliando-se o comprimento de cada fragmento tecidual.

4.4.2.1. Histopatologia

Para o exame histopatológico as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – UNESP Botucatu fixadas em formalina tamponada a 10% e, posteriormente, desidratadas em álcool,

embebidas em parafina, seccionadas, coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico. A qualidade dos cortes histológicos obtidos a partir dos fragmentos de biopsia foi avaliada segundo escore adaptado de Hopper et al. (1993):

- Adequação tecidual para o diagnóstico histopatológico (0-2)
 - Escore 0: tecido insuficiente para análise histopatológica
 - Escore 1: tecido insuficiente para uma avaliação histopatológica adequada, mas é possível realizar um diagnóstico de suspeita
 - Escore 2: tecido suficiente para a avaliação histopatológica
- Preservação tecidual (0-2)
 - Escore 0: Pobre
 - Escore 1: Intermediária
 - Escore 2: Boa
- Presença de artefatos (0-2)
 - Escore 0: Intensa
 - Escore 1: Intermediária
 - Escore 2: Sem presença de artefatos

Os achados histopatológicos referentes às biopsias foram registrados por fotomicrografia².

4.4.3. Amostras de Sangue

As amostras de sangue foram centrifugadas³ a 185 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. Para obtenção das hemácias, o sangue foi lavado com tampão-salina-fosfato (PBS), a 4°C e centrifugado a 1575 x g durante 15 minutos por três vezes. A cada repetição do procedimento retirou-se o plasma, glóbulos brancos e as plaquetas, por aspiração com micropipeta. Às hemácias lavadas (50 µL) foram adicionados 950 µL de água deionizada e agitados, por inversão, para obtenção do hemolisado. O hemolisado foi utilizado para determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo: atividade enzimática da SOD e concentrações de GSH-t e de TBARS. Para a determinação da atividade enzimática da GSH-Px, a água deionizada foi substituída por solução

² JENAMED 2 – CARL ZEISS JENA®

³ CENTRÍFUGA EPPENDORF 5804E®

estabilizadora (2,7 mM EDTA e 0,7 mM 2-mercaptoetanol) (FERREIRA et al., 1999).

4.4.3.1. Determinação da Hemoglobina

Para a determinação da hemoglobina, 20 μ L do hemolisado foram diluídos e agitados em 2 mL de solução de Drabkin. Após 10 minutos de repouso, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro⁴ a 546 nm e expressa em g/dL (FERREIRA et al., 1999).

4.4.3.2. Determinação da Peroxidação Lipídica

Foi adicionado 1 mL de ácido sulfossalicílico (3,0%) a 1 mL de hemolisado, agitado por 10 segundos, centrifugado a 15.500 x g por 3 minutos e deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 500 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA a 0,67%) a 500 μ L de hemolisado. A mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos e a absorbância determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nM de malonaldeído (MDA) por grama de hemoglobina (nM/gHb) (FERREIRA et al., 1999).

4.4.3.3. Determinação da Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade total da SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol[®] pelo ânion superóxido. A mistura consistiu na adição de 100 μ L de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 20 μ L de pirogalol[®] 10mM e 860 μ L de água deionizada a 20 μ L de hemolisado. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm (25°C) por 5 minutos. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol[®], por miligrama de hemoglobina, é definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em UI/mgHb (FERREIRA et al., 1999).

⁴ BIOESPECTRO – SP - 220[®]

4.4.3.4. Determinação da Concentração de Glutathiona Total (GSH-t)

O conteúdo de GSH-t foi determinado pela adição da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que iniciou a reação enzimática da glutathiona com o ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A mistura consiste na adição de 1.290 μL de água destilada, 200 μL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 μL de 10 UI/mL de GSH-Rd, 200 μL de NADPH (2mM) e 100 μL de DTNB (12 mM) a 10 μL de hemolisado. Para obtenção da curva padrão da glutathiona, foi realizado o mesmo ensaio, substituindo-se a amostra de hemolisado por 10 μL de solução padrão a 1:1000 de glutathiona oxidada (GSSG) a 33 μM . A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm. A concentração da GSH-t foi expressa em micromolar do substrato reduzido por grama de hemoglobina ($\mu\text{M/gHb}$) (FERREIRA et al., 1999).

4.4.3.5. Determinação da Atividade Enzimática de Glutathiona-Peroxidase (GSH-Px)

A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH. A mistura consistiu na adição de 1.300 μL de água destilada, 200 μL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 μL de 10 UI/mL de GSH-Rd, 200 μL de NADPH (2mM), 40 μL de GSH (0,1 M) a 40 μL de hemolisado. A mistura foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Em seguida foi adicionado 20 μL de T-Butil hidroperóxido (7mM) e mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática por grama de hemoglobina (UI/gHb) (FERREIRA et al., 1999).

4.5. Análise Estatística

Os dados obtidos neste estudo referentes à utilização da técnica de biopsia pulmonar transtorácica percutânea em ovinos clinicamente sadios foram expostos por meio de estatística descritiva, através de média, desvio padrão e percentual.

Para a análise estatística dos resultados da avaliação das atividades enzimáticas da SOD e de GSH-Px e das concentrações de GSH-t e TBARS nas hemácias de ovinos submetidos à biopsia pulmonar antes e 30 minutos após o procedimento, utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon, adotando o nível de significância de 5%, para p menor ou igual a 0,05.

5. RESULTADOS

Pela técnica anteriormente descrita, fragmentos teciduais foram obtidos em todos os animais submetidos ao procedimento (20/20 - 100%), sendo necessária, em média $1,8 \pm 1$ tentativas. Das 20 biopsias realizadas, amostras de tecido foram obtidas após apenas uma tentativa em nove (9/20 - 45%) ocasiões, após duas tentativas em sete (7/20 - 35%), após três tentativas em dois (2/20 - 10%) e, após 4 tentativas também em dois (2/20 - 10%) momentos. A agulha escolhida foi de fácil manipulação e a técnica foi executada sem grandes dificuldades.

Treze animais (13/20 - 65%) toleraram bem a técnica de biopsia pulmonar transtorácica percutânea, entretanto, alguns animais demonstraram certa resistência durante o procedimento, vindo até a dificultar a coleta. Cinco (5/20 - 25%) animais demonstraram suave esforço (berros, feições de medo e elevação das patas), enquanto que dois (2/20 - 10%) animais apresentaram forte resistência (saltos e tentativas de coices) à realização da técnica.

Ao exame clínico, atitude geral e postura permaneceram inalteradas e a temperatura retal não se elevou, permanecendo dentro dos valores de referência para a espécie. Entretanto, as frequências cardíaca e respiratória aumentaram em 14 (70%; Média (MED) = 122bpm) e 12 (60%; MED = 52mrp) animais, respectivamente. Apesar disso, os parâmetros observados voltaram à normalidade em aproximadamente 15 minutos após a biopsia.

Com relação a alterações no aparelho respiratório, foi observada tosse espontânea em seis (6/20 - 30%) animais. Anormalidades no padrão respiratório ocorreram em 3 (3/20 - 15%) ovinos, sendo que dois deles apresentaram dispnéia inspiratória e um animal apresentou expiração em dois tempos, o que geralmente é característico de dor. À auscultação pulmonar, foi observado aumento do ruído broncobronquiolar no sítio da biopsia, em três (3/20 - 15%) animais. Os dois ovinos que demonstraram forte resistência à execução do procedimento apresentaram, à auscultação pulmonar no local da biopsia, um som característico de vazamento de ar, exatamente sobre o local da punção, embora sem haver saída de ar para o exterior.

Um animal entrou em colapso imediatamente após a realização da biopsia, vindo a decúbito. Este animal apresentou tosse, taquicardia, taquipnéia, intensa dispnéia inspiratória e posicionou-se em posição ortopneica, demonstrando grande dificuldade respiratória. A auscultação pulmonar deste animal revelou aumento do ruído broncobronquiolar por toda área dos pulmões. Apesar disso, o animal levantou em alguns minutos e não apresentou mais nenhuma anormalidade. Nenhum dos animais apresentou hemoptise, epistaxe ou mesmo sinais clínicos compatíveis com hemotórax ou pneumotórax, complicações comumente associadas à biopsia pulmonar.

Os animais foram abatidos, em média, três horas após a realização da biopsia pulmonar. No exame *pos mortem* observou-se que todas as punções estavam localizadas no lobo diafragmático. Das 20 biopsias realizadas, as alterações encontradas na pleura parietal e músculos intercostais eram evidenciados como um ponto em 12 carcaças (12/20 - 60%); em outras quatro (4/20 - 20%) as lesões tinham até 4 mm de comprimento; foram evidenciadas como grandes hematomas de até 8mm X 10mm em quatro carcaças (4/20 - 20%). Todos os animais apresentaram hemorragia de pleura, cuja área variou de 4 mm² a 40 mm². Dos 20 animais biopsiados, avaliados quanto ao escore de severidade da hemorragia pleural proposto por Silva (2005), adaptado de Braun et al. (1999), oito ovinos (8/20 - 40%) apresentaram escore 1, seis (6/20 - 30%) apresentaram escore 2 e outros seis animais (6/20 - 30%) apresentaram escore 3. Ao exame macroscópico dos pulmões foram observados petéquias e enfisema ao redor da ferida da biopsia, presentes em quatro (4/20 - 20%) e cinco (5/20 - 25%) ovinos, respectivamente. Dois animais, mais precisamente

os que demonstraram forte resistência durante a execução da biópsia, apresentaram uma ferida linear de aproximadamente 12 mm e 14 mm, respectivamente, na face costal do pulmão direito na região basal do lobo diafragmático. No pulmão de dois ovinos foi observado sinais de que a agulha de biópsia havia transpassado o lobo diafragmático.

Os fragmentos teciduais obtidos através da biópsia variaram de 4 a 17 mm de comprimento (MED = 10 mm). Das 20 amostras obtidas 18 (18/20 – 90%) eram de tecido pulmonar e duas (2/20 – 10%) eram de tecido hepático. Todas as amostras de pulmão (18/18 – 100%) estavam adequadas para análise histopatológica por apresentarem arquitetura pulmonar preservada. Quatorze amostras (14/18 – 78%) foram consideradas ideais para avaliação histológica, pois foi possível observar bronquíolos primários, terminais e respiratórios, ductos e sacos alveolares bem como alvéolos isolados. Em 4 amostras (4/18 – 22%) não foi possível encontrar bronquíolos, estando ausentes inclusive os bronquíolos terminais. Nestas lâminas estavam presentes apenas ductos e sacos alveolares e alvéolos isolados e por isso foram classificadas apenas como boas para uma avaliação histológica. Duas amostras (2/18 – 11%) apresentaram infiltrado inflamatório misto discreto, composto por mononucleares e neutrófilos. Dois fragmentos (2/18 – 11%) teciduais apresentaram focos hemorrágicos isolados (Figura 1).

Um dos fragmentos pulmonares (1/18 – 5%) apresentou aumento da celularidade do interstício e conseqüente espessamento, com infiltrado inflamatório misto moderado, composto por mononucleares e eosinófilos, além de focos hemorrágicos. A luz bronquiolar mostrou-se diminuída, com presença de debris celulares. A pleura, observada em uma das extremidades da biópsia, exibiu espessamento. Esses achados são compatíveis com o diagnóstico de pneumonia intersticial crônica (Figura 1).

Todas as amostras de pulmão obtidas (18/18 – 100%) mostraram áreas atelectásicas nas extremidades e duas amostras (2/18 – 11%) apresentaram também esmagamento tecidual com comprometimento de parte da área amostrada, todavia nenhuma dessas alterações comprometeu a avaliação morfológica. Em cinco casos (5/18 – 28%), além de pulmão, também foram observados fragmentos de pele, músculo esquelético, fígado ou tecido conjuntivo de origem indeterminada.

A qualidade dos cortes histológicos pulmonares obtidos foram avaliados segundo o escore adaptado de Hopper et al. (1993), que considera os graus zero, um e dois qualitativamente. Levando em conta a adequação tecidual, todas as amostras (18/18 -100%) apresentaram escore 2; com relação a preservação tecidual, duas amostras (2/18 – 11%) apresentaram escore 1 e, 16 amostras (16/8 – 89%) obtiveram escore 2; analisando a presença de artefatos, em todas as lâminas confeccionadas (18/18 – 100%) verificou-se escore 1.

Os resultados para as variáveis SOD, GSH-t, GSH-Px e TBARS obtidos a partir do hemolisado de hemácias de ovinos submetidos à biópsia pulmonar antes e trinta minutos após o procedimento encontram-se resumidos na Tabela 1 e Figuras 2 a 5 (vide também Anexos 2 e 3).

Trinta minutos após a biópsia pulmonar, houve redução estatisticamente significativa nas atividades de SOD e de GSH-Px em hemácias ($p < 0,05$). Não foi verificada alteração significativa nas concentrações de GSH-t e de TBARS em hemácias após o procedimento.

