

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FERNANDA CRISTINA MENDES BARUSSI

**COMPARAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS
ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA SOBRE
MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE EQUINOS COM ASMA.**

Comparison of the action between bone marrow-derived mononuclear cells and mesenchymal stromal cells on alveolar macrophages from equines with asthma.

CURITIBA

2019

FERNANDA CRISTINA MENDES BARUSSI

COMPARAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA SOBRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE EQUINOS COM ASMA.

Comparison of the action between bone marrow-derived mononuclear cells and mesenchymal stromal cells on alveolar macrophages from equines with asthma.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Júnior

Coorientadora: Prof^a. Dra. Alexandra Cristina Senegaglia

Coorientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes

CURITIBA

2019

iii

TERMO DE APROVAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus Curitiba

ATA Nº 0004 E PARECER FINAL DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA FERNANDA CRISTINA MENDES BARUSSI

Aos dezoito dias do mês de julho do ano de dois mil e dezoito, às 8h30, realizou-se na sala de vídeo 02, térreo do Bloco Verde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão fechada de defesa da tese da doutoranda Fernanda Cristina Mendes Barussi, intitulada: “COMPARAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA SOBRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE EQUINOS COM ASMA”. A doutoranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Pedro Vicente Michelotto Junior (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes (FMVZ-USP), Karen Regina Lemos (UNICENTRO), Carlos Eduardo Camargo (PUCPR) e a Dra. Leticia Fracaro (PUCPR). Procedeu-se à exposição da tese, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a tese, que foi considerada

APROVADA

MEMBROS

Prof Dr Pedro Vicente Michelotto Junior - Orientador

Prof Dr Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes (USP)

Prof Dr Karen Regina Lemos (UNICENTRO)

Prof Dr Carlos Eduardo Camargo (PUCPR)

Prof Dr Leticia Fracaro (PUCPR)

ASSINATURA

Pedro Vicente Michelotto Jr.
Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes
Karen Regina Lemos
Carlos Eduardo Camargo
Leticia Fracaro

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 19 de julho de 2019.

Caroline Nocera Bertton

Caroline Nocera Bertton

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Renata Ernland Freitas de Macedo

Profa. Dra. Renata Ernland Freitas de Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
FORMATO DA TESE	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO GERAL	11
CAPÍTULO 1	17
THE SCORE OF FACIAL EXPRESSION APPLIED TO EVALUATE DISCOMFORT OF ASTHMATIC HORSES	17
CAPÍTULO 2	29
INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE CAVALOS ASMÁTICOS DESAFIADOS COM ZIMOSAN E LIPOPOLISSACARÍDEO	29
CAPITULO 3	49
COMPARAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA SOBRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE EQUINOS COM ASMA	49
CAPITULO 4	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
CAPITULO 5	83
PÁGINAS INICIAIS DOS ARTIGOS PUBLICADOS	83
ANEXOS	90
PULMONARY FUNCTION MEASUREMENTS DURING REPEATED ENVIRONMENTAL CHALLENGE OF HORSES WITH RECURRENT AIRWAY OBSTRUCTION (HEAVES)	90
FICHA CLÍNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS	96
FICHA DE ESCORE CLÍNICO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS	97

Dedico este trabalho a todos os professores que tive!

Aos professores das escolas... àqueles que souberam a hora de me repreender ou de me estimular, e que para mim, serão exemplos a seguir; àqueles que nem sempre souberam como conduzir as coisas, e que, serão exemplo de ingenuidade e persistência.

Aos professores da vida... aos pais, que são “cegos, surdos e mudos” tantas vezes, corrigindo nossos erros, atenuando nossos defeitos e exaltando nossos pequenos acertos, fazendo com que pareçam grandes vitórias; ao cônjuge que é fonte de paciência e companheirismo e assim como os pais, tem habilidade de enxergar nosso sucesso, ainda que este não tenha “corpo” suficiente para ser enxergado por outrem; aos filhos que são nossa motivação para perseverar, são os seres para os quais deixaremos nossos exemplos e pelos quais temos amor incondicional; aos animais, que, como já mencionei em outras dedicatórias, “me ouvem mesmo sem me compreender, que me mostram sem apontar, me dizem sem falar, e assim, me conduzem por caminhos que muitas pessoas não seriam capazes”; aos amigos, aos quais incluo todos os acima citados, pois cada um deles me acolheu de alguma forma, me ensinou de alguma maneira e deixou em mim alguma marca que espero poder retribuir de forma sincera em algum tempo; finalmente aos desafios e desafetos, que me fizeram e ainda fazem, vencer meus próprios limites, me permitindo provar para mim mesma do que sou capaz.

AGRADECIMENTOS

Felizmente tenho que agradecer a muitos, pois todos aqueles a quem recorri durante a trajetória deste doutorado, me auxiliaram de alguma maneira, concordando ou discordando das minhas opiniões e atitudes, fazendo que eu me forçasse a entrar em um ciclo de constante reciclagem e aperfeiçoamento. Desta forma agradeço:

Ao meu orientador e amigo Dr. Pedro Vicente Michelotto Junior, que me deu a liberdade de discutir e discordar e que respeita a importância de reconhecer nossos erros e limitações para que possamos crescer; À minha grande parceira, Fernanda Zettel Bastos, colega de mestrado e doutorado, que tantas vezes abraçou minhas ideias como sendo suas e me ajudou a atingir tantos objetivos; À minha coorientadora Alexandra Cristina Senegaglia às frequentes disponibilidade e paciência, por todas as reuniões, discussões e construções; Ao meu coorientador Dr. Wilson Roberto Fernandes, pela compreensão e experiência, o que me deu segurança para trilhar por novos caminhos e encarar novos desafios; Às universidades PUCPR e USP pelo acolhimento e pela credibilidade; À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de doutoramento; Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA, em especial aos professores Gervásio Bechara e Saulo Henrique Weber, que me orientaram muitas vezes em questões pertinentes ao trabalho, com zelo e esmero, mesmo sem a obrigação em fazê-lo; Aos profissionais Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica - PPGEM que se disponibilizaram prontamente e contribuíram muito para este trabalho, Dr. Paulo Cesar Soares Junior e Msc. Jéssica Turola; Aos demais profissionais da PUCPR, Tâmara Duarte Borges, Caroline Nocera Bertton, Marcelo Rocato, Gilson Pedro Amaral Filho, Irenice Cairo da Silva e equipe do laboratório experimental de cultivo celular, pela atenção e colaboração; Aos colegas e amigos: Mariana M Coneglian – UNICENTRO-PR e Fabrício Azevedo – Jockey Clube do Paraná, pela parceria; Por fim, aos alunos de medicina veterinária da PUCPR, pela oportunidade de ensinar e aprender com eles.

FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por 5 capítulos. O capítulo 1 apresenta o artigo científico completo, intitulado “The score of facial expression applied to evaluate discomfort of asthmatic horses”, submetido na revista “Animal”. O capítulo 2 apresenta o artigo científico completo, intitulado “Indução de inflamação em macrófagos alveolares de cavalos asmáticos desafiados com zimosan e lipopolissacarídeo”. O capítulo 3 contém o artigo científico completo, intitulado “Comparação entre a ação de células mononucleares e células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea sobre macrófagos alveolares de equinos com asma”, a ser submetido na revista “Veterinary research”. O capítulo 4 contém as considerações finais. O capítulo 5 contém as páginas iniciais dos trabalhos publicados pelo grupo no decorrer do doutorado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEAP – Asma equina associada as pastagens
AG – *Asthmatic group*
AGa – *Asthmatic group after walking*
AGb – *Asthmatic group before walking*
CCT – Contagem de células totais
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CG – *Control group*
CGa – *Control group after walking*
CGb – *Control group before walking*
CS – *Clinical score*
BALF – Bronchoalver lavage fluid
DEX ou DEXA – Dexametasona
DMSO – Dimetilsulfóxido
EC – Escore clínico
EE – Esforço expiratório
EMDMO – Estromais mesenquimais derivadas de medula óssea
EO – Eosinófilo
FC – Frequência cardíaca
FR – Frequência respiratória
HG – *Healthy group*
HGS – *Horse grimace scale*
HMDS – *Horse grimace scale*
HR – *Heart rates*
IgE – Imunoglobulina E
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-4 – Interleucina 4
IL-13 – Interleucina 13
IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
INF γ – Interferon-gama
LBA – Lavado broncoalveolar
LO – Linfócito

LPS – Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*
MA – Macrófagos alveolares
MAST – Mastócito
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MN – Multinucleadas
MNDMO – Mononucleares derivadas de medula óssea
MO – Macrófago
MO – Medula óssea
MSP – Macrófagos derivados de sangue periférico
NF kB – Fator natural kB (do inglês *natural factor kB*)
NO – Neutrófilo
P3 – Terceira passagem
PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)
PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Qui² – Grau de variabilidade
R² – Coeficiente de determinação
RR – *Respiratory rates*
RT – Reflexo de tosse
SFB – Soro Fetal Bovino
Ta – Linfócitos T auxiliares
TE – Tosse espontânea
Th – Linfócitos T helper
Th1 – Resposta imunológica do tipo T *helper 1*
Th2 – Resposta imunológica do tipo T *helper 2*
TLR – Receptores tipo *Toll* (do inglês *Toll-like receptor*)
TNF- α – Fator de necrose tumoral α (do inglês tumor necrosis factor)
Treg – Linfócitos T reguladores
UHE – Unidade Hospitalar de Equinos
ZIM – Zymosan de *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO: A asma equina é uma inflamação crônica reversível bastante debilitante, podendo afetar o bem-estar dos animais acometidos. Embora os tratamentos à base de corticosteroides controlem a inflamação, podem causar efeitos adversos e a enfermidade permanece sem cura. A asma pode ser desencadeada pela inalação de aeroalérgenos, assim como esporos de bactérias e fungos. Os macrófagos alveolares (MA), células residentes nos pulmões, reagem aos antígenos inalados e secretam interleucinas que promovem a atração de linfócitos T helper (Th) tipo 1 ou tipo 2, dependendo do antígeno e da via imunológica ativada por ele. Assim, o estudo de diferentes indutores inflamatórios, bem como novas terapias, são importantes para o entendimento e enfrentamento da asma. As hipóteses do presente trabalho são: H1 – A asma é uma enfermidade que causa desconforto aos equinos; H2 – O zimosan pode ser utilizado como antígeno de ativação de MA equinos; H3 - As terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea (MNDMO) e células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (EMDMO) podem interferir em algumas atividades desempenhadas pelos MA de cavalos asmáticos, e a resposta às terapias pode variar de acordo com o antígeno e via imunológica ativada por ele. **OBJETIVOS:** Desta maneira, o presente trabalho abrangeu três experimentos objetivando: E1 - Avaliar o grau de desconforto em equinos asmáticos em relação a animais saudáveis, utilizando a Horse Grimace Scale (HGS), mensuração de parâmetros fisiológicos e escore clínico (EC); E2 - Avaliar os efeitos do desafio celular com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS – Lipopolysaccharides derivado de *Escherichia coli*) e Zimosan (ZIM - Zymosan derivado de *Saccharomyces cerevisiae*) em MA e macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos; E3 - Comparar a ação de MNDMO autólogas e EMDMO alogênicas sobre MA de equinos asmáticos desafiados com LPS e ZIM. **MATERIAL E MÉTODOS:** E1 – Doze cavalos foram examinados e tiveram o EC atribuído em repouso. Seis equinos com tosse foram encaminhados para coleta de lavado broncoalveolar (LBA), onde foram diagnosticados com asma (grupo asmático - GA) e outros seis equinos eram saudáveis (grupo controle - GC). Os animais foram filmados antes (GAa e GCa) e depois (GAd e GCd) de 60 segundos de caminhada e pontuados no HGS. As

frequências cardíaca e respiratória (FC e FR) também foram avaliadas antes e após o exercício. A avaliação estatística foi feita pelo índice Kappa; **E2** - Foram utilizados dois cavalos asmáticos e um saudável, todos mantidos a pasto. Os animais foram examinados e tiveram LBA e sangue periférico colhidos, de onde foram isolados MA e MSP respectivamente. Sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços foram colocados 200µL de MA ou MSP (5×10^6 células/mL) desafiados com 100µL LPS (100ng/mL) e ZIM (100mg/mL). Em seguida foram desidratadas em etanol, depois em Hexametildisilazano e posteriormente metalizadas com ouro, para então serem visualizadas no microscópio eletrônico de varredura. **E3** - Cinco cavalos, com histórico de tosse e dificuldade respiratória tiveram o LBA colhido para o isolamento de MA desafiados com LPS e ZIM, tratados com dexametasona (5µM), MNDMO (1×10^6 células/mL) e EMDMO (1×10^6 células/mL). Foram avaliadas as atividades de adesão e fagocitose, concentração de nitritos, proteínas totais e interleucinas 1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral α (TNF-α). RESULTADOS: **E1** – A concordância entre as avaliações de posição das orelhas, tensão na área dos olhos, tensão bucal, fechamento palpebral, proeminência do músculo masseter e tensão nasal foi de 0,353 ($p < 0,001$), 0,222 ($p < 0,001$), 0,162 ($p = 0,001$), 0,412 ($p < 0,001$), 0,199 ($p = 0,002$) e 0,307 ($p = 0,001$) respectivamente. Em todos os animais do estudo, houve uma diferença significativa no EC entre GCd vs GAd ($p = 0,0313$). Houve diferença significativa no escore de medido pelo HGS entre GAd e GAa ($p = 0,048$), GAa e GCd ($p = 0,035$) e GAa e GCa ($p = 0,035$). Além disso, houve uma correlação positiva entre o escore HGS e FC, FR e EC, onde a força da correlação HGS vs FC foi de 41% ($p = 0,047$), HGS vs FR foi de 62% ($p = 0,008$) e HGS vs CS foi 58,7% ($p = 0,045$); **E2** - Houve diferença significativa na área celular entre MA+ZIM vs. MA ($p < 0,0001$), MA+ZIM vs. MA+LPS ($p = 0,003$), MSP+ZIM vs. MSP ($p < 0,0001$) e MSP+ZIM vs. MSP+LPS ($p < 0,0001$). Assim também ocorreu no índice de espriamento entre MA+ZIM vs. MA+LPS ($p = 0,0001$) e MSP+ZIM vs. MSP+LPS ($p < 0,0001$), porém não houve diferença entre os grupos no índice comprimento/largura; **E3** - Todos os animais apresentaram fenótipo de asma. A dexametasona reduziu fagocitose e MA+DEXA ($p = 0,0317$), MA+LPS+DEXA ($p = 0,0159$) e MA+ZIM+DEXA ($p = 0,0079$) em relação aos MA. A concentração de proteínas foi maior nos grupos tratados com terapia celular MA+LPS+MNDMO ($p = 0,0317$),

MA+ZIM+MNDMO ($p=0,0159$), MA+LPS+EMDMO ($p=0,0079$) e MA+ZIM+EMDMO ($p=0,0079$) em relação aos MA. Houve redução da secreção de IL 1 β em MA+DEXA ($p=0,0317$), MA+LPS+DEXA ($p=0,0159$) e MA+ZIM+DEXA ($p=0,0159$) em relação as MA. A concentração de TNF α reduziu em todos os tratamentos mas foi significativo apenas em MA+DEXA ($p=0,0317$), MA+LPS+DEXA ($p=0,0317$) e MA+ZIM+DEXA ($p=0,0079$) em relação as MA.

CONCLUSÃO: E1 - Este estudo demonstrou a possibilidade de adoção do HGS para avaliação do desconforto respiratório em animais asmáticos; **E2** - O zimosan pode ser uma alternativa como agente de ativação celular usado em estudos com MA, uma vez que provocou alterações à morfologia destas células, compatíveis com as que ocorrem em processos inflamatórios; **E3** - Os efeitos da terapia celular sobre os MA de cavalos asmáticos foram benéficos. Houveram diferenças em algumas respostas entre as terapias utilizadas MNDMO e EDMO assim como entre os antígenos LPS e ZIM.

Palavras-chave: asma equina, bem-estar, indução da inflamação, terapia celular.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Equine asthma is a reversible chronic inflammation and very debilitating that can affect the welfare of affected animals. Although corticosteroid treatments control inflammation, they can cause adverse effects and the disease remains unhealed. Asthma can be triggered by inhalation of aeroallergens as well as bacterial and fungal spores. Alveolar macrophages (AM), cells residing in the lungs, react to inhaled antigens and secrete interleukins that promote the attraction of T helper (Th) lymphocytes that can be type 1 or type 2, depending on the antigen and the immune pathway activated. Thus, the study of different inflammatory inducers, as well as new therapies, are important for understanding and combat with asthma. The hypotheses of the present work are: H1 - The equine asthma causes discomfort to horses; H2 - Zymosan can be used as an equine AM activation antigen; H3 - Therapy with bone marrow-derived mononuclear cells (BMDMN) and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMS) may interfere on activities performed by AM of asthmatic horses, and response to therapies may change in accord to antigen and immune pathway activated. **OBJECTIVES:** The present work covered three experiments aiming at: **E1** - To evaluate the degree of discomfort in asthmatic horses in relation to healthy animals, using the Horse Grimace Scale (HGS), measurement of physiological parameters and clinical score (CS); **E2** - To evaluate the effects of cellular challenge with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS - *Escherichia coli* derived lipopolysaccharides) and Zymosan (ZIM - Zymosan derived from *Saccharomyces cerevisiae*) on AM and equine peripheral blood derived macrophages (PBM); **E3** - Compare the action of autologous BMDMN and allogeneic BMDMS on AM of asthmatic horses challenged with LPS and ZIM. **MATERIAL AND METHODS:** **E1** - Twelve horses were examined and had the CS assigned at rest. Six horses with cough were referred for collection of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), where they were diagnosed with asthma (asthmatic group - AG) and six other horses were healthy (control group - CG). The animals were filmed before (AGb and CGb) and after (AGa and CGa) 60 seconds of walking and scored on the HGS. Heart and respiratory rates (HR and RR) were also assessed before and after exercise. Statistical evaluation was performed by Kappa index; **E2** - Two asthmatic and one healthy horses were

used, all kept on pasture. The animals were examined and had BALF and peripheral blood collected, from which AM and PBM were isolated respectively. On glass coverslips in 24-well plates were placed 200 μ L of AM or PBM (5x10⁶ cells / mL) challenged with 100 μ L LPS (100ng / mL) and ZIM (100mg / mL). They were then dehydrated in ethanol, then in hexamethyldisilazane and then metallized with gold, to be viewed under the scanning electron microscope. **E3** - Five horses with a history of cough and difficulty breathing had BALF collected for isolation of AM challenged with LPS and ZIM, treated with dexamethasone (5 μ M), BMDMN (1x10⁶ cells / mL) and BMDMS (1x10⁶ cells / mL). Adhesion and phagocytosis activities, nitrite concentration, total proteins and interleukins 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were evaluated. **RESULTS: E1** - The agreement between the ear position, eye area tension, buccal tension, eyelid closure, masseter muscle prominence and nasal tension assessments was 0.353 (p <0.001), 0.222 (p <0.001), 0.162 (p = 0.001), 0.412 (p <0.001), 0.199 (p = 0.002) and 0.307 (p = 0.001) respectively. In all study animals, there was a significant difference in CS between CGa vs AGa (p = 0.0313). There was a significant difference in HGS measured score between AGa and AGb (p = 0.048), AGb and CGa (p = 0.035) and AGb and CGb (p = 0.035). In addition, there was a positive correlation between the HGS and HR, RR and CS score, where the strength of the HGS vs HR correlation was 41% (p = 0.047), HGS vs RR was 62% (p = 0.008) and HGS vs CS was 58.7% (p = 0.045); **E2** - There was a significant difference in cell area between AM + ZIM vs. AM (p <0.0001), MA + ZIM vs. AM + LPS (p = 0.003), MSP + ZIM vs. MSP (p <0.0001) and MSP + ZIM vs. MSP + LPS (p <0.0001). This also occurred in the spreading index between AM + ZIM vs. AM + LPS (p = 0.0001) and MSP + ZIM vs. MSP + LPS (p <0.0001), but there was no difference between the groups in the length / width index; **E3** - All animals presented asthma phenotype. Dexamethasone reduced phagocytosis and AM + DEXA (p = 0.0317), AM + LPS + DEXA (p = 0.0159) and AM + ZIM + DEXA (p = 0.0079) compared to AM. Protein concentration was higher in AM + LPS + BMDMN (p = 0.0317), AM + ZIM + BMDMN (p = 0.0159), AM + LPS + BMDMS cell therapy treated groups (p = 0.0079) and AM + ZIM + BMDMS (p = 0.0079) in relation to AM. There was a reduction in IL 1 β secretion in AM + DEXA (p = 0.0317), AM + LPS + DEXA (p = 0.0159) and AM + ZIM + DEXA (p = 0.0159) compared to AM. TNF α concentration decreased in all treatments but was

significant only in AM + DEXA ($p = 0.0317$), AM + LPS + DEXA ($p = 0.0317$) and AM + ZIM + DEXA ($p = 0.0079$). in relation to the AM. CONCLUSION: **E1** - This study demonstrated the possibility of adopting HGS to evaluate respiratory distress in asthmatic animals; **E2** - Zimosan may be an alternative as a cell activating agent used in studies with AM, since it caused changes in the morphology of these cells, compatible with those occurring in inflammatory processes; **E3** - The effects of cell therapy on asthma horses AM were beneficial. There were differences in some responses between BMDMN and BMDMS therapies as well as between LPS and ZIM antigens

Key words: equine asthma, welfare, inflammation induction, cell therapy.

CAPITULO 1

Short communication: Score of facial expression applied to evaluate discomfort in asthmatic horses

Fernanda Cristina Mendes Barussi¹, Fernanda Zettel Bastos¹, Mariana Marcantonio Coneglian¹, Tâmara Duarte Borges¹, Gilson Pedro Amaral Filho¹, Saulo Henrique Weber¹, Pedro Vicente Michelotto Junior^{1*}

1- Animal Science, School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba, Paraná 80215901, Brazil.