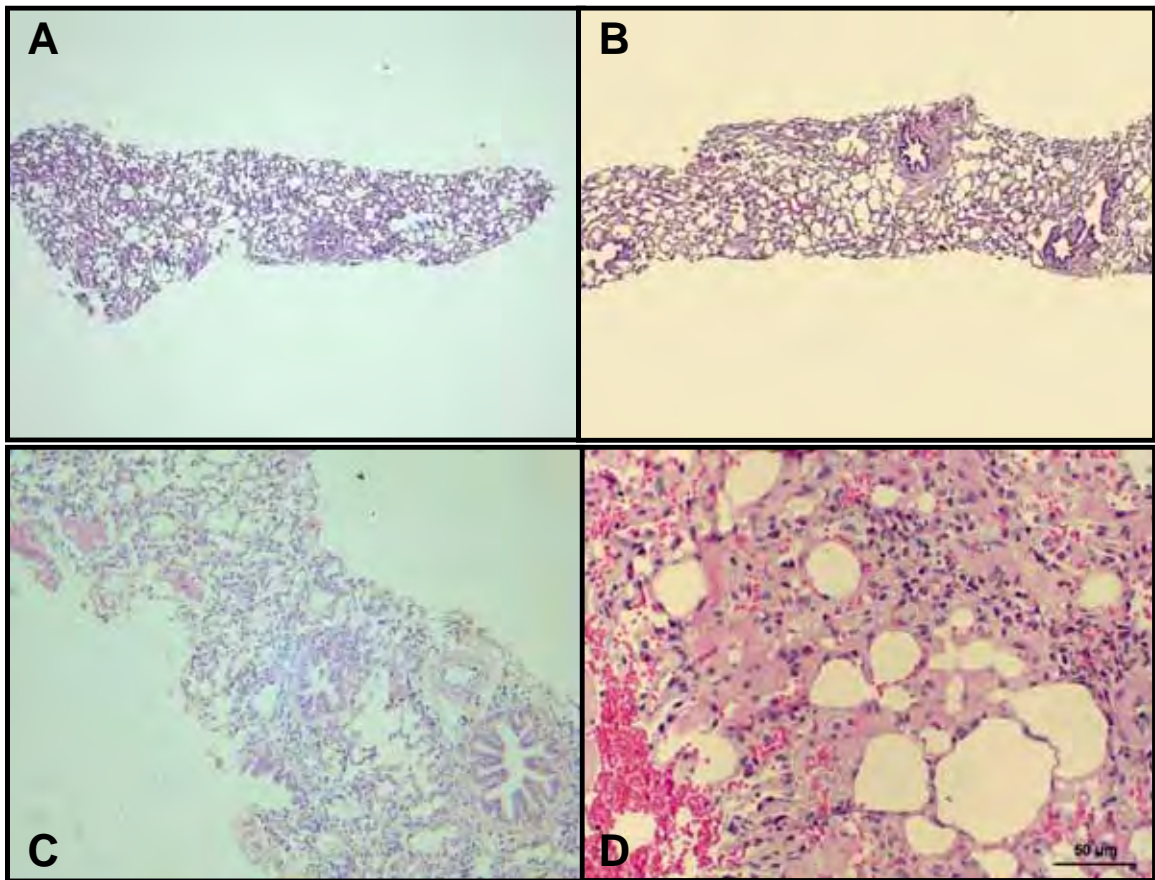


FIGURA 1: Fotomicrografia de cortes histológicos em pulmão de ovino. **A.** visão panorâmica de um fragmento pulmonar mostrando a organização tecidual (H & E, 40x); **B e C.** organização tecidual pulmonar: bronquíolos primários e terminais, ductos e sacos alveolares e alvéolos isolados (H & E, 40x e 100x, respectivamente); **D.** pneumonia intersticial crônica: aumento da celularidade, edema, infiltrado inflamatório misto moderado, composto por mononucleares e eosinófilos, além de focos hemorrágicos (H & E, 400x);

TABELA 1: Representação dos resultados estatísticos descritivos das variáveis Superóxido Dismutase (SOD), Glutaciona Total (GSH-t), Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de ovinos antes e 30 minutos após a biopsia pulmonar.

	VARIÁVEIS	MÉDIA	MEDIANA	MÁXIMO	MÍNIMO	DESVIO PADRÃO
Antes da Biopsia	SOD*	1841,778	1682,294	3202,557	373,729	623,621
	GSH-t	33,895	29,108	75,158	19,041	15,325
	GSH-Px*	0,819	0,745	1,829	0,392	0,397
	TBARS	262,167	252,925	482,858	107,501	110,510
30 Minutos Após a Biopsia	SOD*	1195,937	1072,720	4325,789	537,458	750,333
	GSH-t	33,124	28,443	70,566	21,278	13,703
	GSH-Px*	0,510	0,376	2,454	0,269	0,491
	TBARS	221,978	213,024	423,284	80,626	77,370

* Significativos ao Teste Não-paramétrico de Wilcoxon, considerando $p < 0,05$.

Análise estatística:

VARIÁVEIS	ESTATÍSTICA	COMENTÁRIO
SOD	P = 0,006	AB > DB
GSH-Px	P = 0,001	AB > DB
GSH-t	P = 0,940	AB = DB
TBARS	P = 0,135	AB = DB

AB: antes da biopsia

DB: 30 minutos após a biopsia

GRÁFICO 1: Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Superóxido Dismutase (SOD) em hemácias de ovinos antes da biopsia pulmonar e 30 minutos após o procedimento.

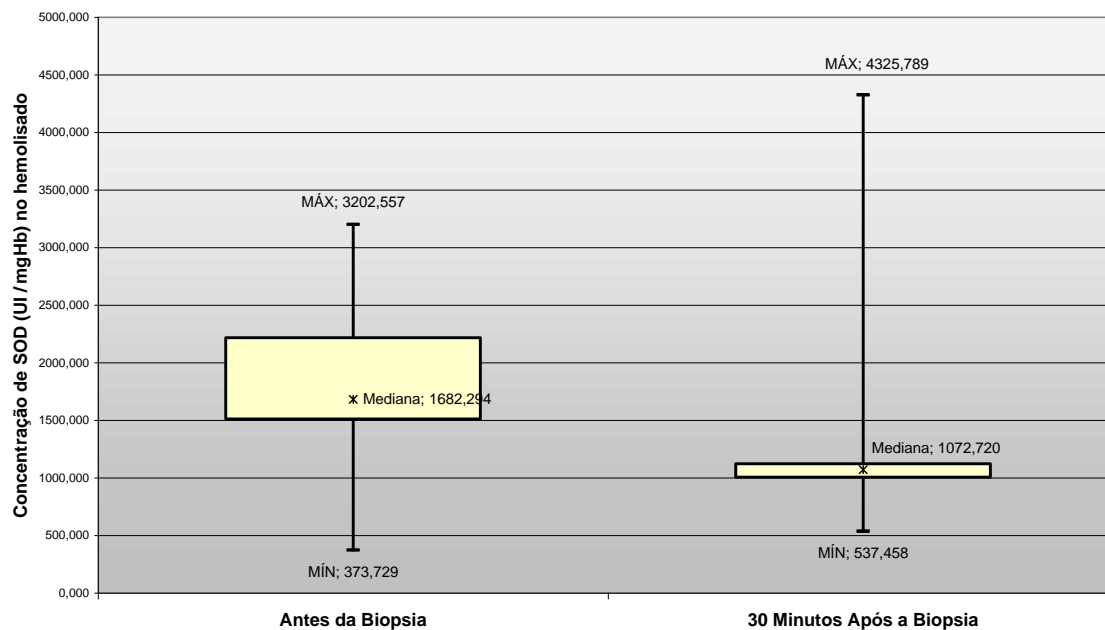


GRÁFICO 2: Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) em hemácias de ovinos antes da biopsia e 30 minutos após o procedimento.

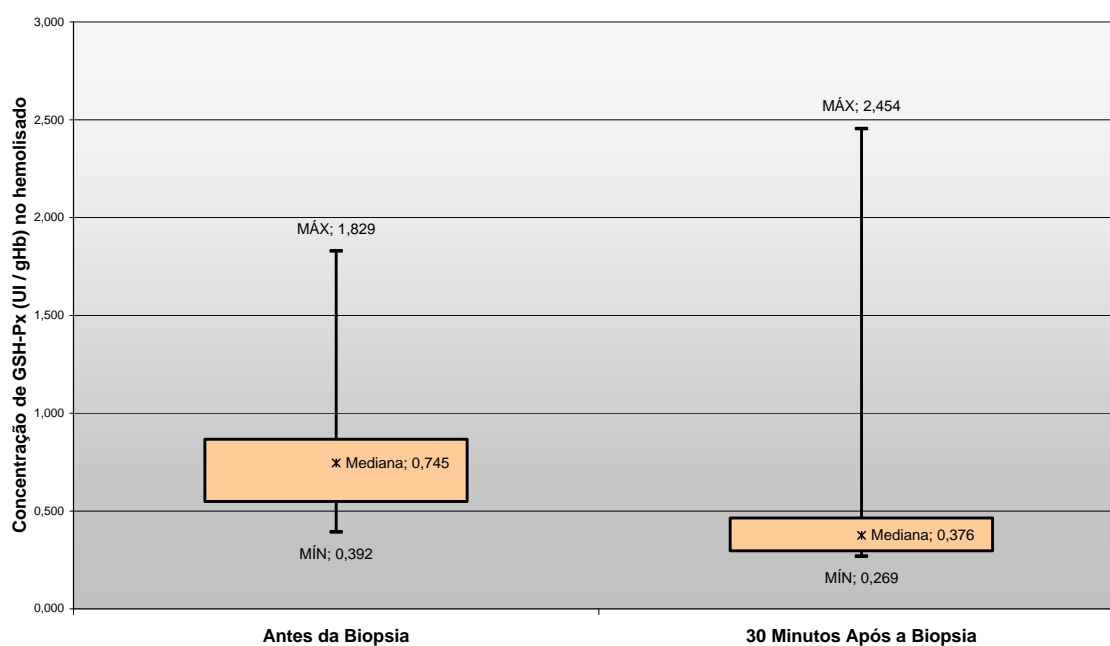


GRÁFICO 3: Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Glutaciona Total (GSH-t) em hemácias de ovinos antes da biopsia e 30 minutos após o procedimento.

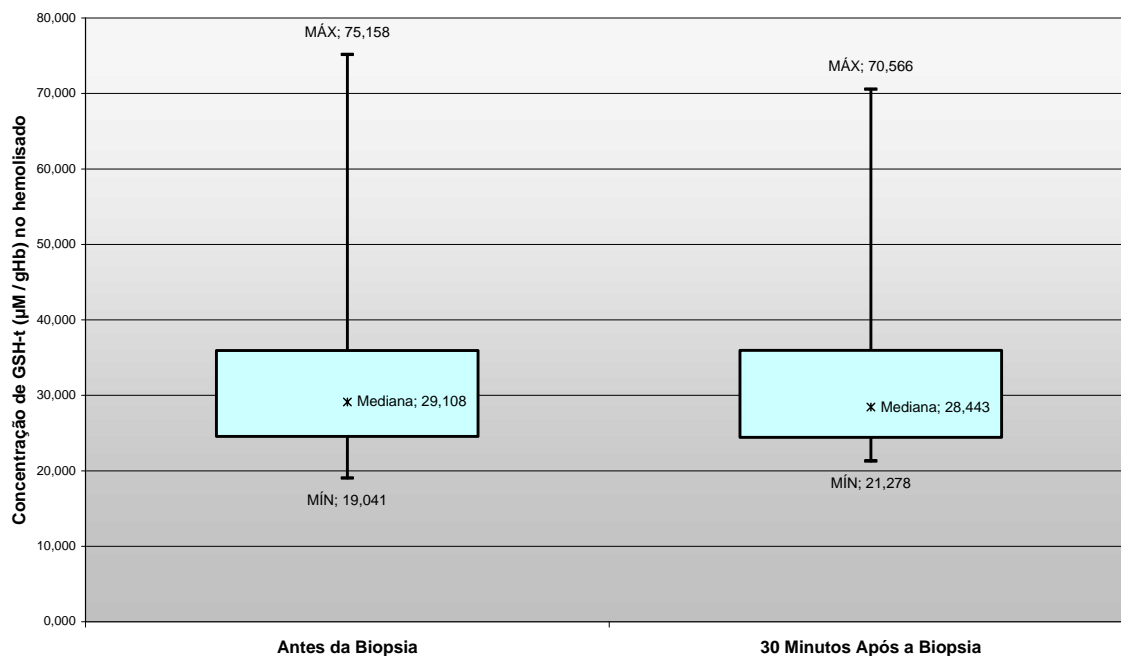
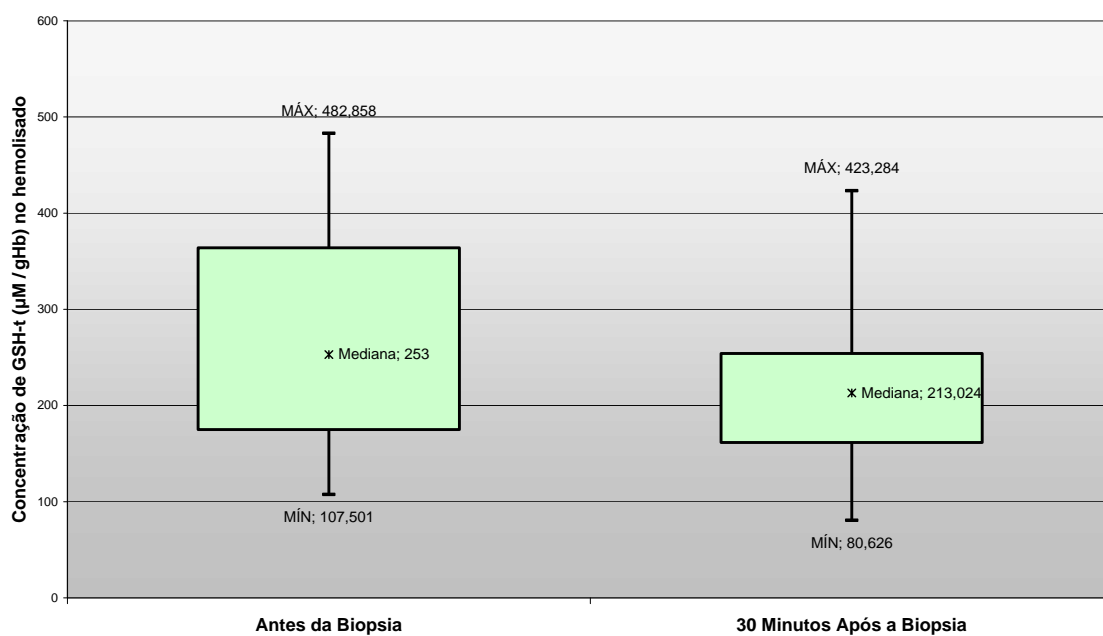


GRÁFICO 4: Mediana e valores Máximo e Mínimo da variável Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de ovinos antes da biopsia e 30 minutos após o procedimento.



6. DISCUSSÃO

A biopsia pulmonar percutânea realizada com agulhas lancetantes demorou para ganhar aceitação, mas o avanço nas técnicas de biopsia, melhorias nas agulhas e a possibilidade de lidar melhor com as complicações decorrentes da técnica contribuíram para o aumento da popularidade desta útil ferramenta de auxílio diagnóstico. Neste estudo, as biopsias pulmonares foram conduzidas às cegas de forma que houvesse máxima probabilidade de se conseguir amostras de tecido viáveis para um diagnóstico histológico quando fosse aplicada em ovinos com doença pulmonar difusa. Se o objetivo do procedimento for obter fragmentos teciduais de lesões localizadas, a biopsia pulmonar deve ser preferencialmente, guiada por ultra-som ou radiografias, como já relatado por outros autores (WOOD et al., 1998; BRAUN et al., 2000).

Foram necessárias em média 1,8 tentativas até a obtenção de um fragmento de tecido viável para análise histológica. Outros autores relatam resultados semelhantes, com média de 1,2 para Braun et al. (2000) que também utilizaram uma agulha semi-automática em ovinos, e de 1,3 para Hamarati (1995) que utilizou um dispositivo automático em humanos. Porém, nestes dois casos as biopsias não foram realizadas às cegas. A execução da biopsia pulmonar às cegas aumenta o risco de complicações como punção equivocada de outros órgãos, lesões de grandes vasos e morte em consequência de hemorragias. No presente estudo foram necessárias poucas perfurações para a obtenção de amostras de tecido viáveis para um exame histológico e não foram observadas complicações graves em decorrência da técnica, indicando que, nestas condições, o 7º espaço intercostal é um bom acesso para a cavidade torácica em ovinos, especialmente quando se pretende obter amostras do lobo diafragmático.

Segundo Moore (2005) e Braun et al.(1999) as reações de desconforto e dor ocorrem durante a perfuração da pleura parietal e não durante a coleta do tecido pulmonar. Por isso, a perfuração da pleura deve ser bem rápida para eliminar a possibilidade de que qualquer movimento repentino desvie a trajetória da agulha ou então que sua ponta cortante lese a pleura antes da colheita de tecido pulmonar. Dois animais deste estudo demonstraram forte resistência à técnica, com reações semelhantes às relatadas em bovinos por

Braun et al. (1999), principalmente no momento da perfuração da pleura. Ao exame *pos mortem* pôde-se observar perfurações lineares de até 14 mm nos pulmões desses ovinos. Embora estivessem anestesiados, é possível que o volume da droga injetado tenha sido insuficiente para uma adequada anestesia da pleura parietal, e que o aumento na quantidade de anestésico administrado possa reduzir a dor desta perfuração, como já foi relatado para eqüinos (RAPHAEL e GUNSON, 1981) e bovinos (BRAUN et al., 1999). Outra opção para evitar reações bruscas dos animais que possam atrapalhar o bom andamento da técnica seria o uso de sedativos. Contudo, antes da indicação deste tipo de fármaco é necessária uma avaliação minuciosa da função pulmonar dos animais, geralmente comprometida em casos de doença respiratória grave.

As alterações observadas ao exame clínico conduzido após a biopsia pulmonar estão de acordo com as descrições prévias da literatura (RAPHEL e GUNSON 1981; SAVAGE et al., 1998; BRAUN et al., 1999; BRAUN et al., 2000; SILVA, 2005). O aumento das freqüências cardíaca e respiratória, observadas em alguns animais, deve ter ocorrido em conseqüência ao estresse da contenção e da realização do procedimento, visto que esses parâmetros voltaram à normalidade dentro de poucos minutos após a realização da biopsia.

Com relação ao exame do aparelho respiratório, a elevação do ruído broncobronquiolar provavelmente ocorreu em decorrência do esforço físico de alguns animais ao resistirem à execução da biopsia. A dispnéia inspiratória, observada em dois animais, poderia ser resultado da agressão da agulha ao tecido pulmonar, o que pode determinar um sangramento no parênquima pulmonar (RADOSTITS et al., 2002). Entretanto, nenhum dos animais que apresentaram dispnéia inspiratória após o procedimento apresentou focos hemorrágicos na avaliação histológica da amostra obtida. Por outro lado, uma hemorragia focal, como foi observado, não seria suficiente para causar alteração no padrão respiratório. Pode-se deduzir que a biopsia não determina grande modificação na estrutura pulmonar, mas que o ato de contenção associado com a dor conseqüente à perfuração pleural poderia levar à dispnéia inspiratória observada nesses dois animais. Se esses dois ovinos apresentassem problema decorrente da lesão provocada pela biopsia

provavelmente haveria manutenção da dificuldade respiratória, o que não foi observado já que todos os animais voltaram ao seu padrão respiratório normal em aproximadamente quinze minutos após o procedimento, indicando a segurança da técnica.

A auscultação pulmonar do sítio da biopsia revelou, em dois animais, um ruído semelhante a vazamento de ar (sopro). Este tipo de ruído provavelmente ocorreu pela perfuração da pleura visceral e do tecido pulmonar subjacente com saída de ar para a cavidade pleural, já que esses animais foram os que apresentaram maior resistência ao procedimento. A entrada de ar na cavidade pleural pode levar a um pneumotórax, se a capacidade de absorção pleural for ultrapassada (PORTO, 1991). Como não foi feito diagnóstico por acompanhamento radiográfico (BRAUN et al. 1999; VENNER et al., 2006) ou por uma auscultação seriada algumas horas após a biopsia, já que os animais precisavam ser abatidos, o pneumotórax não pode ser constatado.

O motivo para o colapso momentâneo ocorrido logo após a biopsia pulmonar em um dos animais não foi determinado, embora reações como essa já tenha sido relatada por outros autores em bovinos, também sem causa aparente (BRAUN et al., 1999). Contrariando observações de outros autores que apontam a hemoptise e a epistaxe como complicações normalmente associadas à biopsia pulmonar (RAPHEL e GUNSON, 1981; SAVAGE et al., 1998; DeBERRY et al., 2002; SILVA, 2005; VENNER et al., 2006), não foram observados nesta pesquisa sinais de sangramento em nenhum dos animais após o procedimento. Entretanto, Venner et al. (2006) relatam que indícios de hemorragia são geralmente evidenciados após endoscopia, mesmo em animais que não apresentaram sinais aparentes de sangramento. Neste estudo, o exame *pos mortem* não revelou estrias de sangue ou coágulos no trato respiratório de nenhum dos animais, o que elimina as chances de que hemorragias de grande porte tenham realmente ocorrido. Contudo, foram observadas petéquias próximas ao local da punção nos pulmões de dois ovinos, indicando que pequenas hemorragias no parênquima pulmonar sem importância clínica ocorreram em consequência da biopsia, como já observado por outros autores (ROY e LAVOIE, 2003).

As hemorragias de pleura visceral ocorreram em todos os ovinos, sendo semelhantes às previamente relatadas em outros estudos (BRAUN et al., 1999;

BRAUN et al., 2000; SILVA, 2005; VENNER et al., 2006). Essas hemorragias foram agrupadas de acordo com o escore atribuído a área total das lesões. O escore de lesão adotado para a biopsia neste estudo foi inferior aos resultados descritos por Silva (2005) e superiores aos de Braun et al. (1999). Silva (2005) trabalhou com uma agulha de biopsia de grosso calibre, o que provavelmente ocasionou maior dano tecidual que a agulha de médio calibre utilizada no presente trabalho. Braun et al. (1999), por sua vez, determinou o escore da lesão 10 dias após a realização da biopsia, havendo, dessa forma, tempo hábil para reparação tecidual. As feridas lineares de até 14 mm observadas no parênquima pulmonar de dois ovinos ocorreram provavelmente em consequência da agitação demonstrada por esses animais no momento da biopsia.

Os tamanhos dos fragmentos teciduais obtidos neste estudo estão de acordo com as descrições prévias da literatura (BRAUN et al., 1999; BRAUN et al., 2000; SILVA, 2005). A técnica empregada permitiu a avaliação da arquitetura tecidual pulmonar. Uma biopsia é considerada representativa quando são visualizadas unidades funcionais do tecido amostrado (NAYLOR et al., 1992). Neste estudo foi possível observar em aproximadamente 80% das amostras obtidas, bronquíolos primários, terminais e respiratórios, ductos e sacos alveolares, bem como alvéolos isolados. Resultados semelhantes também foram observados em eqüinos (RAPHEL e GUNSON, 1981; VENNER, 2006), bovinos (DUNGWORTH e HOARE, 1970; BRAUN et al., 1999) e ovinos (BRAUN et al., 2000). Não foi possível verificar a presença de brônquios nas amostras obtidas devido a provável ausência dessas estruturas no local onde foi realizada grande parte das punções, a porção basal do lobo diafragmático.

Duas amostras apresentaram perfil histológico compatível com processo inflamatório muito discreto, composto por mononucleares e neutrófilos. Uma possível explicação para esse achado é que, se estes animais realmente apresentavam doença respiratória, o processo ainda estava muito incipiente para ser detectado ao exame clínico. Como os animais desta espécie, devido as condições de manejo a que são submetidos, vivem constantemente expostos a fatores de risco, é aceitável que achados como este ocorram quando se realiza biopsia pulmonar. Os focos hemorrágicos encontrados em

duas lâminas foram conseguintes ao trauma tecidual provocado pela agulha de biopsia (RAPHEL e GUNSON, 1981).

Um dos animais apresentou perfil histológico de pneumonia intersticial crônica, entretanto, ao exame clínico não foram observadas alterações compatíveis com o quadro apresentado. Isto provavelmente ocorreu por que as partes não afetadas do pulmão compensaram a insuficiência funcional das áreas lesionadas, fazendo com que o animal se mantivesse clinicamente estável.

Artefatos iatrogênicos estavam presentes em todas as biopsias. O mais comum foram as áreas de atelectasia presentes nas bordas teciduais. Este tipo de artefato dificulta a avaliação histológica e geralmente ocorre em função do trauma tecidual ocorrido (RAPHEL e GUNSON, 1981). A presença de outros tecidos compactos junto às amostras de tecido pulmonar, observadas neste estudo (5/18), também foi descrita por outros autores (RAPHEL e GUNSON, 1981; BRAUN et al., 2000). A desvantagem de se encontrar tecidos maciços junto ao pulmão é que o parênquima pulmonar, por ser menos compacto, tende a colapsar e ficar comprimido entre esses tecidos mais densos (RAPHEL e GUNSON, 1981).

A biopsia acidental do fígado ocorreu duas vezes neste estudo. Outros autores já relataram punção de músculos intercostais (VENNER et al., 2006), intestino (SAVAGE et al., 1998) e fígado (FOROUDI et al., 1995; VENNER et al., 2006). Segundo Smith (1994), a agulha de biopsia deve avançar cerca de 2 cm no interior do parênquima pulmonar para que seja obtida uma amostra satisfatória de tecido pulmonar. Harrison et al. (1984) defendem que a penetração máxima da agulha no interior dos pulmões deve ser de 3 cm ou 4 cm. Neste estudo a biopsia foi realizada segundo a técnica de Finn-Bodner & Hathcock (1993) e Braun et al. (1999) para bovinos adultos. A indicação desses autores é de que a agulha penetre no máximo 8 cm no interior da cavidade torácica a partir de incisão na pele do animal. Silva (2005) executou a mesma técnica em bezerras, obtendo sucesso. Durante as coletas não foram feitas mensurações para saber com exatidão quantos centímetros a agulha de biopsia penetrou a cavidade torácica, apenas foi feita uma marcação na agulha para assegurar que esta não penetrasse mais que 8 cm. Apesar da técnica ter sido conduzida com sucesso em 18 das 20 tentativas realizadas neste estudo,

ficou evidente a necessidade de padronização da profundidade de penetração da agulha na cavidade torácica na espécie ovina, evitando assim a punção equivocada de outros órgãos.

Além da segurança da biopsia pulmonar, o presente estudo investigou o efeito do procedimento sobre o metabolismo oxidativo, utilizando marcadores bioquímicos, dos eritrócitos de ovinos clinicamente saudáveis antes e 30 minutos após a biopsia pulmonar.

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de EROs e a presença dos agentes antioxidantes (KIRSCHVINK e LEUKEUX, 2005; VALKO et al., 2007). Na tentativa de conter e minimizar os efeitos do estresse oxidativo, inicialmente, a SOD catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e oxigênio (O_2). A produção do H_2O_2 por sua vez é neutralizada pela ação da CAT e/ou por uma sucessão de reações mediadas pelas glutatona, denominado ciclo redutor das glutatona. Neste ciclo o H_2O_2 é reduzido por ação da GSH-Px, que utiliza a GSH como substrato doador de elétron, transformando-a em GSSG. Uma vez oxidada, a GSSG é convertida novamente em GSH pela ação da GSH-Rd. O ciclo redutor das glutatona é também o principal mecanismo de remoção dos lipoperoxídeos oriundos das reações de lipoperoxidação (KINNULA e CAPRO, 2003; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; KINULLA, 2005).

O $O_2^{\cdot-}$ liberado em consequência da biopsia pulmonar acarretou uma redução nos valores da SOD 30 minutos após o procedimento. Como esta enzima representa a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, a sua atividade enzimática alterou-se na tentativa de neutralizar os efeitos deletérios deste radical.