* Corresponding author: Pedro V. Michelotto Jr. E-mail: p.michelotto@pucpr.br

Short title: Score of facial expression for discomfort in horses

ABSTRACT

Equine asthma is a chronic condition of the airways, and is very similar to human asthma. For human sufferers, there are questionnaires that relate physical damage to their quality of life, but for animals, we have few tools to quantify the pain and discomfort caused by this disease. The objective of the study was to evaluate the degree of discomfort in asthmatic horses in relation to healthy animals, using the Horse Grimace Scale (HGS), physiological parameters, and clinical score (CS). Twelve horses were examined and had a CS assigned at rest. Six horses with cough were referred for bronchoalveolar lavage fluid collection, where they were diagnosed with asthma (asthmatic group - AG) and another six horses were healthy (control group - CG). The animals were filmed before (AGb and CGb) and after (AGa and CGa) 60 seconds of walking, and scored on the HGS. Heart and respiratory rates (HR and RR) were also assessed before and after exercise. The Kappa index shows the degree of concordance between all evaluators in three categories (0= not present, 1= moderately present, 2= obviously present). On stiffly backwards ears, general agreement was 0.353 ($p < 0.001$). On tension above the eye

area, general agreement was 0.222 ($p < 0.001$). On mouth strained and pronounced chin, general agreement was 0.162 ($p = 0.001$) On orbital tightening, general agreement was 0.412 ($p < 0.001$). On prominent strained chewing muscles, general agreement was 0.199 ($p = 0.002$). On strained nostrils and flattening of the profile, general agreement was 0.307 ($p = 0.001$). There was significant agreement in categories 0 and 1, with $p < 0.001$ and $p = 0.014$, respectively. In all animals in the study, there was a significant difference in CS between CGa vs AGa ($p = 0.0313$). There was a significant difference in the pain score measured by the HGS between AGa and AGb ($p = 0.048$), between AGb and CGa, ($p = 0.035$), and between AGb and CGb ($p = 0.035$). In addition, there was a positive correlation between the pain score and HR, RR, and CS, where the strength of the HGS vs HR correlation was 41% ($p = 0.047$), HGS vs RR correlation was 62% ($p = 0.008$) and HGS vs CS was 58.7% ($p = 0.045$). This study demonstrated the possibility of adopting the HGS for the evaluation of respiratory discomfort in asthmatic animals.

Keywords: welfare, equine asthma, quality of life, discomfort evaluation; pain evaluation

IMPLICATIONS

Active horses are often exposed to allergens, so are susceptible to developing asthma. Asthma is a disease that can be very limiting and, depending on its severity, can significantly reduce quality of life. Therefore, quantifying the discomfort caused by asthma can be an objective parameter and serve as a reference for establishing adequate management and treatment to reduce the discomfort caused by the disease, and improve the quality of life of asthmatic horses.

INTRODUCTION

Equine asthma is a chronic condition of the airways which is very similar to human asthma, and is characterized by recurring airway obstruction, dyspnea, and mucus production (Bond et al., 2018; Couëttil et al., 2016). Clinical signs include increased respiratory effort at rest, coughing and exercise intolerance, triggered by inhalation of dust particles containing bacterial, mold or toxic agents, and consequent exacerbation of the disease in susceptible horses (Leclere et al., 2011).

Severe asthma causes several physical changes and limitations, and it is necessary to evaluate how limiting it is for affected horses (Couëtil et al., 2016). While in human sufferers there are scales based on questionnaires which relate physical damage to quality of life (Lara et al., 2014), for animals we have few tools to quantify the pain and discomfort caused by this disease. There are questionnaires that can be applied to owners of horses with respiratory diseases, and although these are efficient, they have limitations such as subjectivity and variability (Bond et al., 2018; Hotchkiss et al., 2007).

Facial expressions are commonly used to assess pain and other emotional states in humans, particularly those who are unable to communicate, in this way could be adapted and transposed to routine use with animals (Dalla Costa et al., 2014). Horses are very visual and use facial expressions to communicate, as well as express their feelings and emotions (Wathan et al., 2015).

Based on recognition of the facial expressions of horses and their alterations in painful states, the British Veterinary Association Animal Welfare Foundation uses equine facial expressions to recognize pain or discomfort in horses, and developed a Horse Grimace Scale (HGS) (Wagner, 2010; Dalla Costa et al., 2014). This could possibly facilitate the detection of this painful condition and help in recognizing its approach at an early stage.

STUDY OBJECTIVES

To evaluate the degree of discomfort in asthmatic horses in relation to healthy animals, using the HGS, physiological parameters (heart rate (HR) and respiratory rate (RR)) and clinical score (CS – based on Tesarowski et al., 1996).

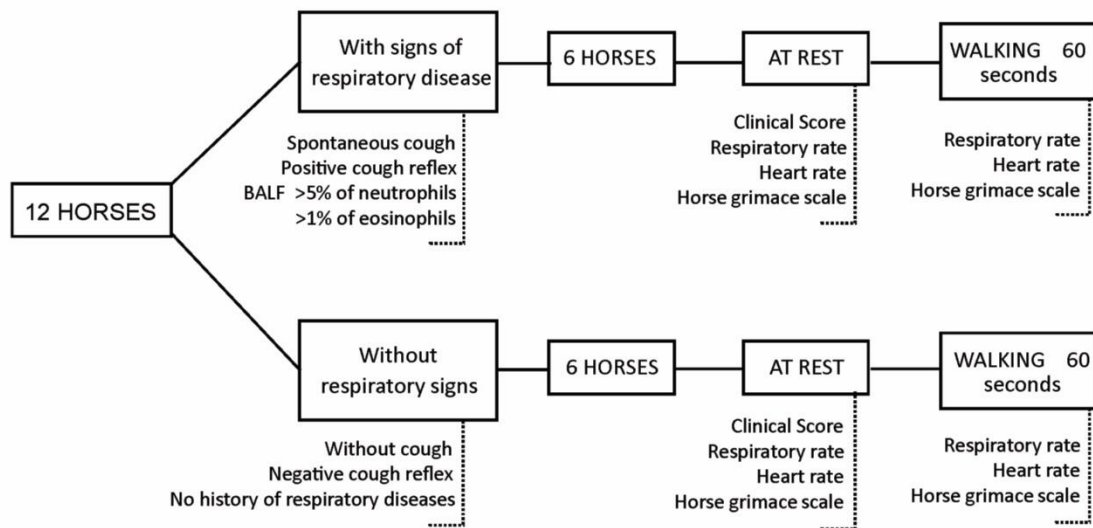
MATERIAL AND METHODS

STUDY DESIGN

Twelve horses underwent physical examination and had a CS assigned at rest. Six horses with cough were referred for bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collection, where they were diagnosed with asthma (asthmatic group - AG). The other six were healthy horses (healthy group - HG). After this first stage, the animals were filmed at rest

and scored on the HGS, and then taken on a walk for 60 seconds, and filmed again at the end of the walk. Heart rate and respiratory rate were obtained before and after exercise (figure 1). The study was controlled, randomized and blinded, so that the five evaluators did not know the animals nor the groups to which they belonged.

Figure 1 – Scheme of the study design demonstrating the number of animals, exercise and materials collected.



ANIMALS

Twelve crossbred horses, eight females and four males, with ages varying between 8 and 28 years and weighing between 350 kg and 450 kg were examined. The animals were maintained on pasture management at the Veterinary Hospital at Gralha Azul Experimental Farm of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), located in Fazenda Rio Grande municipality in the state of Paraná, south of Brazil. Animals were enrolled into two groups according to the diagnosis of equine asthma. Six horses presented with cough and were confirmed as having severe asthma (n = 4) and mild asthma (n = 2) on subsequent examination of the BALF, and enrolled in the asthma group (AG). Six healthy horses, without reports of cough, which were negative to cough reflex and had no history of respiratory disease on physical examination, made up the healthy group (HG).

PHYSICAL EXAMINATION

The physical examination included inspection cardiac, tracheal, and pulmonary auscultations; cough stimulation and rectal temperature measurement. Animals that had cough reports were referred for BALF collection for further differential cytology counts. All animals in the study had CS assessed at rest, based on respiratory rate, nasal discharge and flaring, pulmonary or tracheal crepitation, pulmonary or tracheal wheezes and abdominal lift adapted by Tesarowski et al.(1996).

Equine who presented increased respiratory rate, cough or reflex of positive cough with or without presence of nasal mucus and without concomitant fever (Kutasi et al., 2011) and neutrophilia $\geq 5\%$ in BALF (Hoffman, 2008; Cou  til et al., 2016) were considered with asthmatics.

COLLECTION AND PROCESSING OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID

Horses with coughing were fasted for at least 6 hours prior to collection, in order to perform sedation with intravenous (IV) detomidine (Eqdomin, 0.02mg/kg - Ourofino, São Paulo, Brazil) and IV pethidine hydrochloride (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brazil). BALF collection was performed with a silicon catheter (3 m x 10 mm) (V-300 PBAL-300, Cook Vet Products, Hamburg, Germany) that was introduced intranasally, and four 125mL aliquots of sterile warm (37  C) 0.9% sodium chloride solution (Hoffman, 2008) were infused and immediately retrieved. In the laboratory, the BALF was centrifuged (350g at 4  C for 6 min), and the cell pellet was resuspended in 2mL of the BALF supernatant from the same animal to obtain the total nucleated cell count. Cell counting was performed using a Neubauer chamber, and differential cytological analysis was performed using slides stained with Diff-Quick (Panótico Rápido, Laborclin, Paraná, Brazil) and counting 300 cells under 1000x magnification (Olympus Cx31 trino).

HORSE GRIMACE SCALE EVALUATION

The animals were removed from the pickets, and after 15 minutes of rest in the shade, were filmed for approximately 30 seconds at rest (contained by halter) and had

HR and RR measured. The horses were then walked for 60 seconds and then filmed for approximately 30 seconds, and their HR and RR were measured again.

The filming was done in the morning, between 08h00 and 10h00, at a temperature varying between 20°C and 30 °C and humidity of between 75% and 90%. The aim of filming was to record the facial expression of each horse; this was always performed by the same people, in order to minimize interference.

Each animal was evaluated by five veterinarians trained in the HGS. Six facial characteristics were investigated: ears held stiffly backwards, orbital tightening, tension above the eye area, prominent strained chewing muscles, mouth strained with pronounced chin, and strained nostrils with flattening of the profile. Each facial characteristic was scored using a 3-point scale (0= not present, 1= moderately present, 2= obviously present), resulting in a maximum possible HGS score of 12 per animal, before and after exercise (60 seconds walk). The value that appeared two or more times in each item was adopted as a result.

STATISTICAL ANALYSIS

To compare the agreement between the evaluators, a Kappa index was used, and inter-observer reliability was assessed using intra-class correlation coefficients. To obtain the differences in pain score before and after exercise, a paired-sample t-test was used. To obtain the correlation between samples, Spearman's rank-order correlation was used. These analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., CA, USA). For all of the analyses, $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

In AG horses cytological changes in BALF were compatible with severe asthma and mild asthma (Table1), with an increased number of inflammatory cells and reduced number of macrophages.

ANIMAL	INSULATED VOLUME (mL)	RECOVERED VOLUME (mL)	RECOVERED VOLUME (%)	CLINICAL SCORE (CS)	MA (%)	LYM (%)	NEU (%)	EO (%)	MC (%)	GC (%)
HORSE 1	500	140	28	16	32	8	59	0	0	1
HORSE 2	500	230	46	17	39	16	43	0	1	1
HORSE 3	500	310	62	7	23	16	52	0	1	8
HORSE 4	500	175	35	13	22	11	64	0	0	3
HORSE 5	500	130	26	4	37	56	6	1	0	0
HORSE 6	500	323	64,6	4	44	41	13	1	0	1

Table 1 – Bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic horses. Individual percentage of recovered volume, and of different cell types in bronchoalveolar lavage fluid, and clinical score of horses with asthma. MA – macrophage, LYM –lymphocyte; NEU – neutrophil; EO – eosinophil; MC – mast cell; GC – Giant cell.

The Kappa index shows the concordance between all evaluators in the three categories (0= not present, 1= moderately present, 2= obviously present). On stiffly backwards ears, the general agreement was 0.353 ($p<0.001$); for the general values of Kappa interpretation, this is considered fair agreement. There was significant agreement in categories 0 and 1, with $p<0.001$ for both.

On tension above the eye area, the general agreement was 0.222 ($p<0.001$), considered fair agreement on Kappa interpretation. There was significant agreement in categories 0 and 1, with $p<0.001$ for both.

On mouth strained and pronounced chin, the general agreement was 0.162 ($p=0.001$), which is considered poor agreement on Kappa interpretation. There was significant agreement in categories 0 and 1, with $p<0.001$ and $p=0.024$, respectively.

On orbital tightening, the general agreement was 0.412 ($p<0.001$), considered moderate agreement on Kappa interpretation. There was significant agreement in categories 0 and 1, with $p<0.001$ in both.

On prominent strained chewing muscles, the general agreement was 0.199 ($p=0.002$), considered poor agreement on Kappa interpretation. There was significant agreement in categories 0 and 1, with $p= 0.002$ in both.

On strained nostrils and flattening of the profile, the general agreement was 0,307 ($p= 0.001$), considered fair agreement on Kappa interpretation. There was significant agreement in categories 0 and 1, with $p<0.001$ and $p= 0.014$, respectively.

The CS showed a significant difference between healthy animals and asthmatic animals (Figure 1A). Likewise, there was a significant difference in the pain score measured by the HGS (Figure 1B) between healthy and asthmatic animals, both before and after 60 seconds of walking.

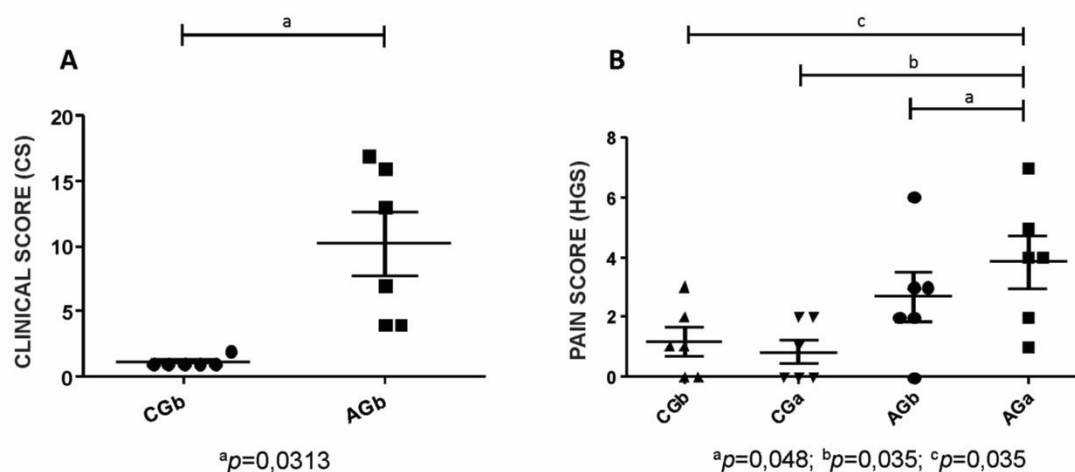


Figure 1 – Clinical score (CS) and facial pain in horses with and without asthma. A - Measurement of CS adapted by Tesarowski *et al.* (1996) in horses with and without asthma at rest; B - Measurement of pain in horses with and without asthma through application of the horse grimace scale (HGS). CGa – Healthy Group after exercise; AGa – Asthmatic Group after exercise; CGb – Healthy Group before exercise; AGb – Asthmatic Group before exercise.

In addition to the differences previously presented, there was a positive correlation between the pain score (HGS) and the HR, RR and CS parameters. All correlations were positive, where HGS vs. HR had a correlation force of 41% ($p=0,047$), HGS vs. RR had a correlation force of 62% ($p=0,008$) and HGS vs. CS had a correlation force 58,7% ($p=0,045$).

DISCUSSION

In healthy horses, macrophages represent 50–70% and neutrophils 5% of BALF cells, whereas lymphocytes can range between 30% and 50% (Hoffman, 2008). All horses in the AG had increased neutrophils and reduced macrophages. One of the

horses with mild asthma presented few clinical signs and, in addition to a slight increase in neutrophils in BALF, also showed a percentage of lymphocytes above the reference values for healthy horses.

Some asthmatic horses may or may not have obvious clinical signs; similarly, laboratory changes may be subtle (Bond et al., 2018) when compared with reference values for each disease, in this case severe asthma and mild asthma. The estimate of the occurrence of severe asthma in horses is 14%, while the apparent estimate (by questionnaires to owners of asthmatic horses) is 24.2% (Hotchkiss et al., 2007). This denotes a difference between real values found by veterinarians and probable values described by the owners.

Asthma leads to physiological changes that can be observed and measured such as nasal flaring, increase in RR and respiratory effort. These criteria can generate a clinical score and guide the veterinarian on complementary examinations and definitive diagnosis. This CS was significantly higher in asthmatic animals than in non-asthmatic animals, showing that there were more respiratory physiological changes in the asthmatic group. According to the composite pain scale, alterations equal to or greater than 10% in heart and respiratory rhythms may represent a pain score (Bussieres et al., 2008). This change was observed in the asthmatic group. A 60 seconds walk should not represent physical exertion for a horse, especially as this animal is accustomed to walking while grazing, however for asthmatic animals the reality was different.

Although there are records of facial and body expressions with rich detail, it is appropriate that the facial expression be assessed in a punctual way, characteristic by feature, because the evaluation becomes more accurate and reliable (Wathan et al., 2015). From this were the HGS demonstrated simplicity and objectivity in their evaluation criteria, which allows many to have access to a rapid and correct assessment of facial expression of animals.

Measurements of pain, discomfort, thirst, lack of air, among other parameters that evaluate animal welfare, are based on knowledge of animal physiology; therefore, any

evaluator with knowledge, criteria and impartiality can use the scales for these measurements. However, it is possible that the temperament of the animal influences evaluation of their physical and mental state, since naturally more aggressive or agitated animals may present quite distinct characteristics compared to calm animals experiencing the same treatment (Wagner, 2010).

The feeling of "breathlessness" is an unpleasant experience and can compromise the welfare of any equine (Mellor et al., 2017), so the discomfort of a horse with asthma can be considered a fundamental issue. Although the shortness of breath is extremely uncomfortable, there are no reports of measurement of discomfort in horses with shortness of breath. This can cause many cases of respiratory distress to be overlooked, or treated very subjectively.

In order for the evaluation to be able to meet a large number of evaluated animals and trained people to perceive and punctuate alterations of facial expression in horses, it is important that there is agreement among the evaluators. The Kappa index showed that there was significant agreement between the evaluators on each item evaluated. This shows that the results obtained are reliable, and there is similarity between the evaluations made by the five evaluators with experience in HGS, it can be extended to other trained evaluators. The use of a scale for measuring pain or discomfort has some advantages over a purely subjective system, and without predefined standards: (1) increased ability of the observer to recognize and quantify pain, (2) increased interobserver agreement, (3) awareness of animal pain treatment adequacy, and (4) ability to monitor and document progress of the patient's condition (Wagner, 2010). In this way, it is possible to establish, in an objective way, valuations of the respiratory discomfort, which facilitates the decision making regarding the treatment and management of horses. In addition to showing the importance of measurement of respiratory discomfort in horses (60 seconds walk), this study showed that minimum physical exertion can represent a significant change in the physiological parameters of asthmatic horses.

Finally, there was a positive correlation between the parameters of HGS, HR, RR and CS. Thus, it is clear that the increase in the pain score is directly related to the increase in HR, RR and CS. This shows that there may be systemic changes, not just respiratory changes, in asthmatic horses which may contribute to a feeling of discomfort.

CONCLUSIONS

Horses with asthma presented changes in facial expression compatible with the changes suggested in the HGS, being compatible with pain or discomfort. These changes could be noticed and scored, allowing a discomfort monitoring objectively.

Although HGS has been shown to be effective in assessing respiratory distress in asthmatic equines, more studies are needed with a larger number of animals, since there are still subjective criteria (evaluator, animal temperament, severity of the disease) and variability of clinical signs and tolerance to physiological changes caused by the disease in animals.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. All authors contributed to the development of the study, and likewise read and approved the final version of the manuscript.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), number 1038 (June 2016).

REFERENCES

Bond S, Léguillette R, Richard EA, Couëtil L, Lavoie JP, Martin JG and Pirie RS 2018. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(6), 2088-2098.

- Bussieres G, Jacques C, Lainay O, Beauchamp G, Leblond A, Cadoré JL and Troncy E 2008. Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Research in veterinary science*, 85(2), 294-306.
- Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R and Richard EA 2016. Inflammatory airway disease of horses—revised consensus statement. *Journal of veterinary internal medicine*, 30(2), 503-515.
- Dalla Costa E, Minero M, Lebelt D, Stucke D, Canali E and Leach MC 2014. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. *PLoS one*, 9(3), e92281.
- Hoffman AM 2008. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24,423–435.
- Hotchkiss JW, Reid SWJ and Christley RM 2007. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine veterinary journal*, 39(4), 301-308.
- Kutasi O, Balogh N, Lajos Z, Nagy K, Szenci O. Diagnostic approaches for the assessment of equine chronic pulmonary disorders. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2011; 31(7):400-10.
- Lara M, Edelen MO, Eberhart NK, Stucky BD and Sherbourne CD 2014. Development and validation of the RAND Asthma Control Measure. *European Respiratory Journal*, 44(5), 1243-1252
- Leclere M., Lavoie-Lamoureux A and Lavoie JP 2011. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*, 16(7), 1027-1046.
- Tesarowski DB, Viel LL, and McDonnell WN 1996. Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *American Journal of Veterinary Research*, 57, 1214–1219.
- Wagner AE 2010. Effects of stress on pain in horses and incorporating pain scales for equine practice. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(3), 481-492.
- Wathan J, Burrows AM, Waller BM and McComb, K. Equi FACS: the equine facial action coding system. *PLoS one*, 10(8), e0131738 - 2015.