Em função da variação na concentração de H_2O_2 provocada pela ação da SOD, a atividade enzimática da GSH-Px também se alterou, indicando que houve ativação do ciclo redutor da glutatona. Contudo, apesar da diminuição na atividade enzimática da GSH-Px, a GSH-t permaneceu inalterada mesmo após o procedimento, demonstrando que o estresse oxidativo induzido pela biopsia pulmonar foi contido por ação das glutatona. Cabe ressaltar também que a manutenção dos níveis de GSH-t se deve ao fato de que a glutatona em maior concentração na maioria das células, inclusive nos eritrócitos de mamíferos, está sob a forma reduzida (GSH). A depleção dos níveis de GSH

pode ocorrer diretamente, por conjugação com radicais livres e, indiretamente por inibidores da sua síntese e regeneração (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Como o consumo de GSH provavelmente ocorreu apenas por sua propriedade antioxidante, a permanência de altas concentrações de GSH nos eritrócitos contribuiu para a manutenção dos níveis de GSH-t mesmo após a biopsia pulmonar. Aliado a isso, a manutenção dos valores de GSH-t pode ter ocorrido também em função do aumento compensatório na produção de GSH por outros órgãos, como o fígado, na tentativa de ajudar o organismo a combater o aumento na produção das EROs (MACHEFER et al., 2004).

O MDA é um dos principais marcadores da peroxidação lipídica e através dele são mensuradas as TBARS. O acréscimo na concentração sanguínea dessas espécies está relacionado ao aumento da peroxidação lipídica e dano oxidativo (DRAPER e HADLEY, 1990). Neste contexto, os dados deste experimento revelam que a biopsia pulmonar transtorácica percutânea não induziu a peroxidação lipídica, confirmado pela não alteração dos valores de TBARS nas hemácias dos animais 30 minutos após o procedimento.

As reações inflamatórias locais são caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, dilatação dos vasos e acúmulo de células do processo inflamatório. As principais células envolvidas na fase aguda da inflamação são os neutrófilos, enquanto que, na fase tardia, monócitos/macrófagos e algumas linhagens de linfócitos migram para o sítio inflamatório. Essas células produzem EROs durante a explosão respiratória como reação aos estímulos fagocíticos. Além disso, vários aspectos do processo inflamatório são regulados por mediadores produzidos por células do sistema imune e células endoteliais, como citocinas, histamina, leucotrienos, prostaglandinas e, também, EROs (HUERRE e GOUNON, 1996).

A atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT é comumente utilizada para avaliar a capacidade de defesa do organismo contra a ação das EROs. Alguns autores sugerem que o aumento da produção de citocinas durante a fase inicial do processo inflamatório está associado com a atividade prejudicada das enzimas SOD, GSH-Px e CAT, o que resulta em aumento do estresse oxidativo e dano celular local, verificado pelo incremento da apoptose celular (LINKE et al. 2005). A agressão física tecidual ocorrida durante a

introdução da agulha de biópsia deflagrou a resposta inflamatória e a liberação de mediadores químicos, exacerbando a mesma nos momentos que se seguiram. Essa seqüência de eventos culminou em dano oxidativo refletido na diminuição nos níveis de SOD e GSH-Px no sangue dos animais, evidenciada 30 minutos após o procedimento.

Segundo MCINTYRE et al. (1997), a extensão dos eventos inflamatórios e das injúrias eventualmente provocadas por eles está diretamente relacionada à intensidade do estímulo inicial e aos mecanismos imunológicos que são ativados durante o processo. Como o estresse oxidativo induzido pela biópsia pulmonar foi aparentemente contido pelo ciclo redutor das glutatonas e não houve sinais de peroxidação lipídica até 30 minutos após a execução do procedimento, dentro deste contexto, os resultados deste estudo nos levam a crer que a biópsia pulmonar transtorácica percutânea é um exame seguro, podendo ser amplamente utilizada na rotina veterinária.

Alguns autores defendem que, para uma melhor interpretação dos resultados de estudos que envolvem estresse oxidativo, outros fatores tais como o tipo de marcador utilizado, a metodologia empregada, o tecido estudado e, principalmente, o momento no qual o marcador foi investigado, sejam criteriosamente considerados (WITT et al., 1992; VOLLARD et al., 2005). Panza (2007) trabalhou com humanos submetidos a exercício intenso e não observou alterações nos níveis de TBARS no sangue de humanos até 15 minutos após esforço. Goldfarb et al. (2005), ao submeter humanos ao exercício físico intenso, só verificaram aumento na concentração plasmática de MDA 48h após a realização de um protocolo de exercício intenso. Portanto, o fato de que sinais de peroxidação lipídica não tenham sido observados, com base no marcador utilizado, até 30 minutos após a biópsia pulmonar, não exclui a possibilidade de que a peroxidação lipídica tenha ocorrido em outro momento durante a recuperação dos animais.

O mesmo pode ser considerado para os agentes antioxidantes. Existe a possibilidade de mudanças transitórias e bifásicas na atividade enzimática (DNEKE e FANBURG, 1989; MILLS e HIGGNS, 1997; DAMASCENO et al., 2002), evidenciada por um decréscimo inicial por consumo das enzimas antioxidantes viáveis, seguido por elevação devido à mobilização dos estoques

em outros órgãos, como mecanismo compensatório à constante exposição ao estresse oxidativo aumentado.

Com base nessa conjectura, talvez uma avaliação seriada e mais duradoura das atividades enzimáticas de SOD e de GSH-Px e das concentrações de GSH-t e de TBARS revelasse alterações compatíveis com estresse oxidativo mais intenso e peroxidação lipídica ainda ocultos 30 minutos após o procedimento.

7. CONCLUSÃO

Conforme os resultados demonstrados neste trabalho e com a metodologia utilizada podemos concluir:

- A biopsia pulmonar transtorácica percutânea mostrou-se um método de diagnóstico complementar seguro para obtenção de amostra de tecido pulmonar.
- A biopsia pulmonar transtorácica percutânea permite a obtenção de fragmentos pulmonares adequados para o exame histopatológico, com visualização de estruturas pulmonares íntegras.
- O acesso ao pulmão através do sétimo espaço intercostal direito, 5 cm acima do olecrano, mostrou-se adequado para a obtenção de amostras pulmonares em cordeiros sadios.
- A biopsia pulmonar transtorácica percutânea não causou alterações significativas no metabolismo oxidativo, medido por determinação de SOD, GSH-Px, GSH-t e TBARS, podendo ser amplamente utilizada em ovinos sem que ocorram danos teciduais expressivos até 30 minutos após o procedimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JÚNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A., ANDRADE, D.R. *J. Brás. Pneumol.*, v.31, n. 1, p. 60-68, 2005.

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

BRAUN, U.; ESTERMANN, U.; FEIGE, K.; SYDLER, Y.; POSPISCHIL, A. Percutaneous lung biopsy in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.215, n.5, p.679-681, 1999.

BRAUN, U.; ESTERMANN, U.; FLÜCKIGER, M.; SYDLER, T.; POSPISCHIL, A. Ultrasound-guided percutaneous lung biopsy in sheep. *Vet. Rec.*, v.146, n.18, p.525-528, 2000.

CANZIAN, M.; SOEIRO, A.M.; TAGA, M.F.L.; BARBAS, C.S.V.; CAPELOZZI, V.L. Correlation between surgical lung biopsy and autopsy findings and clinical data in patients with diffuse pulmonary infiltrates and acute respiratory failure. *Clinics*, v.61, n.5, p.425-432, 2006.

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

COMHAIR, S.A.A.; XU, W.; GHOSH, S.; THUNNISSEN, F.B.J.M.; ALMASAN, A.; CALHOUN, W.J.; JANOCHA, A.J.; ZHENG, L.; HAZEN, S.L.; ERZURUM, S.C. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am. J. Pathol.*, v.166, n.3, p.663-674, 2005.

CUTLIP, R.C.; BROGDEN, A.K.; LEHMKUHL, H.D. Changes in the lungs of lambs after intratracheal injection of lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* A1. *J. Com. Path.*, v.118, p.163-167, 1998.

DAHLGREN, S.; NORDENSTROM, B. *Transthoracic Needle Biopsy*. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1963. 132p.

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

DEATON, C.M.; MARLIN, D.J.; SMITH, N.C.; HARRIS, P.A.; SCHROTER, R.C.; KELLY, F.J. Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *J. Nutrition*, v.134, p. 2065S-2067S, 2004.

DeBERRY, J.D.; NORRIS, C.R.; SAMII, M.V.F.; GRIFLEY, S.M.; ALMY, F.S. Correlation between fine-needle aspiration cytopathology and histopathology of the lung in dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.38, p.327-336, 2002

DENEK, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.*, v.257, p.L163-L173, 1989.

DOUCET, M.Y.; VIEL, L. Clinical, radiographic, endoscopic, bronchoalveolar lavage and lung biopsy findings in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Can. Vet. J.*, v.43, p.195-202, 2002.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, v. 186, p.421-431, 1990.

DUNGWORTH, D.L.; HOARE, M.N. Trepine lung biopsy in cattle and horses. *Res. Vet. Sci.*, v.2, p. 244-246, 1970.

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

FERREIRA, A.L.A.; MACHADO, P.E.A.; MATSUBARA, L.S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.6, p.689-694, 1999.

FINN-BODNER, S.T.; HATHCOCK, J.T. Image-guided percutaneous needle biopsy: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.*, v.8, p.258-278, 1993.

FORMAN, J.H.; FISHER, A.B. Antioxidant enzymes of rat granular pneumocytes. *Lab. Invest.*, v.45, n.1, p.1-6, 1981.

FOROUDI, F.; GHEUNG, K. ; DUFLOU, J. A comparison of the needle biopsy post mortem with the conventional autopsy. *Pathol.*, v. 27, p. 79-82, 1995.

GERAGHTY, P.R.; KEE, S.T.; MCFARLANE, G.; RAVAZI, M.K.; SZE, D.Y.; DAKE, M.D. CT-guided transthoracic needle aspiration biopsy of pulmonary nodules: needle size and pneumothorax rate. *Radiology*, v. 229, p.475-481, 2003.

GOLDFARB, A. H.; BLOOMER, R. J.; MCKENZIE, M. J. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 37, n. 2, p.234-239, 2005.

GONÇALVES, R.C. Semiologia do sistema respiratório. In: FEITOSA, F.L. *Semiologia Veterinária*. São Paulo: Roca, 2004. Cap. 7, p.313-331.

GRODE, G.; FAURSCHOU, P.; MILMAM, N. Percutaneous Transthoracic fine-needle lung biopsy with 3 different needles. *Respiration*, v.60, p.284-288, 1993.

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

HAMARATI, L.B. CT-guided automated needle biopsy of the chest. *Am. J. Roentgenol.*, v.165, p.53-55, 1995.

HARRISON, B.D.W.; THORPE, R.S.; KITCHENER, P.G.; McCANN, B.G.; PILLING, J.R. Percutaneous TruCut biopsy in the diagnosis of localized pulmonary lesions. *Thorax*, v.39, p.493-499, 1984.

HOPPER, K.D.; ABENDROTH, C.S.; STURTZ, K.W.; MATTHEWS, Y.L.; STEVENS, L.A.; SHIRK, S.J. Automated biopsy devices: a blinded evaluation. *Radiology*, v.187, p. 653-660, 1993.

HOPPER, K.D.; BAIRD, D.E.; REDDY, V.V.; LANDIS, J.R.; PARKER, S.H.; TYLER, H.N.JR.; OWNBEY, J.L.; MCCAUSLIN, M.A.; YAKES, W.F.; SABATELLI, F.W. Efficacy of automated biopsy guns versus conventional biopsy needles in the pygmy pig. *Radiology*, v.176, p. 615-616, 1990.

HUERRE, M.R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. *Res. Immunol.*, v. 147, p. 417 - 434, 1996.

IKEDA, T.; MURATA, Y.; QUILLIGAN, E.J.; PARER, J.T.; DOI, S.; PARK, S. Brain lipid peroxidation and antioxidant in fetal lambs 72 hours after asphyxia by partial umbilical cord occlusion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.178, p.474-478, 1998.

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

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

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

KIRSCHIVIK, N.; LEKEUX, P. Oxidants and Airway Inflammations. In: THIRD WORLD EQUINE AIRWAYS SIMPOSIUM, 2005, Nova York. *Anais Eletrônicos...* Nova York: Cornell University, 2005. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/WEAS/2005/toc.asp>> Acesso em: 3 de jul. 2008.

KIRSCHIVINK, N.; FIÉVEZ, L.; BOUGNET, V.; ART, T.; DEGAND, G.; SMITH, N.; MARLIN, D.; ROBERTS, C.; HARRIS, P.; LEKEUS, P. Effect of nutritional supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Vet. J.*, v.34, p.705-712, 2002.

LEYDEN, H. Veber infectiose pneumonie. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, v.9, p.52, 1883.

LINDGREN, P.G. Percutaneous needle biopsy: a new technique. *Acta Radiol.*, v.23, p.653-656, 1982.

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

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

MACMILLAN, M.C.; KLEINE, L.J.; CARPENTER, J.L. Fluoroscopically guided percutaneous fine-needle aspiration biopsy of thoracic lesions in dogs and cats. *Vet. Radiol.*, v.29, p.194-7, 1988.

MALHOTRA, S.P.; REDDY, V.M.; THELITZ, S.; HE, Y.; MCMULLAN, D.M.; REIMER, F.K. The role of oxidative stress in the development of pulmonary

arteriovenous malformations after cavopulmonary anastomosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.124, n.3, p.479-485, 2002.

MARTIN, W.B. Respiratory infections of sheep. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, n.19, p.171-179, 1996.

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

MENETRIER P. Cancer primitive du poumon. *Bull. Soc. Anat.*, v.11, p. 643-647, 1886.

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

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Fundamentos de Robbins & Cotran Patologia*. 7 ed. São Paulo: Elsevier Editora, 2006. 800p.

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

MOORE, E.H. Percutaneous biopsy in lung Cancer. *Semin. Roentgenol.*, v. 40, n.2, p.154-170, 2005.

NAYLOR, J.M.; CLARCK, E.G.; CLAYTON, H.M. Chronic obstructive pulmonary disease: usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can. Vet. J.*, v.33, p.591-598, 1992.

NEFF, T.A. Biopsy procedures. In: FISHMAN, A.P. *Pulmonary diseases and disorders*. New York: McGraw-Hill Book Co., 1980. Cap. 7, p. 451-452.

PANZA, v.s.p. *Efeito do consumo de chá verde no estresse oxidativo em praticantes de exercício resistido Avaliação da técnica de biopsia pulmonar transtorácica em bezerros clinicamente sadios e com broncopneumonia induzida experimentalmente*. 2007. 142p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PORTO, N., Punção biopsia pulmonary transcutânea. In: SILVA, L.C.C. *Compêndio de Pneumologia*. São Paulo: Fundação FYK, 1991. Cap. 5, p. 274-276.

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

PUGH, D.G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*. 1.ed. São Paulo: Roca, 2005. p.528.

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

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

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

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

ROUDEBUSH, P.; GRENN, R.A.; DIGILIO, K.M. Percutaneous fine-needle aspiration biopsy of the lung in disseminated pulmonary disease. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.17, p.109-116, 1981.

ROY, M.F.; LAVOIE, J.P. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. *Vet. Clin. Equine Practice*, v.19, p.1-17, 2003.

SAVAGE, C.J.; TRAUB-DARGTZ, J.L.; MUNFORD, E.L. Survey of the animal diplomates of the American College of Veterinary Internal Medicine regarding percutaneous lung biopsy in the horse. *J. Vet. Intern. Med.*, v.12, p. 456-464, 1998.

SCHNEIDER, C.D; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico, *Rev. Bras. Med. Esporte*, v. 10, n. 4, p. 303 – 313, 2004.

SMITH B.P. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. Vol. 2. 1 ed. São Paulo: Editora Manole, 1994. p.1738.

SILVA, D.P.G. *Avaliação da técnica de biópsia pulmonar transtorácica em bezerros clinicamente saudáveis e com broncopneumonia induzida experimentalmente*. 2005. 75p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SJÖDIN, B.; WESTING, Y.H.; APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.*, v. 10, n. 4, p. 236 – 254, 1990.

SLADE, R.; STEAD, A.G.; GRAHAM, J.A.; HATCH, G.E. Comparison of lung antioxidant levels in humans and laboratory animals. *Am. Rev. Resp. Dis.*, v.131, p.742-746, 1985.

STONE, E.A. Biopsy: principles, technical considerations and pitfalls. *Vet. Clin. North. Am, Small Anim. Pract.*, v.25, n.1, p.33-34, 1995.

TESKE, E.; STOKHOF, A.A.; VAN DEN INGH, T.S.G.A.M.; WOLVEKAMP, W.T.C.; SLAPPENDEL, R.J.; DE VRIES, H.W. Transtoracic needle aspiration

biopsy of the lung in dogs with pulmonic diseases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.27, p.289-294, 1991.

UNVER, E.; YILMAZ, A.; AKSOY, F.; BAYSUNGUR, V.; GENÇ, O.; ALTINSOY, B.; BARAN R. Does needle size affect diagnostic yield of transthoracic needle biopsy in malignant pulmonary lesions? - comparison of 18, 22 e 25 gauge needles in surgical specimens. *Respirology*, v.11, p.648-651, 2006.

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

VENNER, M.; CHIMIDBAUER, S.; DROMMER, W.; DEEGEN, E. Percutaneous Lung Biopsy in the Horse: Comparison of two instruments and repeated biopsy in horses with induced acute interstitial pneumopathy. *J. Vet. Intern. Med.*, v.20, p.968-973, 2006.

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

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

VOLLAARD, N. B. J.; SHEARMAN, J. P.; COOPER, C. E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.*, v. 35, n. 12, p. 1045-1062, 2005.

WAGNER, H.J.; BARTH, P.; BRITTINGER, C.S.; PLEIN, S.; KLOSE, K.J. Postmortem evaluation of four randomly selected automated biopsy devices for

transthoracic lung biopsy. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, v. 18, p.300-306, 1995.

WARNER, A.E. Diagnostic procedures for the respiratory SYSTEM. In: SMITH, B.P. *Large animal internal medicine: diseases of the horses, cattle, sheep and goats*. St Louis: Mosby, 1990. Cap. 16, p.582-94.

WITT, E. H.; REZNICK, A.Z., VIGUIE, C.A., STARKE-REED, P. AND PACKER, L. Exercise, oxidative damage, and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.*, v. 122, p. 766-773, 1992.

WOOD, E.F.; O`BRIEN, R.T.; YOUNG, K.M. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of focal parenchymal lesions of the lung in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.*, v.12, p.338-342, 1998.

WRIGHT, D.T.; COHN, L.A.; HONGFEI, L.; FISCHER, B.; LI. C.M.; ALDER, K.B. Interactions of Oxygen radicals with airway epithelium. *Environ. Health Perspect.*, v. 102, sup. 10, p. 85-90, 1994.

ZAVALA, D.C.; BEDELL, G.N. Percutaneous lung biopsy with a cutting needle. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.106, p.186-193, 1972.

9. ANEXOS

Anexo 1: Plano de exame clínico dos ovinos.

Identificação:				
Raça:	Sexo:	Idade	Escore corporal:	
Proprietário:				
Endereço:				
Telefone:				
Anamnese:				
Alimentação e Mineralização:				
Parâmetros vitais:	FC:	bpm	FR:	mpm
Temp:	°C			
Atitude:	Mucosas:	Linfonodos:	Estado Nutricional:	
Sistema Respiratório:				
Inspeção:				
Muflo:	• normal	• ressecado		
Narinas:	• NDN	<input type="checkbox"/> hiperêmicas		
Secreção	• ausente cor	• presente	<input type="checkbox"/> unilateral	<input type="checkbox"/> bilateral
Ar expirado	• unilateral	• bilateral	odor	
	• normal	• diminuído		
Laringe:	• NDN	• hiperêmica	• paralisia	
Traquéia:	• NDN	• crepitação		
	Reflexo da Tosse:	• negativo	• positivo	• tosse seca
				• tosse produtiva
Pulmão:	Tipo respiratório:	• eupnéia	• dispnéia	• inspiratória • expiratória • mista
Postura:	• normal	• ortopneica		
Auscultação:				
	Crepitação fina	• ausente • presente	• lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	• lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
	Crepitação grossa	• ausente • presente	• lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	• lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
	Ronco	• ausente	• presente	
	Sibilo	• ausente • presente	• lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	• lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
	Som traqueo-brônquico	• NDN • aumentado	• lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	• lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
	Som bronquio-bronquiolar	• NDN • aumentado	• lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	• lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
	Propagação cardíaca	• NDN • aumentado	• lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	• lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
	Área de silêncio:	<input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> ausente	<input type="checkbox"/> lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
	Roce Pleural	<input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> ausente	<input type="checkbox"/> lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
Percussão:	• claro <input type="checkbox"/> timpânico	• sub-maciço <input type="checkbox"/> metálico	<input type="checkbox"/> lado direito <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> lado esquerdo <input checked="" type="checkbox"/>
Observações:				

Anexo 2: Tabela 2.

TABELA 2: Representação das atividades de SOD (UI/mgHb) e GSH-Px (UI/gHb) e das concentrações de GSH-t ($\mu\text{M/gHb}$) e de TBARS (nM/gHb) em hemácias de ovinos antes e 30 minutos após a biópsia pulmonar.

ANIMAL	VARIÁVEIS									
	ANTES DA BIÓPSIA					30 MINUTOS APÓS A BIÓPSIA				
	SOD ¹	GSH-t ²	GSH-Px ³	TBARS ⁴	SOD	GSH-t	GSH-Px	TBARS		
1	3202,557	75,158	1,754	107,501	1123,760	70,566	1,092	80,626		
2	2479,953	50,661	1,192	363,711	1137,343	25,887	0,443	302,236		
3	1506,883	19,041	0,392	138,392	1154,889	27,829	0,383	211,973		
4	1638,735	34,582	0,829	255,016	537,458	24,018	0,278	161,251		
5	2591,648	20,608	0,481	390,292	1005,202	22,166	0,269	151,366		
6	3049,772	27,551	0,500	429,060	1016,093	21,879	0,295	146,830		
7	1897,953	33,482	0,791	277,914	1060,429	21,278	0,312	192,950		
8	1712,743	24,513	0,611	203,298	1035,405	24,407	0,284	232,683		
9	373,729	28,311	0,499	117,930	1116,668	37,280	0,464	351,406		
10	2218,330	69,841	1,829	445,563	4325,789	66,833	2,454	423,284		
11	1651,845	44,075	1,219	482,858	1031,464	47,015	0,521	241,188		
12	1641,119	35,925	0,581	205,229	1042,954	29,057	0,333	143,861		
13	1510,914	24,698	0,548	164,611	971,599	34,664	0,464	254,136		
14	1467,370	22,130	0,571	174,689	1109,268	25,558	0,358	241,877		
15	1640,225	31,919	0,746	277,914	1101,377	25,038	0,282	208,193		
16	1727,925	25,511	0,744	203,547	1085,010	32,976	0,427	214,075		
17	1771,200	32,437	0,867	293,948	983,290	30,873	0,311	202,824		
18	1637,785	24,672	0,606	185,400	1185,720	32,227	0,378	171,909		
19	1398,387	22,889	0,776	250,835	1088,335	35,945	0,472	282,190		
20	1716,480	29,904	0,836	275,627	806,685	26,981	0,374	224,707		

¹ Superóxido Dismutase; ² Glutaciona Total; ³ Glutaciona Peroxidase; ⁴ Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.

Anexo 3: Figuras 6 a 9.

FIGURA 6: Concentrações de SOD em hemácias de ovinos antes da biopsia e 30 minutos após o procedimento.

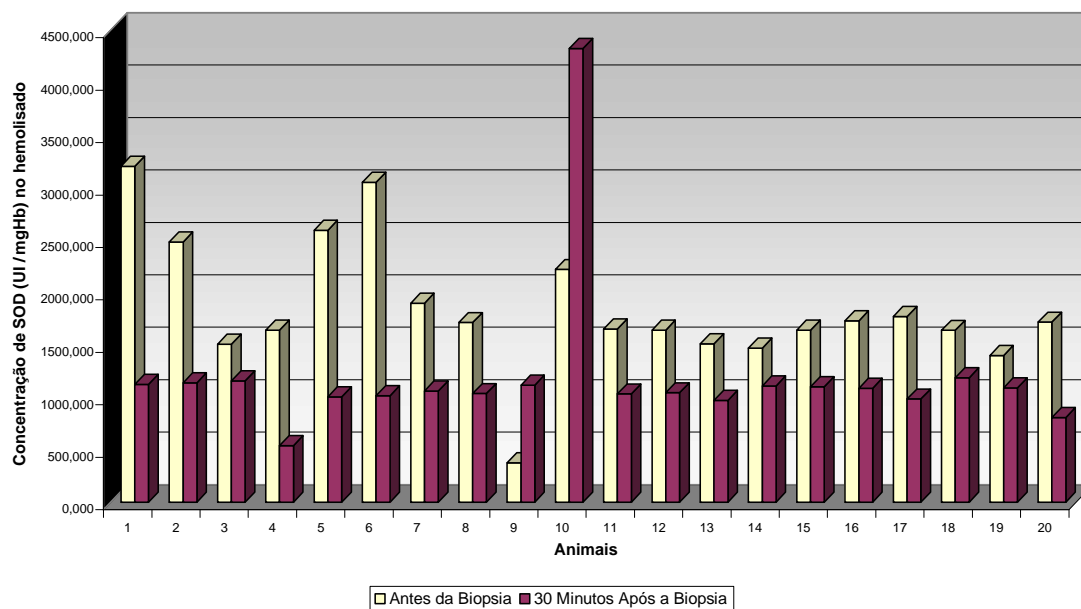


FIGURA 7: Concentrações de GSH-Px em hemácias de ovinos antes da biopsia pulmonar e 30 minutos após o procedimento.

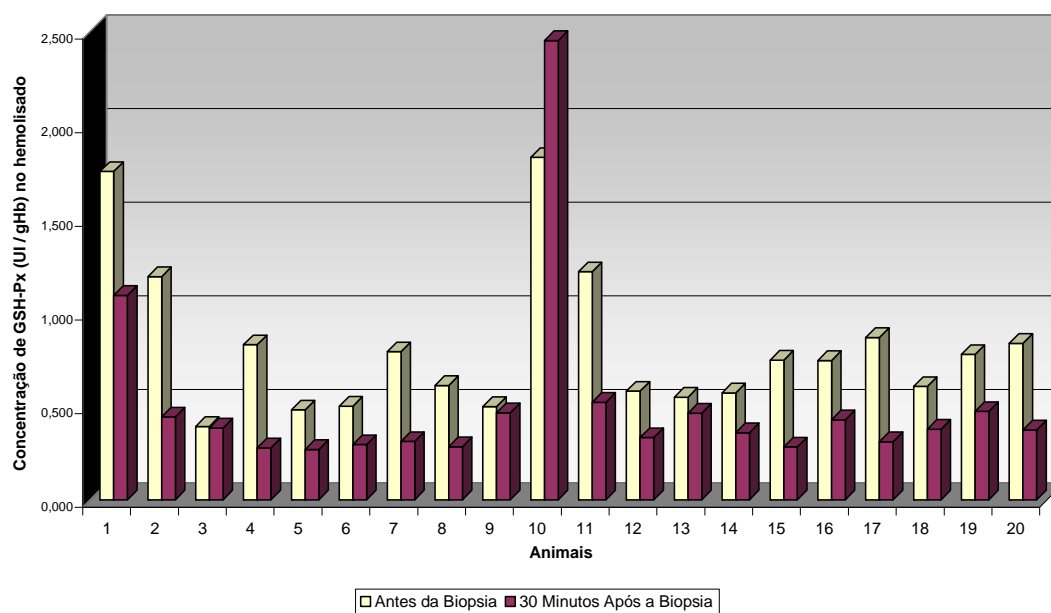


FIGURA 8: Concentrações de GSH-t em hemácias de ovinos antes da biópsia pulmonar e 30 minutos após o procedimento.