CAPÍTULO 2

Artigo: INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE CAVALOS ASMÁTICOS DESAFIADOS COM ZIMOSAN E LPS

RESUMO

INTRODUÇÃO: A asma equina é uma enfermidade multifatorial que acomete cavalos expostos a aeroalérgenos. Pode ser induzida com poeira, esporos de bactérias ou fungos *in vivo* ou *in vitro* e as células que orquestram a resposta inflamatória da asma são os macrófagos e neutrófilos. **OBJETIVOS:** Avaliar os efeitos do desafio celular com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS – Lipopolysaccharides derivado de *Escherichia coli*) e Zimosan (ZIM - Zymosan derivado de *Saccharomyces cerevisiae*) em macrófagos alveolares (MA) e macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados dois asmáticos e um saudável, todos mantidos a pasto. Os animais foram examinados e tiveram lavado broncoalveolar (LBA) e sangue periférico colhidos, de onde foram isolados MA e MSP respectivamente, e sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços colocados 200µL (5×10^6 células/mL) desafiados com 100µL LPS (100ng/mL) e ZIM (100mg/mL). Em seguida foram desidratadas em etanol 35%, 50%, 70%, 100% e Hexametildisilazano por 10 minutos. Metalizadas com ouro por 120 segundos e posteriormente visualizadas no microscópio eletrônico de varredura. **RESULTADOS:** Houve diferença significativa na área celular entre MA+ZIM vs. MA ($p < 0,0001$), MA+ZIM vs. MA+LPS ($p = 0,003$), MSP+ZIM vs. MSP ($p < 0,0001$) e MSP+ZIM vs. MSP+LPS ($p < 0,0001$). Assim também ocorreu no índice de espraiamento entre MA+ZIM vs. MA+LPS ($p = 0,0001$) e MSP+ZIM vs. MSP+LPS ($p < 0,0001$), porém não houve diferença entre os grupos no índice comprimento/largura. **CONCLUSÃO:** O zimosan pode ser uma alternativa como agente de ativação celular usado em estudos com macrófagos, uma vez que provocou alterações à morfologia destas células, compatíveis com alterações que ocorrem em processos inflamatórios.

Palavras chave: asma equina, indução da inflamação, desafio celular, macrófagos alveolares.

INTRODUÇÃO

A asma equina é uma enfermidade multifatorial que acomete cavalos expostos à poeira, aeroalérgenos e ambientes de pouca ventilação, se assemelhando bastante à asma humana (Pirie et al., 2003). Assim como em humanos, a asma leve é em geral associada à presença de eosinófilos e mastócitos enquanto a asma grave à presença significativa de neutrófilos no pulmão (Bond et al., 2018).

Os macrófagos alveolares são células de defesa residentes nos pulmões (Hoffman 2008) e tem um papel importante na depuração e no reconhecimento de partículas inaladas (Muehlmann et al., 2012). Essa capacidade dos macrófagos de reconhecer e reagir a substâncias presentes na poeira orgânica é mediada por receptores do tipo *Toll* (*Toll-like receptors* - TLRs), que estão associados à ativação de fator nuclear (NF) kB e a liberação inicial de TNF- α e IL-1 β (Laan et al., 2005).

As demais citocinas liberadas em resposta à ativação dos TLRs de macrófagos promovem o recrutamento de outros macrófagos e linfócitos, onde os linfócitos se diferenciam em T auxiliares ou *helpers* (Th) tipo 1 ou 2 dependendo do perfil de interleucinas secretadas (Ferraz et al., 2015).

Os macrófagos podem ser ativados por duas vias distintas, a via clássica ou a via alternativa, o que vai determinar se seu fenótipo será tipo M1 ou M2 (Saradna et al., 2018). Os macrófagos M1 tem grande efeito citotóxico e são eficientes contra agentes agressores, sua ativação é mediada por estímulos como IFN- γ , TNF- α e LPS (perfil Th1). A ativação alternativa do macrófago é mediada pela IL-4, IL-10 e IL-13 (perfil Th2), originando macrófagos M2, que

promovem a limpeza de detritos e o aumento da contratibilidade do músculo liso, o que contribui para a expulsão de patógenos (Neves 2015).

A adesão dos macrófagos é fundamental para sua migração e atividade fagocitária e todos estes processos dependem da remodelação do citoesqueleto e tem proteínas reguladoras em comum, estas são capazes de direcionar a adesão e ativação celular (Zaveri et al., 2014). É possível que TLR2 e TLR4 façam a mediação e a transdução de sinais que levam ao espriamento e à polarização de macrófagos (Lasunkaia et al., 2006, Wenzel et al., 2011).

Para o melhor entendimento da asma e suas vias de ativação, agentes fúngicos e bacterianos são frequentemente empregados nos desafios de grupos celulares envolvidos nesta enfermidade (Laan et al., 2005), dentre eles estão o *Aspergylus Fumigatus* e o lipopolissacarídeo derivado de *Escherichia coli* (LPS) (Calzetta et al., 2018; Guerra et al., 2017; Waldschmidt et al., 2013).

O LPS é um glicolípídeo que constitui a maior fração não-proteica da parede de bactérias gram-negativas (Nair, G. B., & Takeda 1997). Na asma a presença de LPS é reconhecida por TLRs4 (Ferraz et al., 2011).

O zimosan é uma fração de levedura, contendo polissacarídeos comumente usados para avaliar a atividade fagocitária de macrófagos (Michelotto et al., 2010; Dyrinda et al., 1998). Ao entrar em contato com os macrófagos alveolares, o reconhecimento deste antígeno é em geral, feita por TLRs2 e TLRs6, (Ferraz et al., 2015). O zimosan vem sendo empregado para a realização de desafios celulares (Sato et al., 2003; Guerra et al., 2017), no entanto não são encontrados relatos de sua utilização para estudos relacionados à asma equina.

Como as vias de ativação variam conforme o antígeno envolvido, é possível que o emprego de diferentes agentes na indução da inflamação proporcione diferentes respostas celulares, o que pode ser bastante importante em estudos da asma equina. Assim, a hipótese do presente estudo é que o zimosan promove ativação de macrófagos alveolares e aumento da área celular e índice de espalhamento destas células.

OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do desafio celular com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS – Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4 – Sigma Aldrich, Estados Unidos) e Zimosan (ZIM - Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae*-Sigma-Aldrich, Estados Unidos) sobre a morfologia de macrófagos alveolares (MA) e macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos.

ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob os números 788 e 1038.

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foram utilizados três cavalos, sendo dois com asma grave (machos, com 28 e 30 anos de idade) e um saudável (fêmea, com 6 anos de idade), pesando entre 350kg e 500kg do plantel de equinos da Unidade Hospitalar de Equinos – UHE da Fazenda Experimental Gralha Azul da PUCPR, localizada no município de Fazenda Rio Grande – PR.

Todos os cavalos eram mantidos a pasto, com livre acesso à água e recebiam feno a vontade e ração peletizada uma vez ao dia. Eram vacinados contra tétano, raiva, influenza equina, Herpes vírus 1 e 4 e encefalomielite equina.

Os animais foram examinados e tiveram lavado broncoalveolar (LBA) e sangue periférico colhidos. O LBA foi utilizado para a avaliação citológica diferencial e para o isolamento dos MA. O sangue periférico foi utilizado para o isolamento de monócitos e subsequentemente de MSP. Após a obtenção de MA e MSP, estes foram desafiados com LPS e ZIM.

Cumprido o desafio, os MA e MSP foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a mensuração de comprimento, largura e área, bem como o cálculo dos índices de espraiamento e comprimento/largura.

EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS

O exame clínico abrangeu o histórico de cada animal, exame físico com inspeção, ausculta cardíaca e respiratória e aferição da temperatura retal. Todos os animais do estudo foram pontuados a partir de uma escala adaptada de Tesarowski et al. (1996), conforme a avaliação dos seguintes sinais clínicos: frequência respiratória, secreção nasal, linha de esforço abdominal, dilatação nasal, sons traqueais, sons bronquiais, crepitação, sibilo e ressonância torácica. Foram considerados animais com o fenótipo da asma grave, equinos com expiração abdominal prolongada, tosse com ou sem presença de muco nasal e sem febre concomitante (Kutasi et al., 2011), pontuação acima de 6 no escore clínico (Tesarowski et al., 1996) e neutrofilia $\geq 25\%$ no LBA (Couëttil et al., 2016).

ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE SANGUE PERIFÉRICO

Foram coletados aproximadamente 60mL de sangue periférico obtidos por venopunção da veia jugular, em uma única seringa de 60mL com 10% de heparina sódica 5000UI/mL (Hemofol®, Cristália, São Paulo, Brasil). As amostras foram processadas em câmara de fluxo laminar, filtradas em malha de

100µm (Cellstrainer, BD®) e colocadas em tubos cônicos de 50mL e em seguida centrifugadas a 450g por 10 minutos para a formação do anel de leucócitos.

O anel de leucócitos foi diluído 1:1 em RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute - Sigma-Aldrich, St. Louis. Missouri, Estados Unidos) e colocado sobre o gradiente de densidade Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis. Missouri, Estados Unidos) e novamente centrifugado a 650g por 30 minutos, onde ocorre a formação do anel de células mononucleares. Este foi cuidadosamente pipetado e colocado em tubo cônico de 50mL com RPMI, posteriormente centrifugado a 400g por 10 minutos, onde se obteve o botão de células mononucleares. O sobrenadante foi descartado e o botão foi ressuspensionado em aproximadamente 3mL de IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma-Aldrich, St. Louis. Missouri, Estados Unidos), de onde 10µl foram retirados para a contagem celular pós isolamento, feita na câmara de Neubauer.

As células foram colocadas em garrafas de cultivo de 75cm² na quantidade que variou entre 550 a 800 mil células por cm², diluídas em 10mL de RPMI com 10% de SFB. Foram deixadas para aderir por um período médio de 18 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (adaptado de Raabe et al., 1998). Após o período de adesão o sobrenadante das garrafas foi descartado, as garrafas foram lavadas com 8mL de tampão fosfato-salino (PBS) e em seguida foi acrescentado 8mL de RPMI. As células foram descoladas da garrafa com o auxílio de um espalhador de células tipo *scraper*, por três vezes até que não houvesse mais células aderidas.

Os MSP foram colocados em tubos de 50mL e centrifugados a 450g por 10 minutos. Na sequência foram ressuspensionados em 3mL de IMDM para contagem, verificação da pureza e realização dos ensaios. A contagem de

células foi realizada em câmara de Neubauer e a pureza foi realizada com lâminas coradas com Diff-Quick (Panótico Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil) e contando 300 células com aumento de 1000 × (Olympus Cx31 trino).

COLETA E PROCESSAMENTO DE LBA

Os cavalos foram mantidos em jejum por no mínimo seis horas antecedentes à coleta para realizar a sedação com cloridrato de detomidina intravenosa (IV) (Eqdomin, 0,02mg/kg, Ourofino, São Paulo, Brasil) e cloridrato de petidina IV (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brasil).

A coleta do fluido do LBA foi realizada com uma sonda flexível de silicone marca Cook (V-PBAL-300, Cook Vet Products, Hamburg, Alemanha), de 300 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro. Esta foi introduzida via nasotraqueal até se alojar em um brônquio, quando o *cuff* na extremidade distal foi inflado com 10mL de ar. Utilizou-se 500mL de solução salina de cloreto de sódio 0,9% estéril pré-aquecida a 37°C (Hoffman, 2008), infundidos em alíquotas de 125mL e aspirados após cada alíquota. O material recolhido ficou acondicionado em gelo em tubos para centrífuga estéreis de 50mL até a chegada ao laboratório, para o processamento, cerca de duas horas após a coleta.

No laboratório, o fluido do LBA foi centrifugado a 340 *g* por seis minutos, a 4°C (Michelotto et al., 2010) e o botão de células obtido foi ressuspenso em 5mL do próprio sobrenadante. A contagem do número total de células nucleadas foi realizada na câmara de Neubauer, a partir do quadrante central maior foram contadas todas as células dos 25 quadrantes menores, posteriormente multiplicadas pelo volume da câmara (10µL) e pela diluição das amostras (5000µL) e a viabilidade das células foi verificada através da coloração das células com azul de Tripán, na proporção de 5 partes de células para 1 de azul

de Tripan, colocadas na câmara de Neubauer e contadas da mesma forma que a contagem total, onde as células mortas ficam coradas em azul e as células vivas não. A partir do botão de células, empregou-se 10 µL para a confecção de lâminas para a avaliação citológica, que foram coradas com a técnica de Romanowski (Panótico Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil) para contagem diferencial das células em aumento de 1000X (Olympus Cx31 trino).

DESAFIO CELULAR

Foram plaqueados 200µL de MA e MSP na concentração de 5×10^6 células/mL em poços de uma microplaca de 24 poços, em cima de lamínulas de vidro previamente dispostas na placa. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C, adaptado de Michelotto et al. (2010), favorecendo a adesão dos MA e MSP às lamínulas.

Decorridos o isolamento e adesão dos MA e MSP, foram acrescentados os indutores inflamatórios: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS – Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4 – Sigma Aldrich, Estados Unidos) e Zimosan (ZIM - Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae*- Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Os macrófagos foram desafiados com 100µl de LPS (100ng/mL - adaptado de Lohmann 2004) e ZIM (100mg/mL - adaptado de Camp et al., 1982), enquanto o grupo controle teve a adição de 100µl de PBS por poço. As placas foram incubadas por 60 minutos em estufa a 37°C, em seguida procedeu-se a preparação para a MEV.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após a última incubação, o sobrenadante foi descartado, e os poços foram lavados com PBS para proceder a posterior fixação das células (adaptado de Mobasser et al., 2017). As lamínulas foram imersas em uma solução de

glutaraldeído a 3%, obtido através da diluição do glutaraldeído 25% em água ultrapura (Glutaraldeído solução 25% P.S. – Dinâmica Química contemporânea – Indaiatuba - SP) por 120 minutos e posteriormente lavadas com PBS.

Em seguida foram desidratadas em etanol 35%, 50%, 70% e 100% por 10 minutos em cada solução. Para finalizar, as lamínulas foram colocadas por 10 minutos em Hexametildisilazano (HMDS – Sigma-Aldrich, St. Louis. Missouri, Estados Unidos). Após o processo de fixação e desidratação as lamínulas foram metalizadas com uma camada de ouro por 120 segundos no metalizador Quorum (Q150RES), para serem posteriormente visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (Tescan vega3 scanning electron microscope, República Tcheca), e capturadas e analisadas com o auxílio do programa Vega 3.

Com auxílio do programa Vega 3, foram manualmente traçadas linhas de cota e contorno celular mensurando as medidas de largura, comprimento e área de 20 células por animal, por grupo (MA+PBS, MA+LPS, MA+ZIM, MSP+PBS, MSP+LPS e MSP+ZIM), totalizando 120 células de cavalos asmáticos (A, n=40) e 60 células de um cavalo saudável (S, n=20), aleatoriamente escolhidas, com pelo menos uma das medidas acima de $9\mu\text{m}$ (Cowell e Tyler, 2001) com pseudópodos, para excluir a possibilidade de mensurar linfócitos ou polimorfonucleados que eventualmente tenham permanecido nas lamínulas, uma vez que as células passaram pelo processo de adesão e a grande maioria eram macrófagos.

Após estas mensurações foram estabelecidos dois índices para comparação: o índice de espraiamento celular e o índice de comprimento/largura. O índice de espraiamento foi estimado como uma relação de uma área celular média de células desafiadas com LPS e ZIM com a área

média de células não tratadas (PBS). Já o índice comprimento/largura das células foi determinado pela razão dos traçados manuais do comprimento em relação à largura de células selecionadas aleatoriamente (Lasunskaja et al., 2006).

As etapas de metalização, registros fotográficos e mensurações das células foram feitas no laboratório de Engenharia Mecânica da PUCPR, no município de Curitiba – PR.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística incluiu comparações entre grupos e desafios dentro de cada grupo.

Para as avaliações estatísticas foram utilizadas a análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Tukey de múltipla comparação e teste t student para a comparação entre grupos nos mesmos momentos de avaliação, utilizando GraphPadPrism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

RESULTADOS

ISOLAMENTO DE MSP

A média de MSP isolados após adesão ao plástico por aproximadamente 18 horas foi de 7,8%, e a pureza de macrófagos isolados foi de 95,4% com 4,6% de contaminação por linfócitos (tabela 01).

	Isolamento	Pureza do isolamento	
	MSP (%)	MSP (%)	LO (%)
Cavalo 1	16,24	96	4
Cavalo 2	4,94	96	4
Cavalo 3	4,79	98	2
MÉDIA	8,66	96,67	3,33
DESVIO PADRÃO	±6,57	±1,15	±1,15

Tabela 1 – Resultados obtidos a partir do isolamento e cultivo das células usadas nos ensaios. Porcentagem de isolamento de MSP; percentual de pureza dos MSP após a adesão por 18 horas em garrafas de cultivo. MSP – macrófagos derivados de sangue periférico; LO – linfócitos;

DESAFIO CELULAR e MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

É possível visualizar as diferenças nas dimensões (largura, comprimento e área) dos MA e MSP entre os grupos controle e os desafiados com LPS e ZIM (figura 01).

A mensuração da área celular dos grupos controle e desafiados por LPS e ZIM apresentou diferença estatística significativa entre eles (gráfico 01), porém quando os grupos foram analisados separadamente, ou seja, cavalo saudável versus cavalos asmáticos, os MA do cavalo saudável tiveram média de área significativamente maior do que os dos demais animais e não apresentou variação quando exposto ao LPS e ZIM, diferente dos MSP saudáveis, que apresentaram o mesmo comportamento dos MA e MSP asmáticos (gráfico 02).

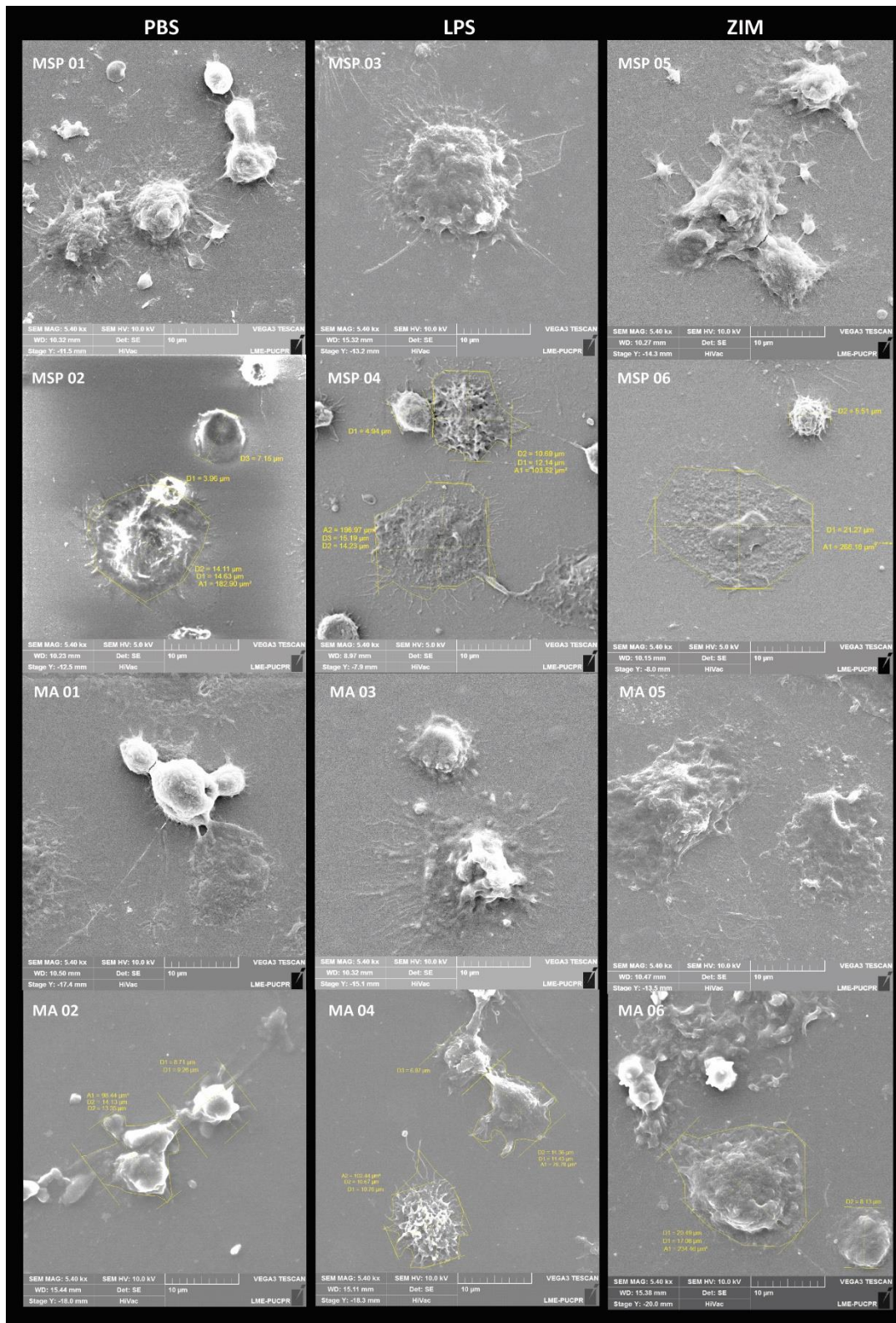


Figura 01: Diferenças morfológicas e dimensionais dos MA e MSP controle (PBS) e desafiados com LPS e ZIM. Células fotografadas em microscopia eletrônica de varredura e mensuradas com auxílio do software Vega 3 - TESCAN. MA - macrófagos alveolares; MSP - macrófagos derivados de sangue periférico; PBS - macrófagos desafiados com tampão fosfato-salino; LPS - macrófagos desafiados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*; ZIM - macrófagos desafiados com zimosan (Zymosan from *Saccharomyces*).