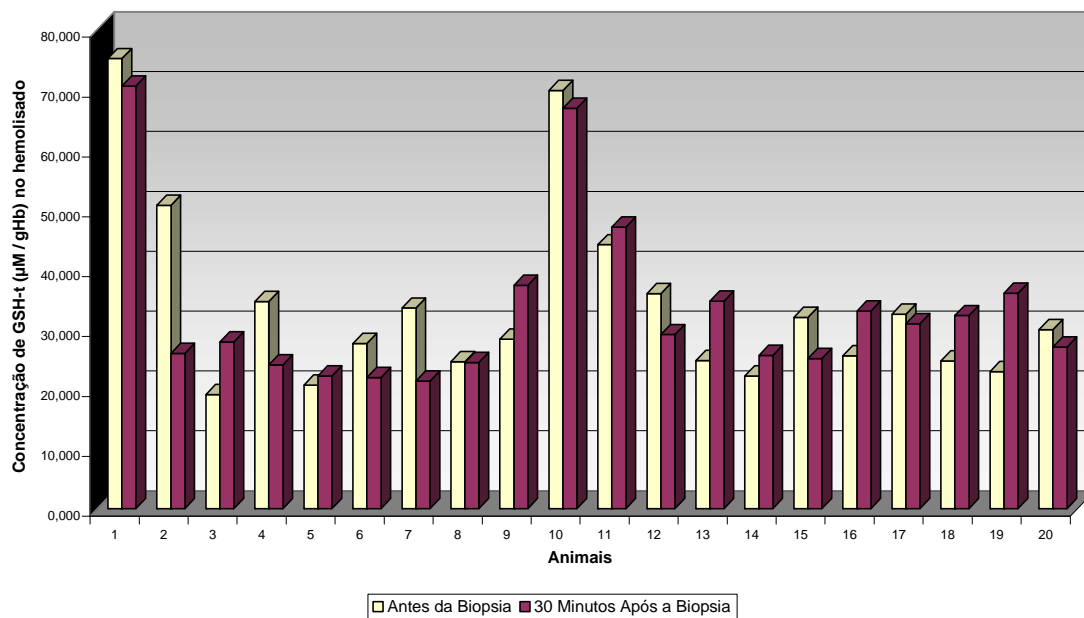
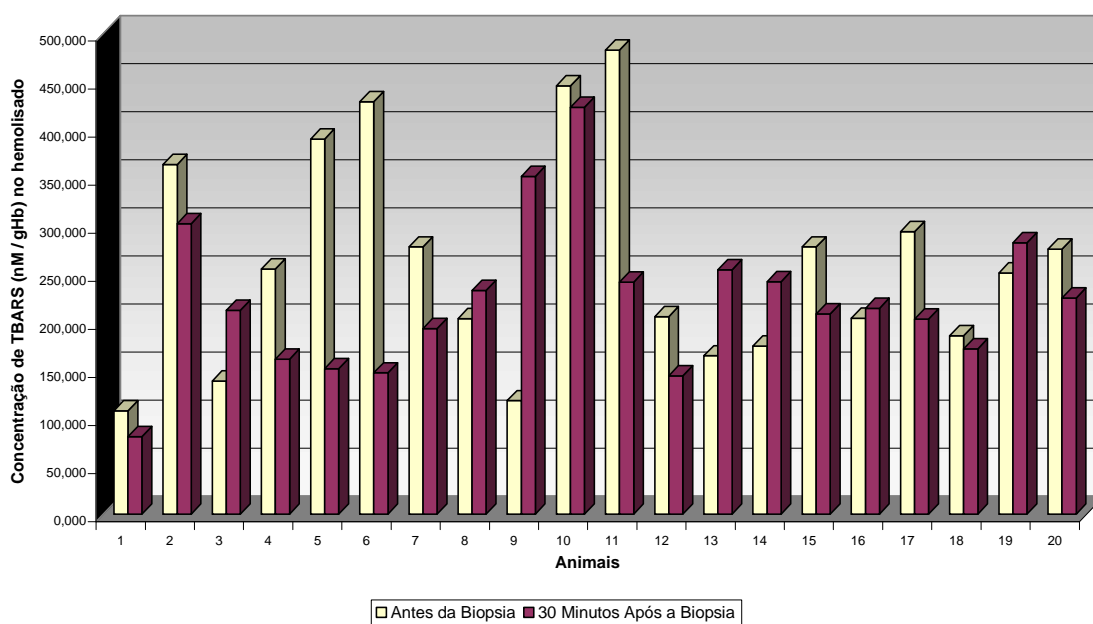


FIGURA 9: Concentrações de TBARS em hemácias de ovinos antes da biópsia pulmonar e 30 minutos após o procedimento.



Artigo: Avaliação da segurança e eficácia da técnica de biópsia pulmonar transtorácica percutânea para avaliação histopatológica do parênquima pulmonar de ovinos clinicamente sadios.

A ser encaminhado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira
ISSN: 0100-736X

Normas para publicação disponível em:
<http://www.scielo.br/revistas/pvb/pinstruc.htm>

Normas para Publicação:

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao [editor](#) da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os [editores](#), com a assistência da [Assessoria Científica](#), reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos e Referências**:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da

revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, *Resumo* e *Abstract* trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

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

e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

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

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

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

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da

revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

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

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Resumo e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

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

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas

incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DA TÉCNICA DE BIÓPSIA
PULMONAR TRANSTORÁCICA PERCUTÂNEA PARA AVALIAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA DO PARÊNQUIMA PULMONAR DE OVINOS
CLINICAMENTE SADIOS⁵**

Andreza Amaral da Silva^{6*}, Danilo Otávio Laurenti Ferreira¹, Camila Dias Porto⁷,
Júlio Lopes Sequeira⁸, Roberto Calderon Gonçalves³

ABSTRACT. - Silva A.A., Ferreira D.O.L., Porto C.D., Sequeira J.L., Gonçalves R.C. 2009. [Evaluation of safety and effectiveness of the transthoracic percutaneous lung biopsy technique for histopathological evaluation of the lung parenchyma in healthy sheep.] Avaliação da segurança e eficácia da técnica de biópsia transtorácica percutânea para avaliação histopatológica do parênquima pulmonar de ovinos clinicamente sadios. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Distrito de Rubião Júnior, S/N - CEP: 18.618-000 - Botucatu/SP – Brasil. E-mail: andrezamedvet@yahoo.com.br

⁵ Dissertação de Mestrado do primeiro autor; auxílio financeiro (processo 07/55341-6) e bolsa de mestrado (processo 07/51713-6) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

⁶ Mestrando (a) do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Botucatu, São Paulo.

Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Distrito de Rubião Júnior, S/N - CEP: 18.618-000 - Botucatu/SP – Brasil. *Autor para correspondência: andrezamedvet@yahoo.com.br

⁷ Doutoranda do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus Botucatu, São Paulo.

⁸ Prof. Ass. Dr. do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus Botucatu, São Paulo.

It was analyzed the results and complications arising from the use of the percutaneous transthoracic lung biopsy technique in 20 clinically healthy sheep. The animals were subjected to clinical examination followed by lung biopsy with a semi-automatic needle in the 7th intercostal space right, 5 cm above the elbow. It was evaluated the number of attempts to implement the procedure and size of the fragments. The samples were evaluated histologically. After the slaughter, a post mortem examination assessed the technical complications and possible injuries. Among all animals underwent biopsy only two did not tolerate the technique. Were obtained Lung fragments from 4 mm to 7 mm and it were required on average 1,8 attempts. The main changes related to the procedure were: cough, labored breathing, increased heart and breathing rate and increased broncobronquiolar noise. The post-mortem examination revealed bleeding of the intercostal muscles and visceral pleura of various sizes in all lambs, and a wound up to 14 mm in the lung of two animals that did not tolerate the procedure. From 20 attempts to implement the technique, 18 were successful, while in two of them the liver was mistakenly punctured. Samples of lung tissue were representative. It was possible to visualize intact structures, including bronchioles and alveoli. In conclusion the lung biopsy is safe and effective for obtaining lung samples for the purpose of histological diagnosis.

INDEX TERMS: Sheep, lung biopsy, auxiliary tests, lung.

RESUMO. - Foram analisados os resultados e complicações decorrentes do emprego da técnica de biopsia pulmonar transtorácica percutânea em 20 ovinos

cl clinicamente sadios. Os animais foram submetidos ao exame clínico seguido da biopsia com agulha semi-automática no 7º espaço intercostal direito, 5 cm acima do olécrano. Foram analisados o número de tentativas para a execução do procedimento e o tamanho dos fragmentos. As amostras obtidas foram avaliadas histologicamente. Posteriormente ao abate, foi realizado o exame *pos mortem* para avaliação de complicações da técnica e das eventuais lesões provocadas. Entre todos os animais submetidos à biopsia apenas dois demonstraram resistência a técnica, sendo obtidos fragmentos pulmonares entre 4mm a 7 mm, com média de $1,8 \pm 1$ tentativas por fragmento. As principais alterações relacionadas à técnica foram tosse, dispnéia inspiratória, elevação das freqüências cardíaca e respiratória e aumento do ruído broncobronquiolar. Ao exame *pos mortem* observou-se hemorragia dos músculos intercostais e pleura visceral em todos os animais. Das 20 tentativas de execução da técnica, 18 obtiveram sucesso, enquanto que em duas o fígado foi equivocadamente puncionado. As amostras de tecido pulmonar foram consideradas representativas, pois foi possível a visualização de estruturas íntegras, incluindo bronquíolos e alvéolos. Podemos concluir que a biopsia pulmonar é segura e eficaz para obtenção amostras pulmonares com fins de diagnóstico histológico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ovinos, biopsia pulmonar, exame complementar, pulmão.

INTRODUÇÃO

As doenças que afetam o trato respiratório inferior são consideradas a principal causa de perda na ovinocultura moderna (Dohoo et al., 1985; Martin, 1996; Cutlip et al., 1998), sendo responsáveis por 10 a 40% das mortes em animais adultos (Vieira et al., 1993) e por 17% das mortes durante o período perinatal (Rook et al., 1990).

Apesar de ocorrerem com frequência em rebanhos ovinos, muitas vezes as causas dessas enfermidades pulmonares não podem ser determinadas apenas com a realização de um exame clínico mais acurado, sendo necessários outros recursos diagnósticos para definir sua etiologia. Além disso, a necessidade de diagnóstico específico das doenças pulmonares é uma imposição dos recursos terapêuticos atuais.

A biópsia pulmonar é um procedimento diagnóstico invasivo, geralmente utilizado quando outros procedimentos menos invasivos como radiografia, lavado traqueobrônquico e/ou broncoalveolar, endoscopia e ultrassonografia já foram realizados sem uma definição diagnóstica, ou quando há necessidade de um diagnóstico rápido e preciso (Porto, 1991). A avaliação histológica de fragmentos pulmonares obtidos através da biópsia é útil para caracterização de danos superficiais e subpleurais e para diferenciar lesões inflamatórias, alérgicas, enfisematosas, edematosas e neoplásicas (Braun et al., 1999). Além disso, as amostras de pulmão podem ser submetidas à cultura de fungos e bactérias, bem como testes de sensibilidade a antibióticos, dependendo da suspeita diagnóstica

(Savage et al., 1998). Entretanto, poucos estudos relatando a segurança e eficácia da biopsia pulmonar em ovinos já foram publicados.

O primeiro relato científico de biopsia pulmonar em ovinos foi de Pusterla e colaboradores, em 1995, descrevendo a utilização da técnica para a obtenção de fragmentos pulmonares de animais com adenomatose pulmonar. Em seguida houve dois relatos de biopsia pulmonar aspirativa guiada por ultra-som (Braun et al., 1995; Scott & Gessert, 1998) e outro de biopsia pulmonar lancetante guiada por ultra-som (Braun et al., 2000).

O objetivo deste estudo é avaliar a segurança da técnica de biopsia pulmonar percutânea transtorácica às cegas e sua eficácia na obtenção de amostras adequadas que permita a análise histopatológica do fragmento pulmonar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ovinos clinicamente sadios (13 da raça Santa Inês e 7 mestiços Santa Inês), 9 machos e 11 fêmeas, com idade entre 150 e 190 dias (média de 175 dias), pesando entre 23 e 44 Kg (média 32 Kg) e destinados ao abate. Todos os animais foram submetidos ao exame clínico imediatamente antes e após a biopsia pulmonar, utilizando-se protocolo adotado por Viana (2003), e critério clínico de Gonçalves (2004). Os resultados foram anotados em fichas individuais.