O índice de espriamento (gráfico 03) também apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, mas quando comparamos cavalo saudável versus cavalos asmáticos, os MA do cavalo saudável tiveram média de espriamento significativamente menor do que os MSP saudáveis e MA e MSP dos asmáticos desafiados por ZIM (gráfico 04).

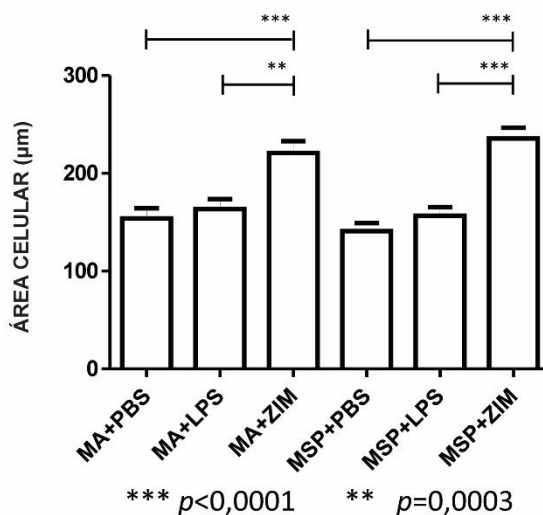


Gráfico 01 - Área dos macrófagos alveolares (MA) e dos macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* e Zimosan (ZIM) e mensurados a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

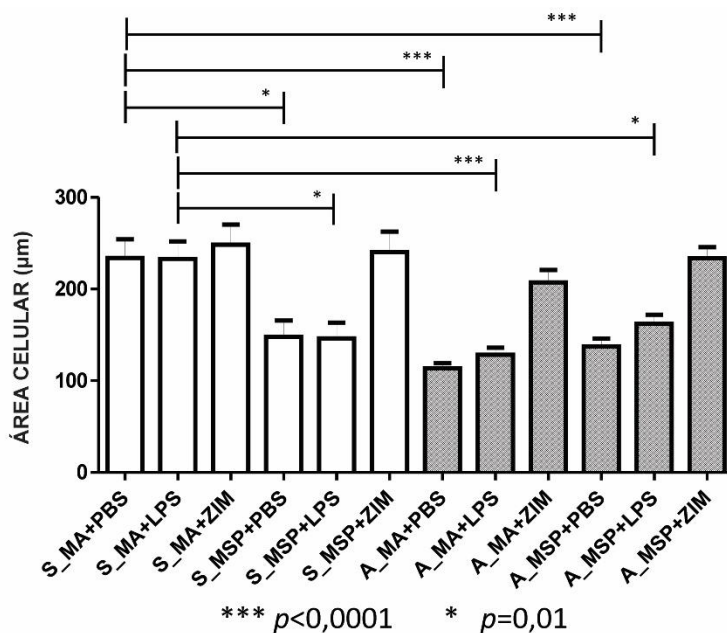


Gráfico 02 - Área dos macrófagos alveolares (MA) e dos macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos saudáveis vs. asmáticos, desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* e Zimosan (ZIM) e mensurados a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

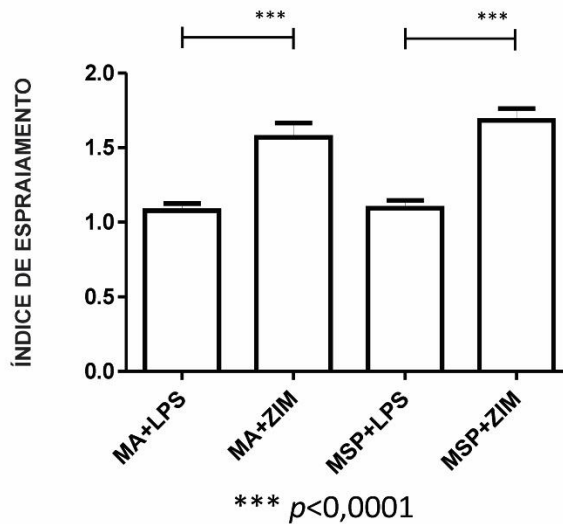


Gráfico 03 – Índice de espraiamento dos macrófagos alveolares (MA) e dos macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* e Zimosan (ZIM) e mensurados a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

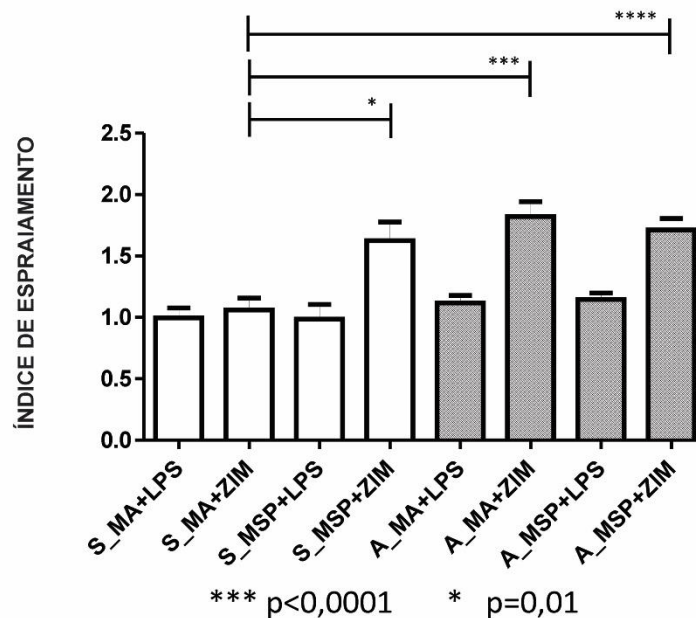


Gráfico 04 – Índice de espraiamento dos macrófagos alveolares (MA) e dos macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos saudáveis vs. asmáticos, desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* e Zimosan (ZIM) e mensurados a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

O índice de comprimento/largura, que pode ser usado para avaliar a deformidade ou crescimento desproporcional das células, não teve diferença estatística significativa entre os grupos e entre os desafios (gráfico 05).

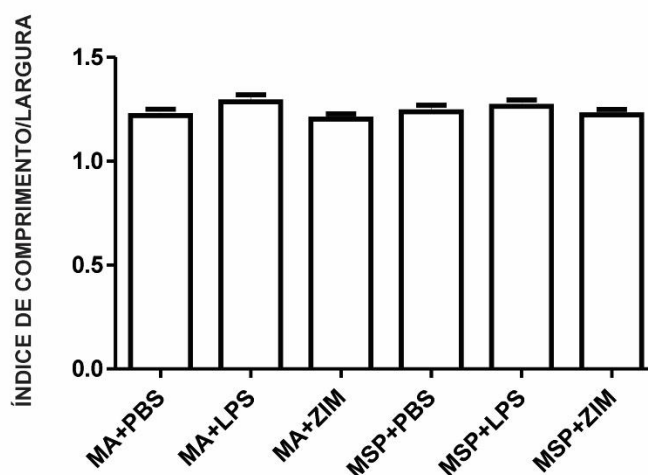


Gráfico 05 – índice de comprimento/largura dos macrófagos alveolares (MA) e dos macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* e Zimosan (ZIM) e mensurados a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

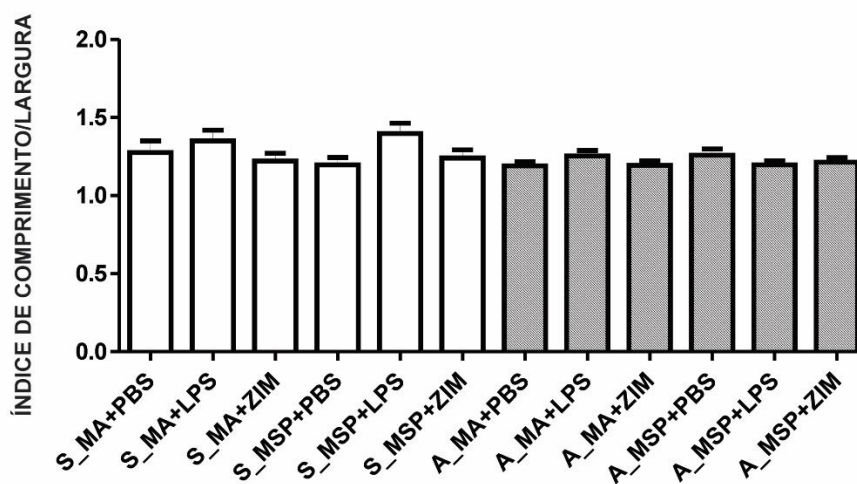


Gráfico 06 – índice de comprimento/largura dos macrófagos alveolares (MA) e dos macrófagos derivados de sangue periférico (MSP) de equinos saudáveis vs. asmáticos, desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (LPS) e Zimosan (ZIM) e mensurados a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

DISCUSSÃO

A quantidade de células mononucleares derivadas de sangue periférico colocada para o isolamento de MSP foi inferior a 1×10^6 células/cm² e a média de recuperação de MSP que aderiram ao plástico foi de 7,8%. Há indicação para

colocar 5×10^6 células/cm² (Du et al., 2015), mas o valor de recuperação não foi referido, assim como em outros trabalhos. O grau de pureza atingido no presente estudo foi de 95,4%. Ocorre que poucos trabalhos divulgam o percentual de isolamento de MSP, sendo que em dois deles este percentual foi de 97% (Moore et al., 2003) a quase 100% (Raabe et al., 1998).

Em humanos, o padrão ouro de isolamento é pelo método eletromagnético onde se obtêm cerca de 95% de pureza, enquanto o referido pelo método de gradiente de densidade (que foi o mesmo utilizado no presente estudo) é de 87% (Zhou et al., 2012).

Agentes desencadeadores da asma equina são empregados de forma sistemática em diversos estudos envolvendo MA e MSP. Trabalhos mostram a utilização de LPS e *Aspergillus fumigatus* para estudos *in vitro* e *in vivo* (Calzetta et al., 2018, Ivester et al., 2014; Laan et al., 2005). Desta forma, este trabalho usou o zimosan como uma alternativa de agente fúngico para ativação celular e estabeleceu uma comparação entre ele e uma metodologia já utilizada com LPS, ambos *in vitro*. Para verificar a ativação dos MA e MSP provocada por zimosan e LPS, foi utilizada a observação das células por MEV, verificando possíveis alterações morfológicas ao desafio.

A alteração morfológica envolve um rearranjo do citoesqueleto celular, mecanismo envolvido na migração e atividade celular induzida por processos inflamatórios (Lasunskaja et al., 2006). O aumento do espriamento causado por LPS já é conhecido (Wenzel et al., 2011), porém não foi anteriormente descrito utilizando o zimosan. As alterações morfológicas não ocorreram ao avaliarmos os animais separadamente, quando a morfologia dos MA do animal saudável

diferiram da dos MSP do mesmo animal ou ainda MA e MSP dos animais asmáticos.

Os resultados gerais demonstraram que o zimosan foi capaz de induzir ativação dos MA e MSP, demonstrada pelo aumento da área e do espraiamento celular, ambos envolvidos no processo de adesão e fagocitose. Houve ainda um aumento significativo nas dimensões (largura e comprimento) das células desafiadas pelo zimosan, quando comparados aos outros grupos.

É importante ressaltar que existe a possibilidade de que as alterações sejam dose-dependentes. No entanto o foco do presente trabalho foi avaliar a eficiência do zimosan para causar alterações morfológicas nos MA e MSP, usando a metade da dose referenciada por Camp e colaboradores (1982) em experimentos de quimiotaxia em células inflamatórias de equinos. Desta forma, a dose proposta pelo estudo se mostrou efetiva.

CONCLUSÃO

A utilização de diferentes agentes indutores de inflamação em estudos da asma *in vitro* podem ajudar a compreender as diversas respostas à doença e escolhas terapêuticas. Neste contexto, o zimosan pode ser uma alternativa já que foi capaz de promover a ativação de MA e MSP demonstrada por alterações morfológicas envolvidas na adesão e fagocitose executadas por estas células

REFERÊNCIAS

Bond S, Léguillette R, Richard EA, Couetil L, Lavoie JP, Martin JG and Pirie RS. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *Journal of veterinary internal medicine*. 2018; 32(6), 2088-2098.

Calzetta L, Rogliani P, Pistocchini E, Mattei M, Cito G, Alfonsi P, Page C and Matera MG. Effect of lipopolysaccharide on the responsiveness of equine bronchial tissue. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2018; 49, 88-94.

Camp CJ and Leid RW. Chemotaxis of radiolabeled equine neutrophils. *American journal of veterinary research*. 1982; 43(3), 397-401.

Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R and Richard EA. Inflammatory airway disease of horses—revised consensus statement. *Journal of veterinary internal medicine*. 2016; 30(2), 503-515.

Cowell RL and Tyler RD. Diagnostic cytology and hematology of the horse. Elsevier Health Sciences. 2001.

Dyrynda EA, Pipe RK, Burt GR and Ratcliffe NA. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquatic Toxicology*. 1998; 42(3), 169-185.

Du C, Liu HF, Lin YZ, Wang XF, Ma J, Li YJ, Wang X and Zhou, JH. Proteomic alteration of equine monocyte-derived macrophages infected with equine infectious anemia virus. *Proteomics*. 2015; 15(11), 1843-1858.

Guerra ES, Lee CK, Specht CA, Yadav B, Huang H, Akalin A and Levitz SM. Central role of IL-23 and IL-17 producing eosinophils as immunomodulatory effector cells in acute pulmonary aspergillosis and allergic asthma. *PLoS pathogens*. 2017; 13(1), e1006175.

Hoffman AM. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2008; 24(2), 423-435.

Ivester KM, Couëtil LL and Zimmerman NJ. Investigating the link between particulate exposure and airway inflammation in the horse. *Journal of veterinary internal medicine*. 2014; 28(6), 1653-1665.

Kutasi O, Balogh N, Lajos Z, Nagy K, Szenci O. Diagnostic approaches for the assessment of equine chronic pulmonary disorders. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2011; 31(7):400-10.

Laan TT, Bull S, Pirie RS and Fink-Gremmels J. Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide, *Aspergillus fumigatus*, and

a suspension of hay dust. *American journal of veterinary research*. 2005; 66(9), 1584-1589.

Lasunskai EB, Campos MN, Andrade MR, DaMatta RA, Kipnis TL, Einicker-Lamas M and Da Silva WD. Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling. *Journal of leukocyte biology*. 2006; 80(6), 1480-1490.

Lohmann KL. Response of Equine Monocytes to Lipopolysaccharide from Enteric and Non-enteric Bacteria: Efficacy and Receptor Specificity. *Doctoral dissertation, University of Georgia*. 2004.

Michelotto JrPV, Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EWR, Fernandes LC and Nishiyama A. Platelet-activating factor and evidence of oxidative stress in the bronchoalveolar fluid of Thoroughbred colts during race training. *Journal of veterinary internal medicine*. 2010; 24(2), 414-419.

Mobasser R, Tian L, Soleimani M, Ramakrishna S and Naderi-Manesh H. Bio-active molecules modified surfaces enhanced mesenchymal stem cell adhesion and proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017; 483(1), 312-317.

Moore BD, Balasuriya UB, Watson JL, Bosio CM, MacKay RJ and MacLachlan NJ. Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF- α and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages. *Virology*. 2003; 314(2), 662-670.

Muehlmann LA, Michelotto JrPV, Nunes EA, Grando FCC, da Silva FT and Nishiyama A. PAF increases phagocytic capacity and superoxide anion production in equine alveolar macrophages and blood neutrophils. *Research in veterinary science*. 2012; 93(1), 393-397.

Raabe MR, Issel CJ and Montelaro RC. Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. *Journal of virological methods*. 1998; 71(1), 87-104.

Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Imaizumi H, Asai Y and Kuroki Y. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF- α secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *The Journal of Immunology*. 2003; 171(1), 417-425.

Tesarowski DB, Viel L and McDonell WN. Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *American journal of veterinary research*. 1996; 57(8), 1214-1219.

Waldschmidt I, Pirottin D, Art T, Audigié F, Bureau F, Tosi I, El Abbas S, Farnir F, Richard E and Dupuis MC. Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013; 155(1-2), 30-37.

Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP and Fuhler GM. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clinic Vaccine Immunology*. 2012; 19(7), 1065-1074.

CAPÍTULO 3

Artigo: COMPARAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA SOBRE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE EQUINOS COM ASMA

RESUMO

INTRODUÇÃO: A asma equina é uma inflamação crônica reversível bastante debilitante e embora os tratamentos controlem a inflamação a enfermidade permanece sem cura. **OBJETIVO:** Comparar a ação de células mononucleares autólogas e células estromais mesenquimais alogênicas, ambas derivadas de medula óssea, sobre macrófagos alveolares (MA) de equinos asmáticos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Cinco cavalos, com histórico de tosse e dificuldade respiratória tiveram o LBA colhido para o isolamento de MA desafiados com lipopolissacarídeo *Escherichia coli* (LPS) e Zimosan (ZIM - Zymosan A from *Saccharomyces*), tratados com dexametasona (5 μ M), células mononucleares derivadas de medula óssea (MNDMO - 1x10⁶células/mL) e células estromais mesenquimais (EMDMO - 1x10⁶células/mL). Foram avaliadas as atividades de adesão e fagocitose, concentração de nitritos, proteínas totais e interleucinas 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). **RESULTADOS:** Todos os animais apresentaram fenótipo de asma. A dexametasona reduziu fagocitose e MA+DEXA ($p=0,0317$), MA+LPS+DEXA ($p=0,0159$) e MA+ZIM+DEXA ($p=0,0079$) em relação aos MA. A concentração de proteínas foi maior nos grupos tratados com terapia celular MA+LPS+MNDMO ($p=0,0317$), MA+ZIM+MNDMO ($p=0,0159$), MA+LPS+EMDMO ($p=0,0079$) e MA+ZIM+EMDMO ($p=0,0079$) em relação aos MA. Houve redução da secreção de IL 1 β em MA+DEXA ($p=0,0317$), MA+LPS+DEXA ($p=0,0159$) e MA+ZIM+DEXA ($p=0,0159$) em relação as MA. A concentração de TNF α reduziu em todos os tratamentos mas foi significativo apenas em MA+DEXA ($p=0,0317$), MA+LPS+DEXA ($p=0,0317$) e MA+ZIM+DEXA ($p=0,0079$) em relação as MA. **CONCLUSÃO:** Os efeitos da terapia celular sobre os MA de cavalos asmáticos foram benéficos. Houveram diferenças em algumas respostas entre LPS e ZIM e MNDMO e EMDMO.

Palavras chave: asma equina, terapia celular, macrófagos alveolares

INTRODUÇÃO

A asma equina, assim como a asma humana, é uma inflamação crônica reversível das vias aéreas que pode ser bastante debilitante, caracterizada por broncoconstrição, dispneia e produção de muco (Fillion-Bertrand et al., 2019). Enquanto a forma leve da enfermidade é associada a cavalos jovens, a forma grave é associada a cavalos mais velhos (acima de 7 anos de idade), mas ambas podem ser desencadeadas pela constante exposição à poeira, fungos e bactérias, podendo ou não estar associada às pastagens (Bond et al., 2018).

Animais com asma leve podem ou não apresentar sinais clínicos, e quando ocorrem, normalmente são exacerbados durante ou logo após o exercício como tosse, cansaço e dispneia (Couëtil et al., 2016). Já os sinais clínicos apresentados por animais com asma grave costumam ser mais evidentes, envolvendo a presença de tosse espontânea, dispneia em repouso, intolerância ao exercício e presença da linha de esforço abdominal, que surge devido ao esforço expiratório (Kutasi et al., 2011).

A asma pode ser de fundo alérgico ou inflamatório e essa diferença está relacionada com o tipo de agente causal e com a ação imunológica frente ao agente (Froidure et al., 2015). A resposta à asma está associada a células dendríticas, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos (Kim et al., 2010).

Os macrófagos alveolares (MA), células de defesa residentes nos pulmões, são capazes de reconhecer antígenos pelo intermédio de receptores toll-like (TLRs) (Laan et al., 2006). Após o reconhecimento, os macrófagos liberam interleucinas capazes de atrair outros leucócitos, dentre eles novos macrófagos e linfócitos, que se diferenciam em T auxiliares ou *helpers* (Th) tipo 1 ou 2 dependendo do perfil de interleucinas secretadas (Ferraz et al., 2015).

Na asma alérgica há resposta tipo Th2, com liberação de IgE, influxo de mastócitos e recrutamento de eosinófilos (Froidure et al., 2015), enquanto na asma não alérgica não há liberação significativa de IgE, mas ocorre um aumento dos níveis de IL-17 e o recrutamento de neutrófilos (Raedler et al., 2015).

As vias de ativação da asma equina nem sempre apresentam uma resposta Th1 ou Th2 bem estabelecida (Lavoie-Lamoureux et al., 2010; Tessier et al. 2018) e é possível que isso esteja relacionado ao tipo de antígeno e as vias de ativação desencadeadas. O reconhecimento do polissacarídeo derivado de fungo (zimosan) por exemplo, em geral é feita por TLRs2 e TLRs6, enquanto o reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) bacterias gram-negativas ocorre por TLRs4 (Ferraz et al., 2015). Como a antígeno é capaz de influenciar as vias de ativação, é possível que influencie também na forma de apresentação da doença e na resposta terapêutica.

O diagnóstico definitivo baseia-se em sinais clínicos, endoscopia respiratória e coleta de lavado broncoalveolar (LBA), onde há o aumento do número de neutrófilos (Hoffman 2008), variando entre 5% e 20% na asma leve e mais de 25% na asma grave (Couëtil et al., 2016).