O procedimento foi realizado com os animais em estação e contidos manualmente com a ajuda de um assistente. O ponto de punção para a biopsia pulmonar foi demarcado no sétimo espaço intercostal do antímero lateral direito, 5 cm acima do olécrano. Esse ponto corresponde à posição topográfica do lobo

diafragmático do pulmão direito. A seguir foi feita tricotomia e antissepsia da pele com solução de iodo povidine a 1%, seguido de anestesia local da pele do espaço intercostal, tecido subcutâneo, músculos intercostais e pleura parietal, utilizando-se 5 ml de solução de lidocaína a 2%. Alguns minutos depois foi feita, com bisturi, incisão de aproximadamente 1 cm na pele e tecido subcutâneo, entre os espaços intercostais. Uma agulha de biopsia do tipo semi-automática (BD 16 G X 15 cm; Euromed Cateteres[®]) foi inserida, imediatamente cranial à costela, em ângulo vertical à superfície corporal, evitando-se os vasos e nervos intercostais.

Amostras do tecido pulmonar foram colhidas de acordo com Finn-Bodner & Hathcock (1993) e Braun et al. (1999). Se nenhum fragmento do parênquima fosse obtido após a punção, o procedimento seria repetido até que se conseguisse uma amostra satisfatória do tecido pulmonar. Foi analisado o número de tentativas para a execução do procedimento. Imediatamente após a punção, os fragmentos pulmonares obtidos foram acondicionados em recipientes contendo formalina a 10% e, posteriormente, desidratados em álcool, embebidos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina-eosina.

Nenhuma medicação foi administrada aos animais e nenhuma atenção especial foi dada ao sítio da biopsia, uma vez que todos os animais foram submetidos ao abate logo após o procedimento.

Após serem abatidos, os animais foram analisados por inspeção no exame *pos mortem* para avaliação de complicações decorrentes da técnica. Hemorragias na pleura visceral atribuídas à biopsia foram avaliadas segundo o escore de gravidade da lesão descrito por Silva (2005), adaptado de Braun et al. (1999) (escore 1 = lesão pleural com área até 4 mm²; escore 2 = lesão pleural com área

entre 4,1 e 25 mm²; escore 3 = lesão pleural com área superior a 25,1 mm²). As amostras de tecido pulmonar obtidas também foram submetidas ao exame macroscópico, avaliando-se o comprimento de cada fragmento tecidual.

A avaliação histológica dos fragmentos de biópsia foi realizada utilizando-se microscópio binocular convencional. A qualidade dos cortes histológicos obtidos foi avaliada segundo escore adaptado de Hopper et al. (1990) para: 1) adequação tecidual para o diagnóstico histopatológico (escore 0 = tecido insuficiente para análise histopatológica; escore 1 = tecido insuficiente para uma avaliação histopatológica adequada, mas é possível um diagnóstico altamente suspeito; escore 2 = tecido suficiente para a avaliação histopatológica); 2) Preservação Tecidual (escore 0 = pobre; escore 1 = intermediária; escore 2 = boa); 3) Presença de Artefatos (escore 0 = intensa; escore 1 = intermediária; escore 2 = sem presença de artefatos). Os achados histopatológicos referentes às biópsias foram registrados por fotomicrografia.

Os dados coletados foram expostos por meio de estatística descritiva, através de média, desvio padrão e percentual.

RESULTADOS

Pela técnica anteriormente descrita, fragmentos teciduais foram obtidos em todos os animais submetidos ao procedimento (20/20 - 100%), sendo necessária, em média $1,8 \pm 1$ tentativas. Das 20 biópsias realizadas, amostras de tecido foram obtidas após apenas uma tentativa em nove (9/20 - 45%) ocasiões, após duas tentativas em sete (7/20 - 35%), após três tentativas em dois (2/20 - 10%) e, após 4

tentativas também em dois (2/20 - 10%) momentos. A agulha escolhida foi de fácil manipulação e a técnica foi executada sem grandes dificuldades.

Treze animais (13/20 - 65%) toleraram bem a técnica de biopsia pulmonar transtorácica percutânea, entretanto, alguns animais demonstraram certa resistência durante o procedimento, vindo até a dificultar a coleta. Cinco (5/20 - 25%) animais demonstraram suave esforço (berros, feições de medo e elevação das patas), enquanto que dois (2/20 - 10%) animais apresentaram forte resistência (saltos e tentativas de coices) à realização da técnica.

Ao exame clínico, atitude geral e postura permaneceram inalteradas e a temperatura retal não se elevou, permanecendo dentro dos valores de referência para a espécie. Entretanto, as frequências cardíaca e respiratória aumentaram em 14 (70%; Média (MED) = 122bpm) e 12 (60%; MED = 52mrp) animais, respectivamente. Apesar disso, os parâmetros observados voltaram à normalidade em aproximadamente 15 minutos após a biopsia.

Com relação a alterações no aparelho respiratório, foi observada tosse espontânea em seis (6/20 - 30%) animais. Anormalidades no padrão respiratório ocorreram em 3 (3/20 - 15%) ovinos, sendo que dois deles apresentaram dispnéia inspiratória e um animal apresentou expiração em dois tempos, o que geralmente é característico de dor. À auscultação pulmonar, foi observado aumento do ruído broncobronquiolar no sítio da biopsia, em três (3/20 - 15%) animais. Os dois ovinos que demonstraram forte resistência à execução do procedimento apresentaram, à auscultação pulmonar no local da biopsia, um som característico de vazamento de ar, exatamente sobre o local da punção, embora sem haver saída de ar para o exterior.

Um animal entrou em colapso imediatamente após a realização da biopsia, vindo a decúbito. Este animal apresentou tosse, taquicardia, taquipnéia, intensa dispnéia inspiratória e posicionou-se em posição ortopneica, demonstrando grande dificuldade respiratória. A auscultação pulmonar deste animal revelou aumento do ruído broncobronquiolar por toda área dos pulmões. Apesar disso, o animal levantou em alguns minutos e não apresentou mais nenhuma anormalidade. Nenhum dos animais apresentou hemoptise, epistaxe ou mesmo sinais clínicos compatíveis com hemotórax ou pneumotórax, complicações comumente associadas à biopsia pulmonar.

Os animais foram abatidos, em média, três horas após a realização da biopsia pulmonar. No exame *pos mortem* observou-se que todas as punções estavam localizadas no lobo diafragmático. Das 20 biopsias realizadas, as alterações encontradas na pleura parietal e músculos intercostais eram evidenciados como um ponto em 12 carcaças (12/20 - 60%); em outras quatro (4/20 - 20%) as lesões tinham até 4 mm de comprimento; foram evidenciadas como grandes hematomas de até 8mm X 10mm em quatro carcaças (4/20 - 20%). Todos os animais apresentaram hemorragia de pleura, cuja área variou de 4 mm² a 40 mm². Dos 20 animais biopsiados, avaliados quanto ao escore de severidade da hemorragia pleural proposto por Silva (2005), adaptado de Braun et al. (1999), oito ovinos (8/20 - 40%) apresentaram escore 1, seis (6/20 - 30%) apresentaram escore 2 e outros seis animais (6/20 - 30%) apresentaram escore 3. Ao exame macroscópico dos pulmões foram observados petéquias e enfisema ao redor da ferida da biopsia, presentes em quatro (4/20 - 20%) e cinco (5/20 - 25%) ovinos, respectivamente. Dois animais, mais precisamente os que demonstraram forte resistência durante a execução da

biópsia, apresentaram uma ferida linear de aproximadamente 12 mm e 14 mm, respectivamente, na face costal do pulmão direito na região basal do lobo diafragmático. No pulmão de dois ovinos foi observado sinais de que a agulha de biópsia havia transpassado o lobo diafragmático.

Os fragmentos teciduais obtidos através da biópsia variaram de 4 a 17 mm de comprimento (MED = 10 mm). Das 20 amostras obtidas 18 (18/20 – 90%) eram de tecido pulmonar e duas (2/20 – 10%) eram de tecido hepático. Todas as amostras de pulmão (18/18 – 100%) estavam adequadas para análise histopatológica por apresentarem arquitetura pulmonar preservada. Quatorze amostras (14/18 – 78%) foram consideradas ideais para avaliação histológica, pois foi possível observar bronquíolos primários, terminais e respiratórios, ductos e sacos alveolares bem como alvéolos isolados. Em 4 amostras (4/18 – 22%) não foi possível encontrar bronquíolos, estando ausentes inclusive os bronquíolos terminais. Nestas lâminas estavam presentes apenas ductos e sacos alveolares e alvéolos isolados e por isso foram classificadas apenas como boas para uma avaliação histológica. Duas amostras (2/18 – 11%) apresentaram infiltrado inflamatório misto discreto, composto por mononucleares e neutrófilos. Dois fragmentos (2/18 – 11%) teciduais apresentaram focos hemorrágicos isolados (Figura 1).

Um dos fragmentos pulmonares (1/18 – 5%) apresentou aumento da celularidade do interstício e conseqüente espessamento, com infiltrado inflamatório misto moderado, composto por mononucleares e eosinófilos, além de focos hemorrágicos. A luz bronquiolar mostrou-se diminuída, com presença de debris celulares. A pleura, observada em uma das extremidades da biópsia, exibiu

espessamento. Esses achados são compatíveis com o diagnóstico de pneumonia intersticial crônica (Figura 1).

Todas as amostras de pulmão obtidas (18/18 – 100%) mostraram áreas atelectásicas nas extremidades e duas amostras (2/18 – 11%) apresentaram também esmagamento tecidual com comprometimento de parte da área amostrada, todavia nenhuma dessas alterações comprometeu a avaliação morfológica. Em cinco casos (5/18 – 28%), além de pulmão, também foram observados fragmentos de pele, músculo esquelético, fígado ou tecido conjuntivo de origem indeterminada.

A qualidade dos cortes histológicos pulmonares obtidos foram avaliados segundo o escore adaptado de Hopper et al. (1993), que considera os graus zero, um e dois qualitativamente. Levando em conta a adequação tecidual, todas as amostras (18/18 -100%) apresentaram escore 2; com relação a preservação tecidual, duas amostras (2/18 – 11%) apresentaram escore 1 e, 16 amostras (16/8 – 89%) obtiveram escore 2; analisando a presença de artefatos, em todas as lâminas confeccionadas (18/18 – 100%) verificou-se escore 1.

DISCUSSÃO

A biopsia pulmonar percutânea realizada com agulhas lancetantes demorou para ganhar aceitação, mas o avanço nas técnicas de biopsia, melhorias nas agulhas e a possibilidade de lidar melhor com as complicações decorrentes da técnica contribuíram para o aumento da popularidade desta útil ferramenta de auxílio diagnóstico. Neste estudo, as biopsias pulmonares foram conduzidas às cegas de forma que houvesse máxima probabilidade de se conseguir amostras de tecido

viáveis para um diagnóstico histológico quando fosse aplicada em ovinos com doença pulmonar difusa. Se o objetivo do procedimento for obter fragmentos teciduais de lesões localizadas, a biopsia pulmonar deve ser preferencialmente, guiada por ultra-som ou radiografias, como já relatado por outros autores (Wood et al., 1998; Braun et al., 2000).

Foram necessárias em média 1,8 tentativas até a obtenção de um fragmento de tecido viável para análise histológica. Outros autores relatam resultados semelhantes, com média de 1,2 para Braun et al. (2000) que também utilizaram uma agulha semi-automática em ovinos, e de 1,3 para Hamarati (1995) que utilizou um dispositivo automático em humanos. Porém, nestes dois casos as biopsias não foram realizadas às cegas. A execução da biopsia pulmonar às cegas aumenta o risco de complicações como punção equivocada de outros órgãos, lesões de grandes vasos e morte em consequência de hemorragias. No presente estudo foram necessárias poucas perfurações para a obtenção de amostras de tecido viáveis para um exame histológico e não foram observadas complicações graves em decorrência da técnica, indicando que, nestas condições, o 7º espaço intercostal é um bom acesso para a cavidade torácica em ovinos, especialmente quando se pretende obter amostras do lobo diafragmático.

Segundo Moore (2005) e Braun et al.(1999) as reações de desconforto e dor ocorrem durante a perfuração da pleura parietal e não durante a coleta do tecido pulmonar. Por isso, a perfuração da pleura deve ser bem rápida para eliminar a possibilidade de que qualquer movimento repentino desvie a trajetória da agulha ou então que sua ponta cortante lese a pleura antes da colheita de tecido pulmonar. Dois animais deste estudo demonstraram forte resistência à técnica, com reações

semelhantes às relatadas em bovinos por Braun et al. (1999), principalmente no momento da perfuração da pleura. Ao exame *pos mortem* pôde-se observar perfurações lineares de até 14 mm nos pulmões desses ovinos. Embora estivessem anestesiados, é possível que o volume da droga injetado tenha sido insuficiente para uma adequada anestesia da pleura parietal, e que o aumento na quantidade de anestésico administrado possa reduzir a dor desta perfuração, como já foi relatado para eqüinos (Raphel & Gunson, 1981) e bovinos (Braun et al., 1999). Outra opção para evitar reações bruscas dos animais que possam atrapalhar o bom andamento da técnica seria o uso de sedativos. Contudo, antes da indicação deste tipo de fármaco é necessária uma avaliação minuciosa da função pulmonar dos animais, geralmente comprometida em casos de doença respiratória grave.

As alterações observadas ao exame clínico conduzido após a biopsia pulmonar estão de acordo com as descrições prévias da literatura (Raphel & Gunson 1981; Savage et al., 1998; Braun et al., 1999; Braun et al., 2000; Silva, 2005). O aumento das freqüências cardíaca e respiratória, observadas em alguns animais, deve ter ocorrido em conseqüência ao estresse da contenção e da realização do procedimento, visto que esses parâmetros voltaram à normalidade dentro de poucos minutos após a realização da biopsia.