Embora os tratamentos convencionais, a base de corticosteroides, controlem a inflamação, podem causar efeitos adversos (Dauvillier et al., 2011), além disso a enfermidade permanece sem cura. Em humanos, há dados claros sobre pacientes refratários aos tratamentos (Hekking et al., 2015), o que não está bem estabelecido, mas também pode ocorrer em equinos. Assim, a terapia celular foi a opção escolhida por este grupo, pelos bons resultados terapêuticos em vários espectros da ciência.

As células mononucleares derivadas de medula óssea (MNDMO) se mostraram eficazes no tratamento da asma em equinos (Barussi et al., 2016), enquanto as células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (EMDMO) se mostraram eficazes em outros modelos de asma (Du et al., 2018; Firinci et al., 2011).

As EMDMO são potentes imunomoduladoras, promovendo liberação de citocinas e ativação do sistema imunológico (Cruz et al. 2012). A manipulação de células MNDMO é mais rápida e menos custosa quando comparada a de células EMDMO, uma vez que não exige cultivo.

Assim, este grupo buscou compreender de que forma a terapia com MNDMO e EMDMO pode interferir em algumas atividades desempenhadas pelos macrófagos alveolares (MA) de cavalos asmáticos, desafiados *in vitro* com diferentes antígenos.

OBJETIVO

Comparar a ação de células mononucleares autólogas e células estromais mesenquimais alogênicas, ambas derivadas de medula óssea, sobre macrófagos alveolares de equinos asmáticos desafiados *in vitro* com fragmentos de fungos e bactérias.

ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob os números 788 e 1038.

DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo avaliou a ação de células MNDMO e EMDMO, sobre MA desafiados com lipopolissacarídeo *Escherichia coli* (LPS) e Zimosan (ZIM - *Zymosan A from Saccharomyces*).

Foram usadas EMDMO provenientes de um único cavalo, doador saudável, que foram cultivadas e congeladas em estudo conduzido no ano de 2015. Cinco cavalos, com histórico de tosse, os quais também tinham medula óssea (MO) coletada no mesmo ano e a fração mononuclear estava devidamente separada e criopreservada a -192 °C desde 2015 (Bastos et al., 2017-b), tiveram o LBA colhido nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2018. O LBA foi utilizado para a avaliação citológica diferencial e para o isolamento de MA a serem utilizados nos ensaios em presença de LPS e ZIM (figura 01). O tampão fosfato-salino (PBS) foi usado como controle tanto para o desafio celular quanto para o tratamento.

Após isolados os MA, estes foram desafiados com LPS e ZIM por 60 minutos e posteriormente tratados com MNDMO, EMDMO e dexametasona, sendo posteriormente avaliados com relação à atividade em ensaios de adesão e fagocitose, e o sobrenadante dos poços avaliados foi utilizado para a dosagem de nitritos, dosagem de proteínas totais, dosagem de interleucinas IL1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α).

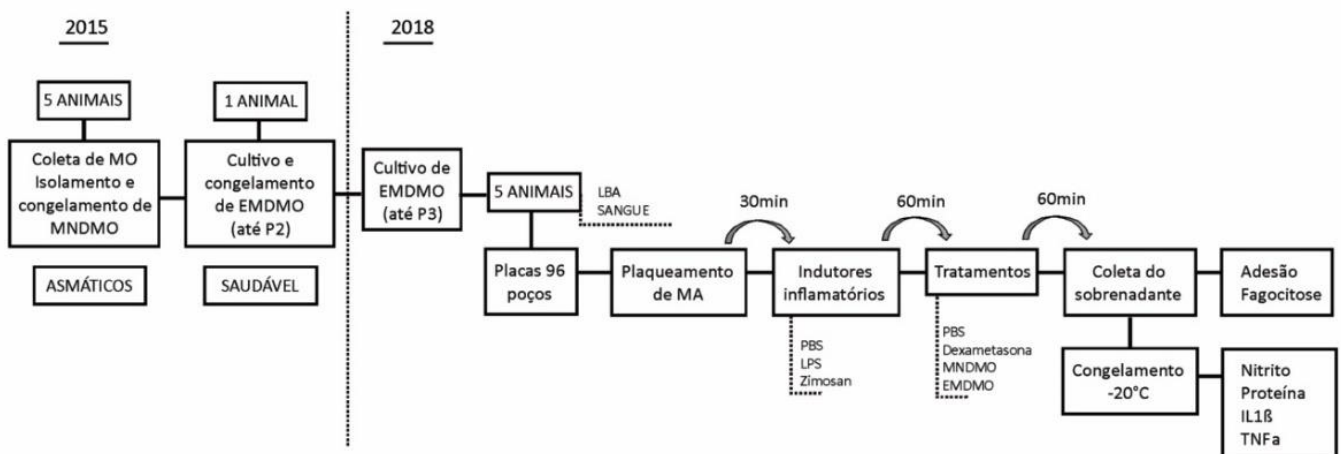


Figura 01 – Linha do tempo do estudo. Ilustração da realização dos ensaios realizados.

ANIMAIS

Foram estudados cinco cavalos, sem raça definida, duas fêmeas e três machos, pesando entre 350kg e 500kg e com idade entre 9 e 30 anos, do plantel de equinos da Unidade Hospitalar de Equinos – UHE da Fazenda Experimental Gralha Azul da PUCPR, localizada no município de Fazenda Rio Grande – PR, cavalos entre os meses de outubro e dezembro de 2018. Todos cavalos tinham queixa de tosse e três deles tinham histórico de asma grave.

Todos os cavalos eram mantidos à pasto, com livre acesso à água e recebiam feno a vontade e ração peletizada duas vezes ao dia. Eram vacinados contra tétano, raiva, influenza equina, Herpes vírus 1 e 4 e encefalomielite equina.

EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS

O exame clínico iniciou com o histórico de cada animal, seguindo de exame físico, com inspeção, ausculta cardíaca e respiratória e aferição da temperatura retal. Todos os animais do estudo foram pontuados segundo o escore desenvolvido por Tesarowski et al. (1996). Foram considerados animais com o fenótipo da asma grave, que são equinos que apresentaram expiração abdominal prolongada, tosse com ou sem presença de muco nasal e sem febre concomitante (Kutasi et al., 2011), pontuação acima de 6 no escore clínico conforme Tesarowskiet al. (1996) e neutrofilia $\geq 25\%$ no LBA (Couëtil et al., 2016).

COLETA DE MEDULA ÓSSEA, ISOLAMENTO E PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

A coleta de MO, bem como o isolamento e processamento das MNDMO foram executados em 2015 conforme descrito por Barussi e colaboradores

(2016). As MNDMO foram criopreservadas em nitrogênio líquido a $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 3 anos, descongeladas em 2018 para o presente estudo.

As EMDMO foram obtidas através do cultivo de MNDMO de um equino saudável e previamente coletadas e criopreservadas por aproximadamente 3 anos. As MNDMO foram plaqueadas em garrafas de cultivo de 75cm^2 , com filtro, em uma quantidade 1×10^6 células diluídas em 8mL de IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e 2mL de Soro Fetal Bovino (SFB), colocadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , onde permaneceram até atingir de 90 a 100% de confluência e assim foram passadas para novas garrafas de cultivo até atingir a terceira passagem (P3).

Para a realização das passagens, as células foram lavadas duas vezes com 8mL de PBS e em seguida passaram por dissociação enzimática com 5mL de tripsina (Trypsin-EDTA -0.25%-, phenol red - Thermo Fisher Scientific – Estados Unidos) por 4 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , após a tripsina, foram adicionados 2mL de SFB em cada garrafa, o conteúdo da garrafa foi retirado com pipeta e centrifugado a 400g por 10 minutos com 9 de freio e 9 de aceleração. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o botão de células resultante foi diluído em 2mL de IMDM. As células foram contadas em câmara de Neubauer a partir do quadrante central maior foram contadas todas as células dos 25 quadrantes menores, posteriormente multiplicadas pelo volume da câmara ($10\mu\text{L}$) e pela diluição das amostras ($5000\mu\text{L}$) e a viabilidade das células foi verificada através da coloração das células com azul de Tripán, na proporção de 5 partes de células para 1 de azul de Tripán, colocadas na câmara de Naubauer e contadas da mesma forma que a contagem total, onde as células mortas ficam coradas em azul e as células vivas não. Após a realização da

contagem total e viabilidade, as células foram plaqueadas até chegar em passagem desejada.

A partir de P3 as células foram retiradas das garrafas da mesma forma realizada anteriormente, ressuspensas para contagem e congeladas em criotubos em quantidades variadas entre 3 e 10×10^6 EMDMO por criotubo. O meio de congelamento era constituído de 20% SFB, 20% dimetilsulfóxido (DMSO) e 60% de IMDM. As células foram ressuspensas no meio de congelamento em banho de gelo. Armazenado em criotubos acondicionados a -80°C por 24 horas e depois transferidos para o nitrogênio líquido a -192°C até o momento da realização dos ensaios.

COLETA E PROCESSAMENTO DE LBA

Os cavalos foram mantidos em jejum por no mínimo seis horas antecedentes à coleta. A sedação com cloridrato de detomidina intravenosa (IV) (Eqdomin, 0,02mg/kg, Ourofino, São Paulo, Brasil) e cloridrato de petidina IV (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brasil).

A coleta do fluido do LBA foi realizada com uma sonda flexível de silicone marca Cook (V-PBAL-300, Cook Vet Products, Hamburg, Alemanha), de 300 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro. Esta foi introduzido via nasotraqueal até se alojar em um brônquio, quando o *cuff* na extremidade distal foi inflado com 10mL de ar. Utilizou-se 500mL de solução salina de cloreto de sódio 0,9% estéril pré-aquecida a 37°C (Hoffman, 2008), infundidos em alíquotas de 125mL e aspirados após cada alíquota. O material recolhido ficou acondicionado em gelo em tubos para centrífuga estéreis de 50mL até a chegada ao laboratório, para o processamento, cerca de duas horas após a coleta.

No laboratório, o fluido do LBA foi centrifugado a 340 g por seis minutos, a 4°C (Michelotto et al., 2010-b) e o botão de células obtido foi ressuspensionado no próprio sobrenadante. A contagem do número total de células nucleadas foi realizada na câmara de Neubauer, a partir do quadrante central maior foram contadas todas as células dos 25 quadrantes menores, posteriormente multiplicadas pelo volume da câmara (10µL) e pela diluição das amostras (5000µL) e a viabilidade das células foi verificada através da coloração das células com azul de Tripán, na proporção de 5 partes de células para 1 de azul de Tripán, colocadas na câmara de Neubauer e contadas da mesma forma que a contagem total, onde as células não viáveis ficam coradas em azul e as células viáveis não.

A partir do botão de células de células, empregou-se 10 µL para a confecção de lâminas para a avaliação citológica, que foram coradas com a técnica de Romanowski (Panótico Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil) para contagem diferencial das células em aumento de 1000X (Olympus Cx31 trino). Duas alíquotas de 2mL do sobrenadante do fluido do LBA foram separadas na fase de centrifugação e congeladas a -20°C para análises futuras.

ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

Após a contagem do número total de células obtidas no LBA, a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 5×10^6 células viáveis/mL. Foram plaqueados 100µL da suspensão ajustada em poços de uma microplaca de 96 poços, em triplicata para cada ensaio a ser realizado. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C, adaptado de Michelotto et al. (2010-b), favorecendo a adesão dos MA ao plástico.

DESAFIO CELULAR

Decorridos o isolamento e adesão dos MA, as células foram desafiadas acrescentando 50µl/poço de indutores inflamatórios: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS – Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4 – Sigma Aldrich, Estados Unidos) na concentração de 100ng/mL (adaptado de Lohmann 2004) e Zimosan (ZIM - Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae*-Sigma-Aldrich, Estados Unidos), na concentração de 100mg/mL (adaptado de Camp et al., 1982). As placas foram incubadas por 60 minutos em estufa a 37°C, em seguida procederam-se os tratamentos.

TRATAMENTOS

Os tratamentos testados foram: dexametasona injetável (DEXA- 0,5µM) (Déxium® - Chemitec, São Paulo, Brasil), células mononucleares derivadas de medula óssea autólogas (MNDMO – 1x10⁶células/mL), células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea alogênicas (EMDMO1x10⁶células/mL). Os tratamentos foram plaqueados em uma quantidade de 100µl por poço e as placas permaneceram incubadas por 60 minutos em estufa a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi coletado com micropipeta, armazenado em microtubos e congelado a -20°C para posterior análise de IL1β e TNFα.

ADESÃO DO MACRÓFAGO ALVEOLAR

Após a retirada do sobrenadante da placa, os poços foram lavados duas vezes com PBS e as células aderentes foram então fixadas com metanol 50% por 10 minutos em temperatura ambiente.

Após este período, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100µL de corante de Giemsa a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis. Missouri, Estados Unidos)

a cada poço por 40 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados duas vezes com PBS e adicionou-se 200 µL de metanol 50%. Após 30 minutos, a solução resultante teve sua absorbância lida em espectrofotômetro com comprimento de onda correspondente a 550nm (Versamax – Microplat reader – Molecular devices – San Jose, CA - USA). Esse ensaio foi adaptado da técnica de Rosen e Gordon (1987).

ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DO MACRÓFAGO ALVEOLAR

Após as placas com macrófagos terem seus poços lavados duas vezes com PBS, como no ensaio acima, adicionou-se a cada poço 100µL de PBS e 20µL de zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) corado com vermelho neutro (6,7mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e incubados em estufa a 37°C por 30 minutos.

Após a retirada do sobrenadante, as células foram fixadas com solução de Baker (4% formaldeído, 2% cloreto de sódio, 1% acetato de cálcio, solução aquosa) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, após descarte do sobrenadante, o corante vermelho neutro foi solubilizado com 200µL de solução de extração (10% ácido acético glacial, 40% etanol em solução aquosa) e incubado por 30 minutos. Após este período a absorbância foi mensurada a 550nm (Versamax – Microplat reader – Molecular devices – San Jose, CA - USA). Esse ensaio foi adaptado do método descrito por Dyrzynda et al. (1998).

O resultado final da atividade fagocitária foi corrigido pela adesão dos macrófagos alveolares (fagocitose/adesão), para cada animal e a cada desafio e tratamento, obtendo assim a fagocitose relativa em cada desafio e tratamento.

CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS

A concentração de nitritos no LBA foi utilizada como indicador da produção de óxido nítrico na região broncoalveolar.

Para esta análise foi utilizado o kit para determinação da concentração de nitritos (Griess Reagent Kit for Nitrite Determination -G-7921 - Thermo Fisher Science – San Francisco - USA). Em microplaca de 96 poços, adicionou-se 20 µL de reagente de Griess, a 150 µL de amostra (sobrenadante obtido a partir dos poços dos grupos e tratamentos testados) e 130 µL de água deionizada.

As placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, em seguida lidas em absorbância de 548 nm utilizando-se um espectrofotômetro para microplacas (Versamax – Microplat reader – Molecular devices – San Jose, CA - USA). Os resultados foram expressos como absorbância a 548nm.

COCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Em microplaca de 96 poços, 250µL de reagente de Bradford (100mg de Coomassie Blue, 50mL de etanol 95% + 100mL de ácido fosfórico 85%, completar com água ultrapura para 1000mL) foi adicionado a 10µL de amostra (sobrenadante obtido a partir dos poços dos grupos e tratamentos testados). Nesta etapa, o corante Comassie é complexado por proteínas presentes na amostra, o que muda a sua cor.

Após 5 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada a 595nm, utilizando-se um espectrofotômetro para microplacas (Versamax – Microplat reader – Molecular devices – San Jose, CA - USA). A concentração de proteínas foi determinada interpelando-se os valores de absorbância numa curva padrão resultante de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina

(Sigma). Os resultados foram expressos como miligramas de proteínas por mililitro de LBA.

ANÁLISE DE FATORES SOLÚVEIS

No ensaio de atividade fagocitária, foi realizada uma triplicata de cada amostra utilizando zimosan não corado com vermelho neutro para se congelar o sobrenadante dos poços após a incubação (Laan et al., 2005), que foi acondicionado em microtubos para centrífuga e congelado a -20°C para análises de (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α).

Para a mensuração das interleucinas, o sobrenadante dos poços foi descongelado à temperatura ambiente para uso em ensaios de dosagem de nitrito, proteínas, (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α).

A IL-1 β foi dosada a partir de kit comercialmente disponível de ensaio imunoenzimático (ELISA) para aIL1 β de equinos (Equine IL1 β /IL-1F2 DuoSet ELIS - R & D, Minnesota, Estados Unidos), enquanto o TNF- α foi dosado a partir do kit comercial para dosagem por ELISA de TNF- α de equinos (Equine TNF-alpha DuoSet ELIS - R & D, Minnesota, Estados Unidos).

O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e repetido em duplicata. A faixa de quantificação para a IL1 β foi de 7,8 a 8000 pg/mL, enquanto que para o TNF- α foi de 1,95 a 2000pg/mL. O ensaio foi efetuado em microplacas de 96 poços revestidas com anticorpos de captura de IL1 β ou TNF- α equinos, e amostras ou padrões foram adicionados seguidos por anticorpos de detecção de IL1 β ou TNF- α equinos. A estreptoavidina-HRP foi então adicionada, seguida por uma solução de substrato e uma solução de paragem. A densidade óptica foi determinada com um leitor de microplacas ajustado para 450nm (Versamax – Microplat reader – Molecular devices – San

Jose, CA - USA). Transformar os comprimentos de onda dos padrões ELISA em uma escala de valores e assim determinar a quantificação de cada amostra.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística incluiu comparações entre grupos e comparações entre tratamentos dentro de cada grupo.

Para as análises quantitativas do estudo (adesão, fagocitose, nitrito, proteína e interleucinas), foi feita uma comparação de cinco tipos de equação da reta (linear, exponencial, logarítmica, potência e dose resposta) com o objetivo de encontrar a com maior acurácia e mais indicada para as mensurações.

A partir da determinação da equação mais adequada, os valores foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltipla comparação de Dunn, e teste t de student comparandoos grupos nos mesmos momentos de avaliação. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Todos os animais apresentaram um ou mais sinais clínicos relacionados à asma, sendo dois deles correspondentes à asma moderada e três à asma grave (Tabela 1). Apenas os animais com asma leve tiveram a presença de eosinófilos acima do valor de referência para equinos saudáveis (1%) no LBA e dois animais com asma grave tiveram a presença de mastócitos dentro valor de referência para equinos saudáveis (até 2%).

ANIMAL	FC	FR	TE	RT	EE	EC	LAVADO BRONCOALVEOLAR					
							MO	LO	NO	EO	MAST	MN
Cavalo 1	36	18	não	sim	não	4	44	41	13	1		1
Cavalo 2	40	18	sim	sim	moderado	7	23	16	52		1	8
Cavalo 3	44	16	não	sim	não	4	37	56	6	1		
Cavalo 4	38	22	sim	sim	moderado	13	22	11	64			3
Cavalo 5	44	45	sim	sim	intenso	17	39	16	43		1	1

Tabela 1 – Exame clínico de cavalos asmáticos. FC – frequência cardíaca; FR – frequência respiratória; TE – tosse espontânea; RT – reflexo de tosse; EE – esforço expiratório; EC – escore clínico; MO – macrófagos; LO – linfócitos; NO – neutrófilos; EO – eosinófilos; MAST – mastócitos; MN – multinucleadas.

CÉLULAS APLICADAS NOS ENSAIOS

A viabilidade média das células MNDMO e EMDMO, usadas para tratar os MA desafiados foi 75,6% e 83,96%, respectivamente. A contagem de células totais (CCT) dos LBA coletados foi de 86,66 cel/ μ L (tabela 02).

	Viabilidade celular		Isolamento
	MNDMO (%)	MSCDMO (%)	CCT do LBA cel/ μ L
Cavalo 1	77,8	92	151,08
Cavalo 2	76	86	459,68
Cavalo 3	75,9	70,9	193,14
Cavalo 4	77,7	84,5	560,87
Cavalo 5	70,6	86,4	494,29
MÉDIA	75,6	83,96	371,81
DESVIO PADRÃO	- 2,63	- 7,01	\pm 159,76

Tabela 2 – Resultados obtidos a partir do isolamento e cultivo das células usadas nos ensaios. MNDMO – células multinucleares derivadas de medula óssea; MSCDMO – células estromais mesenquimais; CCT do LBA – contagem de células totais do lavado broncoalveolar.

DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA

No presente estudo a equação da reta que demonstrou maior confiabilidade pelos parâmetros de coeficiente de determinação (R^2) e teste de variabilidade (Qui^2) foi a equação de dose resposta (tabela 03), onde o R^2

apresentou valores acima de 99% de acurácia para todas as mensurações e Qui² apresentou variabilidade inferior a 0,022 para todas as mensurações.

EQUAÇÕES	Proteína		Nitrito		IL-1 β		TNF- α	
	R ²	Qui ²	R ²	Qui ²	R ²	Qui ²	R ²	Qui ²
Linear	0,9869	0,0120	0,9662	0,0582	0,6827	2,9788	0,8589	1,2525
Exponencial	0,9504	0,0399	0,8116	0,3823	0,536	6,5114	0,6976	4,1781
Logarítmico	0,7796	0,1586	0,8726	0,1357	0,9118	0,8506	0,8054	7,7525
Potência	0,8488	0,0897	0,9873	0,0146	0,968	0,3476	0,9271	0,5077
Dose resposta	0,9999	0,0001	0,9998	0,0007	0,9991	0,0087	0,9982	0,0220

Tabela 03 –Valores para os parâmetros de confiabilidade estatística R² e Qui² de diferentes modelos de equação da reta. IL-1 β – interleucina 1 β ; TNF- α – fator de necrose tumoral α ; R² – coeficiente de determinação, onde 1 equivale a 100%, assim, valores mais próximos de 1 são mais confiáveis; Qui² – qui quadrado, afere a relação entre o resultado de um experimento e a distribuição esperada para o fenômeno, assim, quanto menor o valor menor é a variabilidade.

ADESÃO E ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DO MACRÓFAGO ALVEOLAR

A atividade de adesão do macrófago alveolar não apresentou diferença entre os tipos de desafio, assim como não apresentou diferença entre os tratamentos (gráfico 01 – A). Já a atividade fagocitária (fagocitose relativa) apresentou uma redução significativa nos grupos MA+DEXA, MA+LPS+DEXA e MA+LPS+EMDMO (gráfico 01 – B).

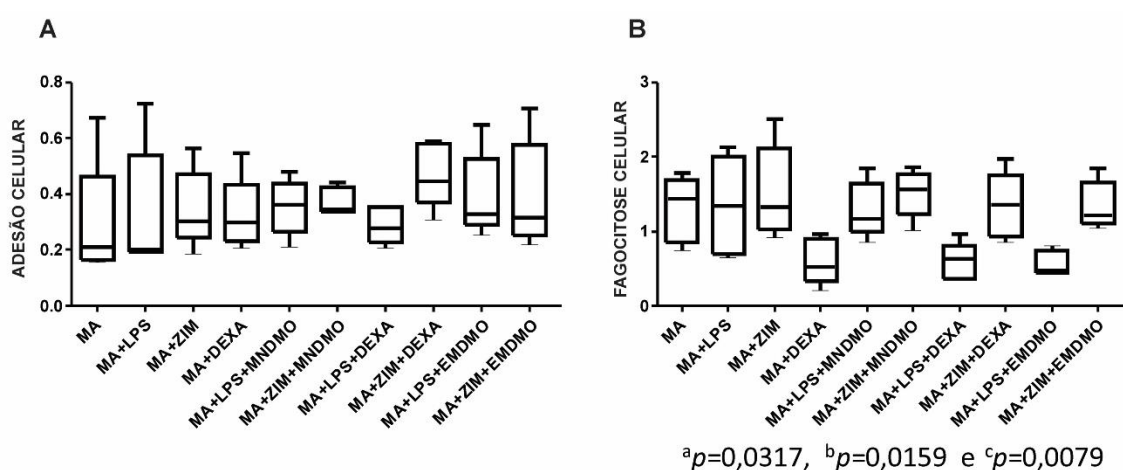


Gráfico 01 – Adesão e fagocitose celular. A - Adesão celular dos MA desafiados com LPS e ZIM e tratados com MNDMO e EDMO; B - Atividade fagocitária dos MA desafiados com LPS e ZIM e tratados com MNDMO e EDMO.

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E NITRITO

A concentração de proteína apresentou um aumento significativo nos grupos MA+LPS+MNDMO, MA+ZIM+MNDMO, MA+LPS+EMDMO e MA+ZIM+EMDMO (gráfico 02 – A). Enquanto a concentração de nitrito não apresentou diferença entre os tipos de desafio, assim como não apresentou diferença entre os tratamentos (gráfico 02 – B).

Embora o aumento de proteína não tenha sido considerado significativo ele foi superior a 30% nos grupos tratados com MNDMO em relação aos MA e superior a 21% quando comparados com seus respectivos indutores inflamatórios (LPS e ZIM). Já os grupos tratados com EDMO tiveram um aumento ainda maior, sendo superior a 40% em relação aos MA e superior a 28% quando comparados com seus respectivos indutores (LPS e ZIM).

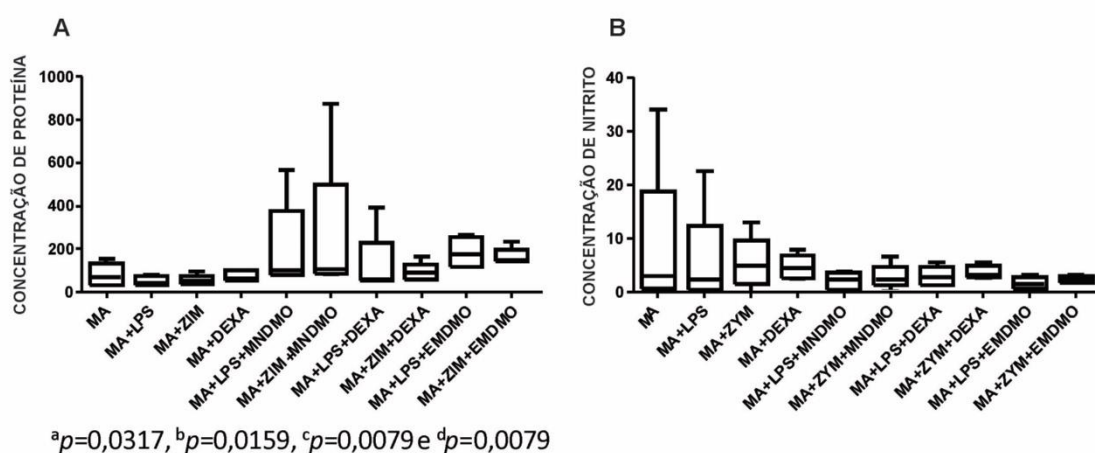


Gráfico 02 – Dosagem de proteína e nitrito. A - Dosagem da concentração de proteína no sobrenadante dos poços com MA desafiados com LPS e ZIM, posteriormente tratados com MNDMO e EDMO; B - Dosagem da concentração de nitrito no sobrenadante dos poços com MA desafiados com LPS e ZIM, posteriormente tratados com MNDMO e EDMO.

ANÁLISE DE FATORES SOLÚVEIS

A concentração de IL-1 β apresentou um aumento significativo nos grupos tratados com dexametasona (gráfico 03 – A). Da mesma forma a concentração

de TNF- α foi significativamente menor nos grupos tratados com dexametasona (gráfico 03 – B).

Embora a redução de TNF- α não tenha sido considerada significativa, foi superior a 41% nos grupos tratados com MNDMO em relação aos MA e superior a 28% quando comparados com seus respectivos indutores inflamatórios (LPS e ZIM). Já os grupos tratados com EMDMO tiveram uma redução superior a 47% nos grupos tratados com MNDMO em relação aos MA e superior a 31% quando comparados com seus respectivos indutores inflamatórios (LPS e ZIM).

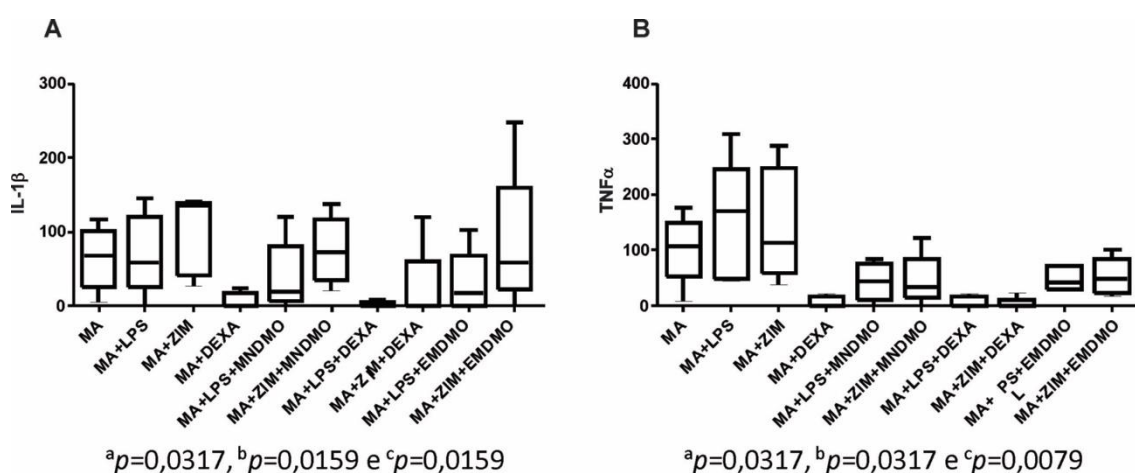


Gráfico 03 – Dosagem de fatores solúveis. A - Dosagem da concentração IL-1 β no sobrenadante dos poços com MA desafiados com LPS e ZIM, posteriormente tratados com MNDMO e EMDMO; B - Dosagem da concentração de TNF α no sobrenadante dos poços com MA desafiados com LPS e ZIM, posteriormente tratados com MNDMO e EMDMO.

DISCUSSÃO

Neste estudo todos os animais permaneceram soltos a pasto e apresentaram tosse e aumento de FR no período da primavera e início do verão, sinais que podem estar associados às pastagens. Embora a exposição aos aeroalérgenos seja considerada baixa a campo (Fillion-Bertrand et al., 2019), nos períodos de primavera e verão há um aumento de pólen de gramíneas e esporos de fungos (Ferrari et al., 2018).

Todos os animais apresentaram alterações no LBA compatíveis com asma, sendo dois animais com asma leve com aumento de neutrófilos entre 5 e 20% (Couëtil et al., 2016) e presença de eosinófilos 1% (Hoffman 2008) e três cavalos com asma grave, apresentando aumento acima de 25% de neutrófilos (Couëtil et al., 2016) dois deles com presença de mastócitos.

O LBA de cavalos afetados pela asma equina associada às pastagens (AEAP) demonstra aumento de interleucina 4 (IL-4), 13 (IL-13) e interferon-gama (IFN γ), ausência de imunoglobulina E (IgE), presença de neutrófilos e linfócitos, enquanto eosinófilos são incomuns, o que corresponde a fenótipos de asma não alérgica (Ferrari et al., 2018), o que diferiu do LBA dos animais deste estudo. A presença de eosinófilos e mastócitos em geral está associada à asma alérgica (Bullone and Lavoie 2015) o que, embora incomum na AEAP pode surgir devido ao aumento de pólenes e esporos aos quais os animais estão expostos durante os meses quentes, o que explicaria os achados neste estudo.

A asma equina e a asma humana baseiam-se tanto em homologias epidemiológicas, clínicas e moleculares quanto nos fenótipos tardio, não alérgico, neutrofílico e grave (Ferrari et al., 2018), assim como também pode haver a sobreposição de fenótipos (Pirie et al., 2016), uma vez que é uma enfermidade multifatorial. Complexa e composta de inúmeras variáveis, a asma se divide em subgrupos dentro de cada fenótipo, chamados de endótipos, e o não entendimento destes, seus gatilhos e formas de apresentação, pode ser o maior obstáculo na compreensão de causas e tratamentos (Lötvall et al., 2011).

Os antígenos que desencadeiam a asma podem ser reconhecidos por diferentes mecanismos, a exemplos disso estão os receptores toll-like (TLR) que ficam na membrana de células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (Ferraz et

al., 2011). O LPS costuma ser reconhecido por TLR tipos 1,2 e 4, enquanto o ZIM pelos tipos 2 e 6 (Ferraz et al., 2011), mas a ativação de um único tipo de TLR pode levar ao aumento da expressão de outros tipos (Waldschmidt et al., 2013). É possível portanto, que algumas respostas ou vias de ativação se assemelhem e/ou se diferenciem refletindo os distintos fenótipos ou endótipos da asma.

Este trabalho estabeleceu uma comparação entre a ativação celular feita com LPS, agente bacteriano comumente empregado como indutor inflamatório e ZIM, agente fúngico frequentemente utilizado em diversos ensaios de atividade fagocitária, porém pouco usado em outros ensaios de ativação celular.

Isso possibilitou comparar as respostas de MA de cavalos asmáticos frente a dois antígenos com diferentes vias de ativação. A morfologia dos MA diferiu quando desafiado por LPS e ZIM, assim como a atividade fagocitária induzida por LPS que foi reduzida ao receber dexametasona e células EMDMO mas se mostrou inalterada quando induzida por ZIM. No entanto, a secreção de TNF α se mostrou similar com ambos os agentes de indução, embora o resultado não tenha sido significativo.

Além da utilização do zimosan como fator de inovação em ensaios de indução de inflamação em MA de cavalos asmáticos, as células usadas nos tratamentos propostos estavam criopreservadas por aproximadamente 3 anos, o que também não é comum em outros trabalhos. As células costumam ser processadas e usadas em um intervalo curto de tempo (Gupta et al., 2007) ou o mesmo não é detalhado (Braza et al., 2016). Mesmo após este longo período de criopreservação, a viabilidade das células MNDMO usadas nos ensaios foi em média 75,6%, e embora seja uma média inferior a relatada por Bastos e

colaboradores (2017-b) é considerada clinicamente viável por convenções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A viabilidade das EMDMO teve uma média de 83,96%, o que está dentro de valores encontrados por outros autores, que variou entre 80 e 90% (Bastos et al., 2017-b; Mitchell et al., 2015).

É possível que a média de viabilidade das MNDMO seja menor porque elas são compostas por um *pool* de células do sistema fagocitário e apenas uma pequena fração é de células mesenquimais, que pode variar entre 0,001% e 0,01% (Alves et al. 2009).

A contagem total média de células do LBA foi de 371,81 cel/ μ L, média superior ao relatado pelo mesmo autor em outro trabalho que foi de 94,32cel/ μ L (Barussi et al., 2016).

Após a execução dos ensaios que envolviam a leitura por espectrofotometria, constatou-se que havia discrepância entre os valores de cada parâmetro avaliado, e ao tabelar as equações da reta sugeridas, verificou-se que a equação com maior precisão e menor erro era a equação dose-resposta. Desta forma optou-se por utilizá-la em todo o trabalho.

Ao avaliar a adesão celular, não foi possível visualizar um padrão de comportamento nem entre os desafios nem entre os tratamentos. Embora as MNDMO tenham uma fração de células do sistema fagocitário, com capacidade de adesão, essa capacidade não se mostrou significativamente aumentada nos grupos tratados com MNDMO. As EMDMO também possuem capacidade de se aderirem ao plástico, embora o tempo para ensaios de adesão destas células não esteja bem estabelecido. Assim, os grupos tratados com EMDMO também não apresentaram alterações significativas.

A adesão dos macrófagos é essencial na migração celular, fagocitose e interação com outras células ou componentes da matriz conjuntiva, mas pode sofrer influência de fatores microambientais presentes nos tecidos, sendo modulada por substâncias que promovam a ativação celular (Carvalho 2001). Sendo assim, é possível que trabalhos *in* ou *ex vivo* apresentem resultados diferentes. Além da adesão celular, os MA são especializados em fagocitose (Waldschmidt et al., 2013) e este processo é fundamental na depuração local, mas também pode desencadear respostas imunológicas exacerbadas em cavalos suscetíveis à asma.

A dexametasona foi capaz de inibir a fagocitose nos MA e MA+LPS, da mesma forma que as EMDMO foram capazes de inibir a fagocitose nos MA desafiados com LPS, no entanto não foram capazes de inibi-la nos grupos desafiados por zimosan. Sabe-se que os corticoides afetam várias funções das células imunes, entre elas a adesão e a fagocitose, além disso foram capazes de induzir à apoptose de MA previamente ativados com LPS (Zeng et al., 2017). Isso pode explicar a redução da fagocitose em grupos controle (PBS) e desafiados com LPS tratados com dexametasona. A fagocitose não foi inibida nos grupos tratados com células MNDMO, possivelmente porque estas células tem um grande percentual de células fagocitárias.

Ao realizar a fagocitose de um antígeno, ocorre a liberação de proteínas mediadoras da inflamação, desencadeando respostas imunológicas (Ainsworth et al., 2009). É possível que a concentração de proteínas nos grupos testados já seja elevada, devido ao quadro de asma em todos os animais.

Ainda assim, a secreção de proteínas foi significativamente maior nos grupos tratados com MNDMO e EMDMO. Neste caso as MNDMO com uma

grande quantidade de células fagocitárias podem aumentar a secreção de proteínas pela fagocitose dos indutores inflamatórios e liberação de proteínas mediadoras de inflamação. Importante mencionar que a fagocitose demonstrada no presente estudo é a fagocitose relativa, ou seja, ela foi corrigida pela adesão, onde o resultado mostra a fagocitose por célula e não o quanto o grupo foi capaz de fagocitar. Assim a concentração de proteínas aumenta mesmo sem o aumento da atividade fagocitária pelo grupo tratado com MNDMO.

Já o grupo tratado com células EMDMO apresentaram um aumento da concentração de proteínas possivelmente pelo efeito parácrino destas células, que são capazes de promover imunomodulação pela liberação de proteínas mediadoras de inflamação. A cocultura *in vitro* de células mesenquimais com macrófagos alveolares forneceu evidências de que o efeito antiinflamatório de células mesenquimais era parácrino independente do contato celular (Gupta et al., 2007). As células mesenquimais atenuam a asma ao serem fagocitadas pelos macrófagos pulmonares, que por sua vez adquiriram um fenótipo de macrófagos tipo 2 (M2), estimulando um efeito antiinflamatório local e a remissão da doença (Braza et al., 2016).

O aumento da secreção de proteínas é um fator importante para entender a resposta à asma e aos seus agentes causais. As proteínas do LBA de cavalos saudáveis exercem uma regulação negativa da migração, quimiotaxia, disseminação celular, transmigração e infiltração, enquanto as de cavalos asmáticos facilitam uma liberação parcial da regulação negativa dessas funções (Bright et al., 2019).

Além da secreção de mediadores inflamatórios, o sistema respiratório conta com a secreção de fatores antioxidantes, estes combatem a liberação de

radicais livres gerados pelo próprio processo respiratório e por processos inflamatórios (Michelotto et al., 2010-a). Embora o desafio de MA por LPS leve ao aumento da produção de nitrito (Borron et al., 2000), nem sempre é o que ocorre. O presente estudo corrobora com um estudo anterior em que a dosagem de nitrito produzida por macrófagos alveolares após a exposição ao LPS não apresentou aumento (Karagianni et al., 2013).

Os macrófagos alveolares, assim como as células dendríticas influenciam a ação dos linfócitos T auxiliares (T_a) ou *T helpers* (T_h), ativando células T *naive* induzindo sua diferenciação em Th1, Th2, Th17 e liberação de interleucinas (Bastos et al., 2017-a), da mesma forma influenciam a ação das células T reguladoras (Treg) (Holt and Strickland 2010). Pacientes asmáticos tem resposta predominante do tipo Th2 que podem promover ativação de linfócitos B e subsequente liberação de IgE (Holt and Strickland 2010). Em alguns casos, os pacientes podem ter uma resposta mista, com envolvimento de interleucinas de perfil Th1, como é o caso do TNF α (Genov and Solé., 2007), enquanto a IL-1 pode estar presente tanto em Th1 quanto Th2 (Bastos et al., 2017-a), ambos proporcionam a quimiotaxia de outras células de defesa para o pulmão.

No presente trabalho, todos os tratamentos foram capazes de reduzir a secreção de TNF α , sua concentração média após a indução foi superior a 100pg/mL e após os tratamentos foi inferior a 50pg/mL, mas essa redução só foi significativa em grupos tratados com dexametasona. Pulmões de camundongos com deficiência de TNF- α foram menos propensos a serem lesados por após serem desafiados por LPS (Zeng et al., 2017).

A média de TNF α encontrada no LBA de cavalos saudáveis foi menor que 40pg/mL (Montgomery et al., 2018), similar aos níveis atingidos com os

tratamentos propostos por este estudo. No entanto, Montgomery e colaboradores (2018) encontraram uma média de inferior a 10pg/mL em cavalos com exacerbação da asma grave, ao contrário de Laan e colaboradores (2005), que encontraram um aumento significativo de TNF α (concentração média cerca de 100pg/mL) ao desafiar macrófagos alveolares com o fungo *Aspergillus fumigatus*, no entanto não houve diferença significativa entre o grupo controle (PBS) e o desafiado por LPS. Assim, o presente estudo corrobora com os achados de Laan e colaboradores (2005).

A concentração de IL1 β também foi menor nos grupos tratados com dexametasona. Os antígenos usados para o desafio celular LPS ou zimosan não foram capazes de aumentar a concentração de IL1 β e TNF α de forma significativa nas dosagens, nos tratamentos e nos tempos usados neste estudo.

Embora não tenha havido diferença estatística significativa na produção de IL1 β entre os desafios realizados neste trabalho, a média da concentração de IL1 β encontrada nos grupos controle (PBS) e desafiados com LPS ficaram inferiores aos 50pg/mL, enquanto ao grupo induzido com zimosan a média da concentração de IL1 β foi superior a 100pg/mL. Valores parecidos foram encontrados por Laan e colaboradores (2005) ao desafiar macrófagos alveolares com LPS e *Aspergillus fumigatus*, onde, segundo os autores houve diferença estatística significativa.

É importante lembrar que as mensurações foram feitas em cavalos que já apresentavam fenótipos de asma, não havendo valores de referência bem estabelecidos para isso. É provável que interleucinas pró-inflamatórias já estejam em níveis mais elevados em cavalos asmáticos do que em cavalos saudáveis, assim como foi citado por Laan e colaboradores (2005).

A terapia celular tem a capacidade de promover efeitos que terapias convencionais não possuem como a imunomodulação, a reparação e a regeneração. Estes mecanismos podem ocorrer por proliferação celular, diferenciação celular, reorganização tecidual, e, especialmente efeitos parácrinos com a liberação de mediadores inflamatórios (Burk et al., 2013).

O uso de células mesenquimais em modelo de asma inibiu a broncoconstrição, diminuiu a inflamação pulmonar, e, ao serem fagocitadas por MA, estes adquiriram um fenótipo supressor M2, que expressa mais interleucina 10 (IL-10), considerada antiinflamatória (Braza et al, 2016). Já administração de células mesenquimais reduziu a secreção de TNF α e aumentou a IL-10 no LBA de modelo de inflamação pulmonar, diminuiu a gravidade da lesão e melhorando a sobrevivência em camundongos (Gupta et al., 2007).

Embora haja muitos estudos envolvendo as terapias celulares, alguns deles como o anteriormente referido, sugerem que talvez seja necessário utilizar mais de uma aplicação com possíveis ajustes de doses para que se chegue ao efeito desejado no uso da terapia celular.

CONCLUSÃO

A terapia celular apresentou vários pontos positivos neste estudo *in vitro*, não interferiu nos valores da fagocitose relativa, enquanto a dexametasona reduziu esta atividade, o que pode comprometer a depuração de partículas inaladas pelos animais. Possivelmente os grupos tratados com terapia celular apresentaram uma maior concentração de interleucinas, provavelmente antiinflamatórias, uma vez que a concentração de proteínas foi maior nos grupos que receberam essa terapia e houve redução na secreção de TNF α .