Com relação ao exame do aparelho respiratório, a elevação do ruído broncobronquiolar provavelmente ocorreu em decorrência do esforço físico de alguns animais ao resistirem à execução da biopsia. A dispnéia inspiratória, observada em dois animais, poderia ser resultado da agressão da agulha ao tecido pulmonar, o que pode determinar um sangramento no parênquima pulmonar (Radostits et al., 2002). Entretanto, nenhum dos animais que apresentaram dispnéia

inspiratória após o procedimento apresentou focos hemorrágicos na avaliação histológica da amostra obtida. Por outro lado, uma hemorragia focal, como foi observado, não seria suficiente para causar alteração no padrão respiratório. Pode-se deduzir que a biopsia não determina grande modificação na estrutura pulmonar, mas que o ato de contenção associado com a dor conseqüente à perfuração pleural poderia levar à dispnéia inspiratória observada nesses dois animais. Se esses dois ovinos apresentassem problema decorrente da lesão provocada pela biopsia provavelmente haveria manutenção da dificuldade respiratória, o que não foi observado já que todos os animais voltaram ao seu padrão respiratório normal em aproximadamente quinze minutos após o procedimento, indicando a segurança da técnica.

A auscultação pulmonar do sítio da biopsia revelou, em dois animais, um ruído semelhante a vazamento de ar (sopro). Este tipo de ruído provavelmente ocorreu pela perfuração da pleura visceral e do tecido pulmonar subjacente com saída de ar para a cavidade pleural, já que esses animais foram os que apresentaram maior resistência ao procedimento. A entrada de ar na cavidade pleural pode levar a um pneumotórax, se a capacidade de absorção pleural for ultrapassada (Porto, 1991). Como não foi feito diagnóstico por acompanhamento radiográfico (Braun et al. 1999; Venner et al., 2006) ou por uma auscultação seriada algumas horas após a biopsia, já que os animais precisavam ser abatidos, o pneumotórax não pode ser constatado.

O motivo para o colapso momentâneo ocorrido logo após a biopsia pulmonar em um dos animais não foi determinado, embora reações como essa já tenha sido relatada por outros autores em bovinos, também sem causa aparente (Braun et al.,

1999). Contrariando observações de outros autores que apontam a hemoptise e a epistaxe como complicações normalmente associadas à biopsia pulmonar (Raphel & Gunson, 1981; Savage et al., 1998; DeBerry et al., 2002; Silva, 2005; Venner et al., 2006), não foram observados nesta pesquisa sinais de sangramento em nenhum dos animais após o procedimento. Entretanto, Venner et al. (2006) relatam que indícios de hemorragia são geralmente evidenciados após endoscopia, mesmo em animais que não apresentaram sinais aparentes de sangramento. Neste estudo, o exame *pos mortem* não revelou estrias de sangue ou coágulos no trato respiratório de nenhum dos animais, o que elimina as chances de que hemorragias de grande porte tenham realmente ocorrido. Contudo, foram observadas petéquias próximas ao local da punção nos pulmões de dois ovinos, indicando que pequenas hemorragias no parênquima pulmonar sem importância clínica ocorreram em consequência da biopsia, como já observado por outros autores (Roy & Lavoie, 2003).

As hemorragias de pleura visceral ocorreram em todos os ovinos, sendo semelhantes às previamente relatadas em outros estudos (Braun et al., 1999; Braun et al., 2000; Silva, 2005; Venner et al., 2006). Essas hemorragias foram agrupadas de acordo com o escore atribuído a área total das lesões. O escore de lesão adotado para a biopsia neste estudo foi inferior aos resultados descritos por Silva (2005) e superiores aos de Braun et al. (1999). Silva (2005) trabalhou com uma agulha de biopsia de grosso calibre, o que provavelmente ocasionou maior dano tecidual que a agulha de médio calibre utilizada no presente trabalho. Braun et al. (1999), por sua vez, determinou o escore da lesão 10 dias após a realização da biopsia, havendo, dessa forma, tempo hábil para reparação tecidual. As feridas lineares de até 14 mm observadas no parênquima pulmonar de dois ovinos

ocorreram provavelmente em consequência da agitação demonstrada por esses animais no momento da biopsia.

Os tamanhos dos fragmentos teciduais obtidos neste estudo estão de acordo com as descrições prévias da literatura (Braun et al., 1999; Braun et al., 2000; Silva, 2005). A técnica empregada permitiu a avaliação da arquitetura tecidual pulmonar. Uma biopsia é considerada representativa quando são visualizadas unidades funcionais do tecido amostrado (Naylor et al., 1992). Neste estudo foi possível observar em aproximadamente 80% das amostras obtidas, bronquíolos primários, terminais e respiratórios, ductos e sacos alveolares, bem como alvéolos isolados. Resultados semelhantes também foram observados em eqüinos (Raphel & Gunson, 1981; Venner, 2006), bovinos (Dungworth & Hoare, 1970; Braun et al., 1999) e ovinos (Braun et al., 2000). Não foi possível verificar a presença de brônquios nas amostras obtidas devido a provável ausência dessas estruturas no local onde foi realizada grande parte das punções, a porção basal do lobo diafragmático.

Duas amostras apresentaram perfil histológico compatível com processo inflamatório muito discreto, composto por mononucleares e neutrófilos. Uma possível explicação para esse achado é que, se estes animais realmente apresentavam doença respiratória, o processo ainda estava muito incipiente para ser detectado ao exame clínico. Como os animais desta espécie, devido as condições de manejo a que são submetidos, vivem constantemente expostos a fatores de risco, é aceitável que achados como este ocorram quando se realiza biopsia pulmonar. Os focos hemorrágicos encontrados em duas lâminas foram consequentes ao trauma tecidual provocado pela agulha de biopsia (Raphel & Gunson, 1981).

Um dos animais apresentou perfil histológico de pneumonia intersticial crônica, entretanto, ao exame clínico não foram observadas alterações compatíveis com o quadro apresentado. Isto provavelmente ocorreu por que as partes não afetadas do pulmão compensaram a insuficiência funcional das áreas lesionadas, fazendo com que o animal se mantivesse clinicamente estável.

Artefatos iatrogênicos estavam presentes em todas as biopsias. O mais comum foram as áreas de atelectasia presentes nas bordas teciduais. Este tipo de artefato dificulta a avaliação histológica e geralmente ocorre em função do trauma tecidual ocorrido (Raphel & Gunson, 1981). A presença de outros tecidos compactos junto às amostras de tecido pulmonar, observadas neste estudo (5/18), também foi descrita por outros autores (Raphel & Gunson, 1981; Braun et al., 2000). A desvantagem de se encontrar tecidos maciços junto ao pulmão é que o parênquima pulmonar, por ser menos compacto, tende a colapsar e ficar comprimido entre esses tecidos mais densos (Raphel & Gunson, 1981).

A biopsia acidental do fígado ocorreu duas vezes neste estudo. Outros autores já relataram punção de músculos intercostais (Venner et al., 2006), intestino (Savage et al., 1998) e fígado (Foroudi et al., 1995; Venner et al., 2006). Segundo Smith (1994), a agulha de biopsia deve avançar cerca de 2 cm no interior do parênquima pulmonar para que seja obtida uma amostra satisfatória de tecido pulmonar. Harrison et al. (1984) defendem que a penetração máxima da agulha no interior dos pulmões deve ser de 3 cm ou 4 cm. Neste estudo a biopsia foi realizada segundo a técnica de Finn-Bodner & Hathcock (1993) e Braun et al. (1999) para bovinos adultos. A indicação desses autores é de que a agulha penetre no máximo 8 cm no interior da cavidade torácica a partir de incisão na pele do animal. Silva (2005)

executou a mesma técnica em bezerras, obtendo sucesso. Durante as coletas não foram feitas mensurações para saber com exatidão quantos centímetros a agulha de biopsia penetrou a cavidade torácica, apenas foi feita uma marcação na agulha para assegurar que esta não penetrasse mais que 8 cm. Apesar da técnica ter sido conduzida com sucesso em 18 das 20 tentativas realizadas neste estudo, ficou evidente a necessidade de padronização da profundidade de penetração da agulha na cavidade torácica na espécie ovina, evitando assim a punção equivocada de outros órgãos.

Em conclusão, a biopsia pulmonar transtorácica percutânea é um exame complementar de fácil execução, rápido, seguro e eficiente na obtenção de material pulmonar adequado e suficiente para uma avaliação histopatológica. O acesso ao pulmão através do sétimo espaço intercostal direito, 5 cm acima do olécrano, mostrou-se adequado para a obtenção de amostras pulmonares para fins diagnósticos, uma vez que nenhuma complicação grave decorrente da técnica foi observada, podendo, inclusive, ser utilizado em procedimentos realizados às cegas em casos de doença pulmonar difusa. A biopsia pulmonar deve ter seu uso encorajado na rotina veterinária. Todavia, para que isto se concretize, o profissional de veterinária precisa ter conhecimento de suas indicações e limitações, além da técnica para a realização de forma eficiente da mesma.

Agradecimentos. - Os autores agradecem ao auxílio financeiro e a bolsa de estudos de mestrado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 07/55341-6 e 07/55341-6, respectivamente).

REFERÊNCIAS

- Braun U., Flückiger, M., Sicher D., Theil D. 1995. Suppurative pleuropneumonia and a pulmonary abscess in a ram: ultrasonographic and radiographic findings. *Schweiz. Arch. Tierheilkunde* 137: 272-278.
- Braun U., Estermann U., Feige K., Sydler Y., Pospischil A. 1999. Percutaneous lung biopsy in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215(5):679-681.
- Braun U., Estermann U., Flückiger M., Sydler T., Pospischil A. 2000. Ultrasound-guided percutaneous lung biopsy in sheep. *Vet. Rec.* 146(18):525-528.
- Cutilip R.C., Brogden A.K., Lehmkuhl H.D. 1998. Changes in the lungs of lambs after intratracheal injection of lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* A1. *J. Com. Path.* 118:163-167.
- Dohoo I.R., Curtis R.A., Finley G.G. A survey of sheep diseases in Canada. *Can. J. Comp. Med.* 49(3): 239-247.
- DeBerry J.D., Norris C.R., Samii, M.V.F., Grifley S.M., Almy F.S. 2002. Correlation between fine-needle aspiration cytopathology and histopathology of the lung in dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 38:327-336.

- Dungworth D.L., Hoare M.N. 1970. Trepine lung biopsy in cattle and horses. Res. Vet. Sci., 2:244-246.
- Finn-Bodner S.T., Hathcock J.T. 1993. Image-guided percutaneous needle biopsy: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging. Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim. 8(4):258-278.
- Foroudi, F.; Gheung, K. ; Duflou, J. 1995. A comparison of the needle biopsy post mortem with the conventional autopsy. Pathol. 27 : 79-82.
- Gonçalves R.C. 2004. Semiologia do sistema respiratório, p.313-331. In: Feitosa F.L. (ed.), Semiologia Veterinária. 1ª ed. Roca, São Paulo.
- Hamarai, L.B. 1995. CT-guided automated needle biopsy of the chest. Am. J. Roentgenol. 165:53-55.
- Harrison B.D.W., Thorpe R.S., Kitchener P.G., McCann B.G., Pilling J.R. 1984. Percutaneous TruCut biopsy in the diagnosis of localized pulmonary lesions. Thorax, 39 :493-499.
- Hopper K.D., Baird D.E., Reddy V.V., Landis J.R., Parker S.H., Tyler H.N.Jr., Ownbey J.L., McCauslin M.A., Yakes W.F., Sabatelli F.W. 1990. Efficacy of automated biopsy guns versus conventional biopsy needles in the pygmy pig. Radiology, 176(3):615-616.

Martin W.B. Respiratory infections of sheep. 1996. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19(3):171-179.

Moore, E.H. Percutaneous biopsy in lung Cancer. 2005. *Semin. Roentgenol.* 40(2):154-170.

Naylor J.M., Clarck E.G., Clayton H.M. 1992. Chronic obstructive pulmonary disease: usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can. Vet. J.* 33:591-598.

Porto N. 1991. Punção biopsia pulmonar transcutânea, p.274-276. In: Silva L.C.C. (ed.), *Compêndio de Pneumologia*. 2ªed. Fundo Editorial BYK, São Paulo.

Pusterla N., Braun U., Grest P., Ossent P. 1995. Ein fall von lungenadenomatose bei einem schaf – diagnose durch lungenbiopsie unter ultraschallkontrolle. *Tierärztliche Umschau* 50:340-343.

Raphel C.F., Gunson D.E. 1981 Percutaneous lung biopsy in the horse. *Cornell Vet.*, 71(4):349-348.

Rook J.S., Scholman G., Wing-Proctor S., Shea M. 1990. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice.* 6(3):531-562.

Roy M.F., Lavoie J.P. 2003. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. *Vet. Clin. Equine Practice* 19(1):1-17.

Savage C.J., Traub-Dargatz J.L., Munford E.L. 1998. Survey of the large animal diplomates of the American College of Veterinary Internal Medicine regarding percutaneous lung biopsy in the horse. *J. Vet. Intern. Med.* 12:456-464.

Scott P.R., Gessert M.E. 1998. Ultrasonographic examination of the ovine thorax. *Vet. J.* 155(3):305-310.

Silva D.P.G. 2005. Avaliação da técnica de biópsia pulmonar transtorácica em bezerros clinicamente sadios e com broncopneumonia induzida experimentalmente. Dissertação de Mestrado em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 75p.

Smith B.P. 1994. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. Vol. 2. 1ª ed. a Manole, São Paulo. p.1738.

Venner M., Chimidbauer S., Drommer W., Deegen E. 2006. Percutaneous Lung Biopsy in the Horse; Comparison of two instruments and repeated biopsy in horses with induced acute interstitial pneumopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 20:968-973.

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

Vieira F.J.B., Trigo T.F.J., Meza L.J., Romero F. A., Pérez G. T., Güemes F.S. 1993. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones com lesions inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet. Méx. 27(2):107-112.

Wood E.F., O'Brien R.T., Young K.M. 1998. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of focal parenchymal lesions of the lung in dogs and cats. J. Vet. Intern. Med. 12:338-342.