Os efeitos da terapia celular sobre os MA de cavalos asmáticos foram benéficos, mas o presente trabalho houveram diferenças em algumas respostas que parecem estar mais ligadas aos antígenos LPS e ZIM do que aos tipos celulares MNDMO e EMDMO testados.

Como enfermidade multifatorial, conhecer os fatores que podem desencadear a asma bem como seus fenótipos e endótipos são de extrema importância, uma vez que podem interferir diretamente no sucesso da terapia dirigida à asma equina.

Para que as respostas obtidas neste estudo sejam melhor elucidadas, ensaios complementares como proteômica e dosagem de outras interleucinas podem ser executados. De qualquer forma, a terapia celular segue demonstrando pontos positivos como a acentuação da comunicação celular, capacidade de modulação da resposta inflamatória e possivelmente a reversão de quadros que hoje ainda são considerados irreversíveis.

REFERÊNCIAS

- Ainsworth DM, Matychak M, Reyner CL, Erb HN and Young JC. Effects of in vitro exposure to hay dust on the gene expression of chemokines and cell-surface receptors in primary bronchial epithelial cell cultures established from horses with chronic recurrent airway obstruction. *American journal of veterinary research*. 2009; 70(3), 365-372.
- Alves RDSA, Vianna FDAF, de Castro Pereira CA. Fenótipos clínicos de asma grave. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2009; 34:646-653.
- Barussi FC, Bastos FZ, Leite LM, Fragoso FY, Senegaglia AC, Brofman PR, Nishiyama A, Pimpão CT and Michelotto JrPV. Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2016; 232, 35-42.

Bastos FZ, Barussi FCM, Pimpão CT and Michelotto JrPV. Mechanisms of equine recurrent airway obstruction: changes in understanding and management. *Revista Acadêmica Ciência Animal*. 2017-a; 15, 17-26.

Bastos FZ, Barussi FC, Santi TF, Vieira BP, Senegaglia AC, Cruz FF and Michelotto JrPV. Collection, processing and freezing of equine bone marrow cells. *Cryobiology*. 2017-b; 78, 95-100.

Bond S, Léguillette R, Richard EA, Couetil L, Lavoie JP, Martin JG and Pirie RS. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *Journal of veterinary internal medicine*. 2018; 32(6), 2088-2098.

Borron P, McIntosh JC, Korfhagen TR, Whitsett JA, Taylor J and Wright JR. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000; 278(4), L840-L847.

Braza F, Dirou S, Forest V, Sauzeau V, Hassoun D, Chesné J, Muller MAC, Sagan C, Magnan A and Lemarchand P. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells*. 2016; 34(7), 1836-1845.

Bright LA, Dittmar W, Nanduri B, McCarthy FM, Mujahid N, Costa LR and Swiderski CE. Modeling the pasture-associated severe equine asthma bronchoalveolar lavage fluid proteome identifies molecular events mediating neutrophilic airway inflammation. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2019; 10, 43.

Bullone M and Lavoie JP. Asthma “of horses and men”—how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Molecular immunology*. 2015; 66(1), 97-105.

Burk J, Badylak SF, Kelly J and Brehm W. Equine cellular therapy—from stall to bench to bedside? *Cytometry Part A*. 2013; 83(1), 103-113.

Camp CJ and Leid RW. Chemotaxis of radiolabeled equine neutrophils. *American journal of veterinary research*. 1982; 43(3), 397-401.

- Carvalho DGF. Um ensaio de adesão otimizado para o estudo de interações entre macrófagos e tecido conjuntivo baseado no ensaio de Stamper-Woodruff. *Doctoral dissertation*.2001.
- Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R and Richard EA. Inflammatory airway disease of horses—revised consensus statement. *Journal of veterinary internal medicine*. 2016; 30(2), 503-515.
- Cruz FF, Antunes MA, Abreu SC, Antunes MA, Fujisaki LC, Silva JD, Xisto DG and Rocco PR. Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2012;182:26-36.
- Dauvillier J, Felipe MJB, Lunn DP, Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Beauchamp G and Lavoie JP. Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *Journal of veterinary internal medicine*. 2011; 25(3), 549-557.
- Dyrynda EA, Pipe RK, Burt GR and Ratcliffe NA. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquatic Toxicology*. 1998; 42(3), 169-185.
- Du YM, Zhuansun YX, Chen R, Lin L, Lin Y and Li JG. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma. *Experimental cell research*. 2018; 363(1), 114-120.
- Ferrari CR, Cooley J, Mujahid N, Costa LR, Wills RW, Johnson ME and Swiderski CE. Horses with pasture asthma have airway remodeling that is characteristic of human asthma. *Veterinary pathology*. 2018; 55(1), 144-158.
- Ferraz EG, Silveira BBDBD, Sarmiento VA and Santos JND. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. *RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)*. 2011; 59(3), 483-490.
- Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, Lavoie JP, Huffnagle GB and Leclere M. Lung Microbiome Is Influenced by the Environment and Asthmatic Status in an Equine Model

of Asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2019; 60(2), 189-197.

Firinci F, Karaman M, Baran Y, Bagriyanik A, Ayyildiz ZA, Kiray M, Kozanoglu I, Yilmaz O, Uzuner N and Karaman O. Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma. *International immunopharmacology*. 2011; 11(8), 1120-1126.

Genov IR and Solé D. Fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) e asma: metanálise é a saída? *Revista Brasileira de alergia e imunopatologia*. 2007; 30(1), 2-8.

Gupta N, SuX, Popov B, Lee JW, Serikov V and Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *The Journal of Immunology*. 2007; 179(3), 1855-1863.

Hekking PPW, Wener RR, Amelink M, Zwinderman AH, Bouvy ML and Bel EH. The prevalence of severe refractory asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015; 135(4), 896-902.

Hoffman AM. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2008; 24(2), 423-435.

Holt PG and Strickland DH. Interactions between innate and adaptive immunity in asthma pathogenesis: new perspectives from studies on acute exacerbations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125(5), 963-972.

Karagianni AE, Kapetanovic R, McGorum BC, Hume DA and Pirie SR. The equine alveolar macrophage: functional and phenotypic comparisons with peritoneal macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013; 155(4), 219-228.

Kutasi O, Balogh N, Lajos Z, Nagy K, Szenci O. Diagnostic approaches for the assessment of equine chronic pulmonary disorders. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2011; 31(7):400-10.

Laan TT, Bull S, Pirie RS and Fink-Gremmels J. Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide, *Aspergillus fumigatus*, and a suspension of hay dust. *American journal of veterinary research*. 2005; 66(9), 1584-1589.

Laan TT, Bull S, Pirie R and Fink-Gremmels J. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *Journal of veterinary internal medicine*. 2006; 20(1), 167-174.

Lohmann KL. Response of Equine Monocytes to Lipopolysaccharide from Enteric and Non-enteric Bacteria: Efficacy and Receptor Specificity. *Doctoral dissertation, University of Georgia*. 2004.

Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A and Greenberger PA. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011; 127(2), 355-360.

Michelotto JrPV. Efeitos do desafio ambiental e do exercício na funcionalidade dos macrófagos do lavado broncoalveolar de cavalo puro sangue inglês de corrida. 2010-a.

Michelotto JrPV, Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EWR, Fernandes LC and Nishiyama A. Platelet-activating factor and evidence of oxidative stress in the bronchoalveolar fluid of Thoroughbred colts during race training. *Journal of veterinary internal medicine*. 2010-b; 24(2), 414-419.

Mitchell A, Rivas KA, Smith R and Watts AE. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5%. *Stem cell research & therapy*. 2015; 6(1), 231.

Montgomery JB, Husulak ML, Kosolofski H, Dos Santos S, Burgess H and Meachem MD. Tumor necrosis factor-alpha protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with severe equine asthma. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2018; 202, 70-73.

Pirie RS, Couëtil LL, Robinson NE and Lavoie JP. Equine asthma: an appropriate, translational and comprehensible terminology? *Equine veterinary journal*. 2016; 48(4), 403-405.

Rosen HUGH and Gordon SIAMON. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1987; 166(6), 1685-1701.

Tesarowski DB, Viel L and McDonell WN. Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *American journal of veterinary research*. 1996; 57(8), 1214-1219.

Waldschmidt I, Pirottin D, Art T, Audigié F, Bureau F, Tosi I, El Abbas S, Farnir F, RichardE and Dupuis MC. Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013; 155(1-2), 30-37.

Zeng S, Qiao H, Lv XW, Fan D, Liu T and Xie D. High-dose dexamethasone induced LPS-stimulated rat alveolar macrophages apoptosis. *Drug design, development and therapy*. 2017; 11, 3097.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como modelo de asma, o cavalo nos possibilita estudar a enfermidade de maneira que os resultados podem ser entendidos como resultados para a medicina veterinária e extrapolados para a medicina humana. Desta forma pode ser útil para melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofrem com esta enfermidade.

A observação da expressão facial de cavalos asmáticos permitiu avaliar o desconforto destes animais através da HGS, muito embora ela tenha sido desenvolvida para avaliar a dor em equinos. Mas mesmo se mostrando eficaz para este fim, são necessários mais estudos com maior número de animais, pois ainda existem critérios de subjetividade (avaliador, temperamento animal, gravidade da doença) e variabilidade de sinais clínicos e tolerância a alterações fisiológicas causadas pela doença pelos animais.

Pelo fato de não se saber ao certo qual é o gatilho da asma equina e de que forma este gatilho interfere na fisiopatologia da doença, um maior entendimento sobre os agentes de desafio celular, suas vias de ação e seus efeitos sobre os macrófagos alveolares poderia proporcionar um maior entendimento da asma como um todo, e assim também sobre a terapia mais adequada em cada tipo de asma. Deste modo também fica claro que são necessários mais estudos para detalhar os possíveis subtipos de asma e seus agentes causais, pois estes possivelmente podem interferir na resposta do sistema imunológico, quando conduzidos em diferentes vias de ativação. Essa variabilidade de causas e respostas pode interferir diretamente no sucesso da terapia celular dirigida à asma equina.

Existe um longo caminho a percorrer na determinação das causas da asma equina, seus efeitos, suas diferentes formas de apresentação e terapias mais adequadas. Além de visar a remissão da doença, a terapia celular traz uma perspectiva de reparação e regeneração tecidual. Da mesma forma, traz a possibilidade de uso de um dos quatro “Ps” da medicina, a “personalização” do tratamento, adequando a dose, o intervalo de aplicação e o monitoramento conforme a doença em cada indivíduo.

CAPÍTULO 5

Respiratory Physiology & Neurobiology 232 (2016) 35–42



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resphysiol



Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction



Fernanda C.M. Barussi^{a,1}, Fernanda Z. Bastos^{a,1}, Lidiane M.B. Leite^b, Felipe Y.I. Fragoso^b, Alexandra C. Senegaglia^b, Paulo R.S. Brofman^b, Anita Nishiyama^c, Cláudia T. Pimpão^a, Pedro V. Michelotto Jr.^{a,*}

^a Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil

^b School of Medicine, Experimental Laboratory for Cell Culture, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil

^c Department of Physiology, Universidade Federal do Paraná, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, Jardim das Americas, Curitiba, Paraná 81531-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2016

Received in revised form 10 June 2016

Accepted 7 July 2016

Available online 7 July 2016

Keywords:

Bronchoalveolar lavage

Heaves

Horses

Interleukins

Neutrophils

Pulmonary inflammation

ABSTRACT

This research evaluated the effects of bone marrow-derived mononuclear cells (BMMCs) on the inflammatory process in the equine recurrent airway obstruction (RAO). Eight horses in RAO clinical score were divided into cell therapy group (Gcel) treated with a single intratracheal dose of BMMCs, and dexamethasone group (Gdex) treated with 21 days of oral dexamethasone. The horses were clinically reevaluated on days 7 and 21, together with cytological evaluation of the BALF, and detection of inflammatory markers (interleukins [IL]-10, -4, and -17, and interferon γ and α). There were decreases in respiratory effort and clinical score on days 7 and 21 ($p < 0.05$) for both groups. The percentage of neutrophils decreased and macrophages increased on days 7 and 21 ($p < 0.005$) in both groups. IL-10 levels increased in the Gcel group on day 21 compared to days 0 and 7 ($p < 0.05$), but this was not observed in the Gdex group. The quantification of IL-4, IL-17, IFN- γ , and IFN- α did not change between evaluations in both groups. These preliminary results suggest that BMMCs may ameliorate the inflammatory response of RAO.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Horses are susceptible to chronic recurrent airway obstruction (RAO). Persistent airway inflammation develops in the presence of moldy hay, dusty straw, and pollens as a consequence of aberrant innate and adaptive immune responses, as well as genetic predisposition (Leclere et al., 2011). Maintaining horses in a pro-allergenic environment exacerbates the disease and causes significant airway neutrophilic influx, mucus accumulation, bronchospasm, bronchial hyper-reactivity, and airway obstruction and remodeling (Leclere et al., 2011; Pirie, 2014). Studies investigating the secretion of

cytokines in horses with RAO horses showed contradictory results with regard to the Th1 and Th2 profiles (Pirie, 2014).

Horses with RAO exhibit increased respiratory effort at rest, coughing, and exercise intolerance, compromising athletic capacity and quality of life (Aharonson-Raz et al., 2012; Couëtill et al., 2016). Unfortunately, RAO has no cure, and conventional treatment with corticosteroids, although effective for controlling the inflammatory process and clinical signs, causes numerous adverse effects (Dauvillier et al., 2011). Therefore, there is an urgent need for new therapies.

The use of cell therapy has been investigated in a mouse model of asthma. Cell therapy was shown to control airway inflammation (Cho et al., 2015), with more pronounced benefits obtained with bone marrow-derived mononuclear cells (BMMCs) than with mesenchymal stem cells (MSCs) (Abreu et al., 2013).

RAO is an allergic disease that occurs naturally in horses. As there are similarities with human asthma with regard to the pathophysiology, RAO is considered to be an equine form of asthma, making

* Corresponding author.

E-mail address: p.michelotto@pucpr.br (P.V. Michelotto Jr.).

¹ These authors have contributed equally to the study, and thus may be regarded as the first author.



Contents lists available at ScienceDirect

Cryobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ycryo

Collection, processing and freezing of equine bone marrow cells

Fernanda Z. Bastos ^{a,1}, Fernanda C.M. Barussi ^{a,1}, Thasla F. Santi ^b, Bianca P. Vieira ^b,
Alexandra C. Senegaglia ^c, Fernanda F. Cruz ^d, Pedro V. Michelotto Jr. ^{a,*}

^a Department of Animal Science, School of Life Sciences - Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Course of Veterinary Medicine, School of Life Sciences - Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^c Experimental Laboratory for Cell Culture, School of Medicine - Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^d Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2017

Received in revised form

13 June 2017

Accepted 17 June 2017

Available online xxx

Keywords:

Cell therapy

Cryopreservation

Heparin

Horse

Bone marrow mononuclear cells

ABSTRACT

There is no consensus on aspects of equine bone marrow collection and processing. The study aimed to describe the collection of large volumes of bone marrow from horses of advanced age, with emphasis on bone marrow mononuclear cells (BMMCs) recovery and viability after cryopreservation. Fourteen horses, aged 3–24 years, were divided into three experiments. E1 studied the feasibility of collecting 200 mL from the sternums of horses of advanced age; E2 examined the number of cells obtained from the first and last syringe of each puncture; and E3 investigated the influence of heparin concentration on the prevention of cell aggregation, and cell viability after freezing in liquid nitrogen. Bone marrow aspirations were done with syringes pre-filled with Iscove's modified Dulbecco's medium and different concentrations of sodium heparin. BMMCs were counted, cell viability was determined, and samples were frozen. Bone marrow collection from the sternum is safe, even at large volumes and from horses of advanced age, and the number of cells recovered decreases with successive aspirations ($p < 0.0001$). Heparin concentration influenced cell aggregation, and recovered cells continued to be commercially viable after 150 days in frozen storage.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cell therapy is becoming a common practice in equine clinical and surgical settings, and is more directed to musculoskeletal disorders such as tendonitis, osteoarthritis, and laminitis [20]. Its use has also been demonstrated for the treatment of respiratory diseases in horses [7]. Bone marrow mononuclear cells (BMMCs) have been widely used due to their anti-inflammatory, anti-fibrotic, and microbicidal effects [1]. When compared to other cell types — such as mesenchymal stromal cells (MSCs) — commonly used in cell therapy studies, BMMCs have lower associated costs, lower risk of immunological reactions due to their autologous administration [15], and shorter processing time, with no need to be cultured. This enables their use on the same day of bone marrow collection;

alternatively, using cryogenic storage methods, the cells can be used whenever necessary for further injections [2].

In veterinary medicine, there is still no consensus on the best type — or optimal amount — of cells to be used for each treatment [17], which makes uncertain the amount of bone marrow that should be collected. The quantity of cells required for treatment varies according to the species and diseases studied. It ranges from 3×10^6 BMMCs to treat Wistar rats with myocardial infarction [22], to 1×10^7 MSCs to treat horses with tendon lesions [14], to 2×10^6 BMMCs to treat mice with experimentally induced asthma [2].

Recently, we investigated the effects of using BMMCs to treat horses with recurrent airway obstruction (RAO) or severe asthma; these animals received a minimum of 500×10^6 cells, which were obtained from 200 mL of bone marrow collected from the sternum [7]. To date, no studies in horses have shown the quantity of cells that can be obtained from large-volume bone marrow samples, nor have studies identified the minimum number of punctures required to obtain 200 mL of bone marrow. Furthermore, some aspects of collecting bone marrow from these animals remain scarcely discussed, such as the ideal puncture location (sternum or

* Corresponding author. Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil.

E-mail address: p.michelotto@puccpr.br (P.V. Michelotto).

¹ These authors have contributed equally to the study, and thus may be regarded as the first author.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.06.006>

0011-2240/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Mechanisms of equine recurrent airway obstruction: changes in understanding and management

Mecanismos da obstrução recorrente das vias aéreas dos equinos: mudanças no entendimento e na abordagem

Fernanda Zettel Bastos, Fernanda Cristina Mendes Barussi, Cláudia Turra Pimpão, Pedro Vicente Michelotto Jr.*

Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil

*Autor correspondente
E-mail: p.michelotto@pucpr.br

Abstract

Recurrent airway obstruction (RAO) is an inflammatory and obstructive disease that is more prevalent in horses stabled for long periods. The most common clinical signs include cough, exercise intolerance, dyspnea, nasal secretion and absence of fever. The pathophysiological effects of RAO in the lungs include goblet cell metaplasia, alveolar fibrosis, neovascularization, airway wall thickening affecting all tissue layers, and bronchial smooth muscle hypertrophy. The alveolar macrophage is the main effector of particle elimination in the inflammatory process of RAO, with the ability to increase or suppress inflammatory responses. Activation of macrophages increases the release of cytokines that enhance the inflammatory reaction, such as interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-8, resulting in the attraction of neutrophils to the alveolar environment, which becomes the predominant cell type during periods of crisis. Although the clinical signs of RAO are well-defined, the underlying immunologic mechanisms are still being investigated. This review provides information about this disease, the understanding of which has changed over time.

Keywords: Chemical Mediators. Equine Asthma. Inflammatory Response. Lungs.

Resumo

A Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA) é uma doença inflamatória e obstrutiva, mais prevalente em cavalos estabulados por longos períodos. Os sinais clínicos mais comuns incluem tosse, intolerância ao exercício, dispnéia, secreção nasal e ausência de febre. A patofisiologia da doença nos pulmões inclui metaplasia de células caliciformes, fibrose alveolar, neovascularização, espessamento da parede das vias aéreas afetando todas as camadas de tecido e hipertrofia do músculo liso brônquico. O macrófago alveolar é o principal efetor

Airway endoscopy and tracheal cytology of two-year-old Thoroughbred horses during the first year of race training

S.R.P. Almeida¹, F.Z. Bastos¹, F.C.M. Barusai¹, D.A.B. Lessa², N.X. Alencar² and P.V. Michelotto^{1*}

¹Department of Animal Science, School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba, Paraná 80215901, Brazil; ²School of Veterinary, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho 64, Vital Brasil, Niterói, 24230-340, Brazil; p.michelotto@puccpr.br

Received: 18 January 2018 / Accepted: 27 April 2018
© 2018 Wageningen Academic Publishers

RESEARCH ARTICLE

Abstract

The immunological status of the respiratory tract is critical to racehorses' performance. Respiratory diseases in young Thoroughbred (TB) racehorses are a major concern during their early athletic career. This study investigated the airway adaptations occurring in young TB race horses during their first year of race training. Eighteen animals were evaluated at five different time points over a one-year follow-up period. A physical examination was performed, followed by airway endoscopy, in which tracheal mucus (TM) and pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) were observed. Differential cytology of the tracheal wash (TW) was also performed. The physical parameters in the five assessments and TM grade did not vary. The PLH grade was lower at time-points 3 (T3) and 4 (T4) than at the initial evaluation (T0) ($P=0.028$ and $P=0.036$, respectively). The cytological analysis revealed that neutrophil count decreased at T4 as compared with T0 ($P=0.022$). Epithelial cell count was increased, and macrophage count decreased, at T3 and T4, compared with T0 ($P=0.004$ and $P=0.031$, respectively). Haemosiderophage count was higher at T1 ($P=0.020$) and lower at T2 ($P=0.003$), compared to T0. A statistical correlation between mucus and all cell types was found, showing a non-specific immune response. In conclusion, young TB racehorses underwent airway modifications during the initial months of race training, and a thorough follow-up is needed during the initial period after stabling.

Keywords: equine, haemosiderophage, racehorse, respiratory disease

1. Introduction


Respiratory diseases are a common cause of clinical complaints in equine athletes, and are the second most prevalent condition affecting two-year-old Thoroughbreds (TB) (Wilsher *et al.*, 2006). During the period that yearlings enter a new environment and commence race training, their airways experience constant antigenic challenges. This requires close clinical monitoring. The new environment can incite pulmonary inflammation during the first weeks of stabling (Ivester *et al.*, 2014) and oxidative stress (Michelotto Jr. *et al.*, 2010) associated with exercise-induced pulmonary haemorrhage (Michelotto Jr. *et al.*, 2011), after a few months of race training.

However, airway inflammation can occur in a subclinical form, even though bacteria are present in the tracheal mucus (Newton *et al.*, 2003). The investigation of airway responses to a new and pro-allergenic environment and to exercise is crucial for gaining insights into airway diseases in equine athletes (Richard and Robinson, 2016), and to facilitate appropriate management and preventative measures.

In this context, the present study aimed to observe the airway changes occurring in young TB race horses during their first year of race training, in order to understand the type and timing of these modifications, as a basis for further investigations into preventative protocols.



Mineral supplement with pre- and probiotic improves respiratory immune status in yearling racing Thoroughbred horses: preliminary results

Pedro Vicente Michelotto Júnior^{1*}  Fernanda Cristina Mendes Barussi¹ Fernanda Zettel Bastos¹
Ana Lúcia Lacerda Michelotto¹ Saulo Henrique Weber¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, 80215-901, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: p.michelotto@pucpr.br. *Corresponding author.

ABSTRACT: *There are evidences of intestinal flora influence on the airway immune response. However, this information is scarce with regard to horses. The present preliminary study aimed to investigate the effects of a commercial mineral supplement containing probiotics and prebiotics on the respiratory immune response of horses supplemented with them during the first months of stabling and race training. Twelve TB yearlings were examined at the breeding farm at the beginning of the study (June 2016, henceforth M0) and then reexamined one (July 2016, henceforth M1) and five (November 2016, henceforth M2) months after being stabled at a racetrack in Curitiba, Brazil. Clinical and hematological examinations, airway endoscopy, and tracheal wash (TW) cytology were performed. After the initial examination, horses were randomly divided between the treatment group (TG), which received 10 grams of the supplement daily, and the control group (CG). There was no difference between the groups in terms of clinical parameters; in the hematological examination, eosinophil count was lower in the TG in M1 as compared with M0 ($P = 0.045$). Pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) improved in the TG during M1 as compared with M0 ($P = 0.007$). However, on the CG, PLH remained unchanged. Relative number of eosinophils in the TW was 86.1% higher in M1 than M0 for the CG; in the TG, however, eosinophils were absent and remained within normal limits until M2. In conclusion, this study revealed a positive influence of probiotic and prebiotic supplementation on the respiratory immune response of young TB race horses. Further investigations are recommended.*

Key words: airway inflammation, endoscopy, intestinal flora, prebiotic, probiotic.

Suplemento mineral com pre- e probiótico melhora a condição imunológica respiratória em cavalos sobreano Puro Sangue Inglês de corrida: resultados preliminares

RESUMO: *As doenças respiratórias são uma grande preocupação em cavalos Puro Sangue Inglês (PSI) jovens durante o primeiro ano de treinamento para corrida. Existem evidências da influência da flora intestinal sobre a condição imunológica do organismo, incluindo a resposta de defesa das vias aéreas, porém essas informações são escassas nos cavalos. O presente estudo preliminar teve como objetivo investigar a influência da suplementação com núcleo mineral comercial com probiótico e prebiótico sobre a resposta imunológica respiratória de cavalos PSI durante os primeiros meses de estabulação e treinamento. Doze cavalos PSI na fase de sobreano, machos e fêmeas, foram examinados ainda no haras (M0) e, um mês (M1) e cinco meses (M2) após estabulação no hipódromo em Curitiba, Brasil. Os cavalos foram submetidos a exames clínico e hematológico, endoscopia das vias aéreas e citologia do lavado traqueal (LT). Após o primeiro exame, os cavalos foram divididos aleatoriamente em grupo tratado (GT), que recebeu 10g por dia do suplemento, e grupo de controle (GC). Não houve diferença nos parâmetros clínicos, já no exame hematológico do GT, a contagem de eosinófilos foi menor em M1 quando comparado a M0 ($P = 0,045$). A hiperplasia folicular linfóide ficou dentro do limite normal e menores no GT em M1 quando comparado a M0 ($P = 0,007$), o que não ocorreu para o GC. O número relativo de eosinófilos no LT foi 86,1% maior em M1 versus M0 para o GC, enquanto no GT, os eosinófilos estavam ausentes e permaneceram dentro dos limites normais até M2. Concluindo, neste estudo preliminar, evidenciou-se uma influência positiva da suplementação probiótica e prebiótica na resposta imunológica respiratória de cavalos PSI jovens, justificando investigações adicionais.*


Palavras-chave: endoscopia, flora intestinal, inflamação das vias aéreas, prebiótico, probiótico.

Airway diseases are the major cause of poor performance in race horses, being the second most prevalent condition affecting the two-year-old Thoroughbreds (TB) (WILSHER et al., 2006). Relationship amongst stabling, feeding hay, and respiratory diseases is well understood. It is known that

stabled horses are exposed to high levels of organic dust; this instigates inflammatory processes in the airways (HOLCOMBE et al., 2001).

Some studies with young TB horses beginning race training investigated the importance of the transition from the field to the barn

Case Report

Pine branch of *Araucaria angustifolia* in horse bronchi: A series of four casesF. C. M. Barussi, F. Z. Bastos, L. Zenni, C. E. Camargo and P. V. Michelotto* 

Department of Animal Science, School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

*Corresponding author email: p.michelotto@pucpr.br

Keywords: horse; endoscopy; foreign body; lung; pulmonary

Summary

Horses at pasture are susceptible to the aspiration of foreign bodies. In Curitiba, southern Brazil, four horses of different breeds and ages were examined with regards to a persistent cough that lasted for several months, fetid breath, and no fever. The animals were referred for bronchoscopic examination performed under sedation and tracheobronchial topical anaesthesia. Bronchoscopies in all four horses revealed a pine branch of the species *Araucaria angustifolia*, native to southern Brazil, in the lumen of a third to fifth generation bronchus. Complete removal of the branch was possible in one case using a polypectomy loop inserted through the biopsy channel of the bronchoscope. In two cases, partial removal was possible. In one case the branch was adhered to the swollen mucosa and could not be extracted; this animal is being kept at pasture with intermittent antibiotic treatment as necessary. In conclusion, foreign bodies consisting of pine branches in the tracheobronchial tree of horses may be more common than currently recognised, as *Araucaria* genus is present in other countries and should be suspected in horses with chronic coughing associated with fetid breath and a history of recurrence following symptomatic treatments.

Introduction

The aspiration of foreign bodies (FBs) is a relatively common occurrence in children (Lima *et al.* 2000). Although it seems to be less common in animals, there are a few reports of cases in horses (Urquhart *et al.* 1981; Brown and Collier 1983; Ferrucci *et al.* 2003) and dogs (Abreu *et al.* 2017). In horses, previous reports describe the presence of 12 cm (Urquhart *et al.* 1981), 27 cm (Ferrucci *et al.* 2003) and 70 cm long (Brown and Collier 1983) twigs on the floor of the trachea and extending into the right main bronchus. Indeed, horses at pasture are susceptible to aspiration of FBs (Araújo *et al.* 2014) which can occasionally lodge in the trachea or near the tracheal bifurcation, resulting in a chronic cough persisting for months, nasal discharge, and occasionally a high fever (Urquhart *et al.* 1981; Brown and Collier 1983; Ferrucci *et al.* 2003).

Other clinical signs sometimes present in cases of FBs in the tracheobronchial region include inspiratory dyspnoea, audible stridor localised to the trachea, extension of the head and neck, fetid breath, intermittent bilateral purulent nasal discharge, epistaxis, and reduced exercise tolerance

(Urquhart *et al.* 1981; Brown and Collier 1983). Signs of severe pneumonia may also be present (Hultgren *et al.* 1986).

The present report describes four cases of a FB in equine bronchi due to aspirated branches of *Araucaria angustifolia* (*A. angustifolia*). *A. angustifolia* is a common coniferous species from the south region of Brazil and other regions of the country such as the city of Curitiba, which in Tupi Guarani (regional Indian ethnics) means 'land of many pines' (Curí = pine and Tiba = gathering, many), and also the cities of Araucária, Pinhais, São José dos Pinhais, and Pinhão, among others.

Araucaria is a genus of coniferous trees in the family *Araucariaceae* which consists of three genera (*Agathis*, *Araucaria*, and *Wollemia*) and 41 species. This is mostly found in the southern regions of South America, southern Asia, Malaysia, Philippines, New Caledonia, Australia, New Zealand and some Pacific Islands (Christenhusz *et al.* 2017). In addition, the American Conifer Society, in its website, describes the origin and distribution of the *Araucariaceae* family, showing that there are some species of *Araucaria* that were introduced especially in the southern and western parts of the United States (American Conifer Society 2019) (**Supplementary Items 1–4**).

Case histories

Four horses were seen for veterinary care in the region of the city of Curitiba, in the Paraná state, located in southern Brazil. All animals had free access to native pasture and were examined for a persistent cough of several months' duration.

Case 1 was a male Thoroughbred yearling at a breeding farm, that had a history of persistent coughing, fetid breath, and purulent bilateral nasal discharge. Case 2 was a 10-year-old Appaloosa mare used for pleasure riding originating from the city of São Bento do Sul, Santa Catarina state, in southern Brazil, that was examined for persistent coughing while exercising. Case 3 was another Appaloosa horse, a 20-year-old gelding, and Case 4 was a male 5-year-old Crioulo breed horse. The major complaint of these horses was a chronic cough, of about 12 months' duration in Case 3 and approximately 2 months' duration in Case 4. Case 1 was cared for by the farm's resident veterinarian, who promptly identified a condition needing specialised attention; the other cases were examined by different practitioners and had been treated with antibiotics and anti-inflammatory drugs, but without resolution of the signs. Cases 3 and 4 were being used for pleasure riding activities, although the owners reported exercise intolerance.

This study was awarded at the poster presentation at the 15th World Equine Veterinary Association Congress in Beijing.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvjl

Occurrence of exercise-induced pulmonary haemorrhage in show jumping horses

C.C.M. Bonomo^a, P.V. Michelotto^{b,*}, C. Viccino^a, F.C.M. Barussi^b, W.R. Fernandes^a

^aDepartamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo 05508270, Brazil

^bDepartamento de Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215030, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Equine
Endoscopy
Haemosiderophages
Respiratory system
Tracheobronchial lavage

ABSTRACT

Pulmonary haemorrhage occurs in sport horses performing high-intensity exercise, but the factors involved in the occurrence of pulmonary haemorrhage in jumping horses have not been elucidated. This study aimed to determine the occurrence of pulmonary haemorrhage and factors involved in competitive jumping horses. Fifty adult jumping horses competing in the city of São Paulo, Brazil, were included. The horses were divided into two groups based on jump height at competition: Low group (LG, $n = 26$), with jump height between 1.00 and 1.20 m, and High group (HG, $n = 24$), with jump height between 1.30 and 1.50 m. Physical examination was performed before and after competition, and airway endoscopy and tracheal wash (TW) were performed 1 h after competition.

Heart rate (HR; $P < 0.010$), respiratory rate (RR; $P < 0.010$), rectal temperature (RT; $P < 0.010$), and frequency of endoscopic observations of blood in the tracheal lumen ($P < 0.013$) were significantly higher in HG than in LG. TW cytology was not different between the two groups. Incidence of pulmonary haemorrhage was positively correlated with jump height ($r^2 = 0.40$, $P < 0.0001$), post-exercise HR ($r^2 = 0.31$, $P < 0.0001$), and post-exercise RR ($r^2 = 0.19$, $P < 0.002$). In conclusion, pulmonary haemorrhage in jumping horses was associated with the level of performance. Further studies on the pathophysiology of exercise-induced pulmonary haemorrhage in this type of horses are required.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Pulmonary bleeding in sport horses is considered as a physiological response to intense exercise (Poole and Erickson, 2016). The equine species has evolved to attain a high capacity for athletic performance that requires rapid gas exchange; however, there are concurrent drawbacks of fragility and some difficulty in withstanding high pulmonary vascular pressures at high speeds (West, 2013). Exercise-induced pulmonary haemorrhage (EIPH) occurs due to stress failure of the pulmonary capillaries (Birks et al., 1997) caused by high transmural pressure, which is a result of high pulmonary arterial pressure and negative alveolar pressure (West, 2000). Pulmonary arterial pressure approaching 90 mmHg during intense speed exercise results in pulmonary capillary failure (Meyer et al., 1998; Langsetmo et al., 2000), and venous remodelling, which occurs in the caudodorsal aspect of the lung, can aggravate stress failure and EIPH (Williams et al., 2013).

EIPH has been described in non-racehorses (Voynick and Sweeney, 1986; Araya et al., 2005; Silva et al., 2013; da Silva et al., 2017), and in horses undergoing low-intensity exercise, which is defined as approximately 70–80% of mean pulmonary arterial pressure achieved at maximal running speed (Epp et al., 2006). Therefore, other possible underlying mechanisms of EIPH should be investigated. Extravascular causes, such as pulmonary inflammation (Newton and Wood, 2002; McKane and Slocombe, 2010; Michelotto Jr. et al., 2011), and upper airway instability due to rider interference (Van Erck, 2011) have been associated with increased risk of EIPH. Moreover, the mechanical stress from the thoracic impact of the forelimbs during locomotion should be considered in performance horses (Schroter et al., 1999).

To date, most studies on EIPH in racehorses have assessed the association with speed. However, to the best of our knowledge, no study has examined the impact of different levels of performance on the occurrence of EIPH in horses performing other activities, such as competitive jumping. Thus, the present study aimed to determine the occurrence of EIPH in a sample of jumping horses competing at different levels of jump heights (1.10–1.50 m). The hypothesis of the study was that pulmonary bleeding is associated

* Corresponding author.
E-mail address: p.michelotto@pucpr.br (P.V. Michelotto).

Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves)

David B. Tesarowski, PhD; Laurent Viel, DMV, PhD; Wayne N. McDonell, DVM, PhD

Objectives—To evaluate the degree of reproducibility in clinical variables, blood gas measurements, and lung function variables, and the changes in these variables caused by exposure to moldy hay in naturally sensitized and control horses.

Procedure—The magnitude of variation in arterial blood gas and pulmonary function measurements were evaluated in a model of naturally acquired heaves. Horses with heaves and similarly aged control horses were studied prior to moldy hay challenge and again after the horses with heaves manifested clinical signs of airway obstruction. This cycle of testing was repeated 3 times to determine the variation of the before and after challenge measurements. Variables evaluated for repeatability included: clinical score; arterial O₂ and CO₂ tensions; pulmonary function variables, such as breathing rate (f), tidal volumes, and flow rates; lung resistance (RL); dynamic compliance; and work of breathing (W_b).

Results—Before challenge, significant differences observed between control horses and horses with heaves included clinical score, expiratory flow rate at near-end expiration, RL, and W_b. After exposure to moldy hay, variables measured in control horses were largely unchanged. However, in the afflicted horses, significant changes were observed for clinical score, arterial O₂ and CO₂ tensions, breathing rate, peak tidal inspiratory and expiratory flow rates, dynamic compliance, RL, and W_b, compared with prechallenge values and with control horses' postchallenge values. Analysis of the data revealed few statistically significant differences between repeats of challenges.

Conclusion—Horses afflicted with heaves manifest airway obstruction that can be measured in repeatable fashion. (*Am J Vet Res* 1996;57:1214–1219)

The equine species is one of the few species in which an allergic condition involving the lung as a target organ is common. Moreover, horses are the only animal in which naturally acquired recurrent airway obstruction has been partially characterized.^{1,2} The cause of this chronic obstructive pulmonary disease (heaves) is unknown, but hypersensitivity to fungal antigens has been reported in horses with heaves, and documented by results of active and passive cutaneous

anaphylaxis tests and inhalation challenge with the appropriate antigen.^{3,4} Allergic horses may develop a type-I or a type-III hypersensitivity response to antigen challenge.^{4,6}

Inflammation of the airways and pulmonary function testing have led scientists to believe that the condition has remarkable similarity to asthma in human beings. In both conditions, there are increases in lung resistance (RL) and work of breathing (W_b); maximal changes in pleural pressure ($\Delta P_{pl,max}$) and functional residual capacity; and decreases in multi-breath nitrogen clearance rates, dynamic compliance (C_{dyn}), and arterial O₂ tension values.^{7–10,a} Recently, a comparison of tidal breathing flow-volume loops in control horses and horses with recurrent airway obstruction was reported,¹¹ and the conclusion was that flow-volume loops were better able to identify diseased horses in remission than were the more common measurements, RL and C_{dyn}. It is widely accepted that when horses with heaves in remission are exposed to moldy hay, they develop characteristic airway obstruction. Most of these measurements have been carried out in horses with severe signs of heaves. However, there has been no systematic examination of the comparative efficacy of the various possible pulmonary function tests in identifying horses with less severe airway obstruction, nor has there been a study of the repeatability of the respiratory response in susceptible horses when given a standardized challenge.

Therefore, the specific objectives of the study reported here were to evaluate the degree of reproducibility in clinical variables, blood gas measurements, and lung function variables, and the changes in these variables caused by exposure to moldy hay in naturally sensitized and control horses. Further, it was also of interest to determine which of the indices of pulmonary function differed the most between control horses and horses with heaves, while horses were in remission and after environmental challenge.

Materials and Methods

Horses—Experiments were performed, using 12 horses in 2 groups: control horses with no respiratory tract disorders (4 to 23 years old [mean \pm SEM, 13.5 \pm 3.6 years]; 1 gelding, 5 mares), and horses with clinical diagnosis of recurrent heaves (6 to 15 years old [mean \pm SEM, 10 \pm 1.7 years]; 3 geldings, 3 mares). The respiratory health status of the control horses was established on the basis of history, clinical and bronchoscopic examinations, resting RL, C_{dyn}, and $\Delta P_{pl,max}$ values, blood gas analysis, and lack of clinical response to an environmental challenge performed prior to commencement of the study. Horses in the heaves group manifested few signs of respiratory dysfunction while on pas-

Received for publication Apr 10, 1995.

Manuscript passed review Oct 18, 1995.

From the Department of Clinical Studies, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1.

Supported by the Canadian Lung Association, the Ontario Thoracic Society, and the Firran Foundation.

The authors thank Dan Schnurr and Dr. Ivan Linjacki for technical assistance.

Address correspondence to Dr. Viel.

ture, but responded to a preliminary environmental challenge with a clinical response typical of the equine heaves syndrome.^{1,5,8,10} These included the clinical and cytologic variables: increased respiratory frequency (RF), cough, dyspnea with abdominal effort, and wheezes on auscultation; presence of mucopurulent debris on tracheal endoscopy; and high inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage fluid.⁹

Experimental protocol—Each testing cycle, or visit, started with the horses being housed outdoors for a prolonged period (6 to 12 weeks), to ensure that heaves in these horses would be in clinical remission. The horses were then brought into an air-conditioned box stall, modified so that it could be made into an environmental chamber. Horses were tested in pairs, 1 control and 1 with heaves. Prior to being challenged in the environmental chamber and during each day after initiation of the challenge, the horses were clinically examined and given a weighted score, using a modification of a system devised by Hoffman et al.² (Appendix). All clinical observations were made by the same individual, who was initially blinded to the group identity of the horses. Clinical examination was conducted each morning between 8 and 9 AM. Initial testing was performed when heaves was in remission (ie, horses had no clinical signs of heaves). Testing was repeated after 1 to 3 days in the environmental chamber when the horse with heaves had clinical signs of heaves (clinical score ≥ 6). Arterial blood gas analysis and pulmonary function tests were performed before commencing the environmental challenge and after the onset of clinically evident heaves. The control horses were tested at the same periods. All testing was performed on animals under normal feeding conditions. This protocol was repeated 3 times for each pair of horses, separated by 6 to 8 weeks of outdoor accommodation. One horse from the heaves group was dropped from the study after 2 repeats because of injury sustained while on pasture.

The environmental chamber with a common, controlled airspace was constructed by enclosing 2 adjacent box stalls with plywood around the perimeter and removable plexiglass sheeting in the doors. The common wall (3.5 m long, 3.5 m high) had a 1.5-m concrete base, and its top was open except for iron bars at 20-cm intervals, providing a 7-m² area for uninterrupted air exchange between the 2 box stalls. A variable-speed exhaust fan, air conditioner, and the plexiglass "windows" were used to regulate temperature and airflow in the chamber. During the period of environmental challenge, horses were bedded on dusty straw, and moldy hay taken from a single batch was shaken twice daily in the chamber for 5 minutes in each half of the chamber. Horses were fed the same hay from the floor. The dusty straw and moldy hay challenge itself was regulated within and between each testing session by measurement of the numbers of respirable dust particles (< 10 μ m), using a particle counter.⁸ A minimum measurement of 20 mg of dust/m³ was required and maintained for the 5-minute period.

Measurements—Samples of arterial blood were obtained prior to pulmonary function testing by carotid artery puncture (20-gauge, 3.75-cm needle) into heparinized, cooled, glass syringes and kept on ice for analysis (< 15 minutes from sample collection). Arterial O₂ (PaO₂) and CO₂ (PaCO₂) tensions were corrected for rectal temperature and recorded for subsequent analysis.

The general methods used for pulmonary function testing in our laboratory have been described.^{10,13} Horses were restrained by use of a lead and halter in a 1 \times 2-m stock without sedation. A flexible, in-house-designed plastic face mask was fitted over the muzzle of the animals and connected to a low-resistance, nonbreathing valve¹⁴ to facilitate the aerosol delivery of histamine for bronchoprovocation. A heated Fleisch No. 4 pneumotachograph⁸ was used to measure air flow, and volume was derived by the electronic integration of the flow signal.⁶ Transpulmonary pressure was

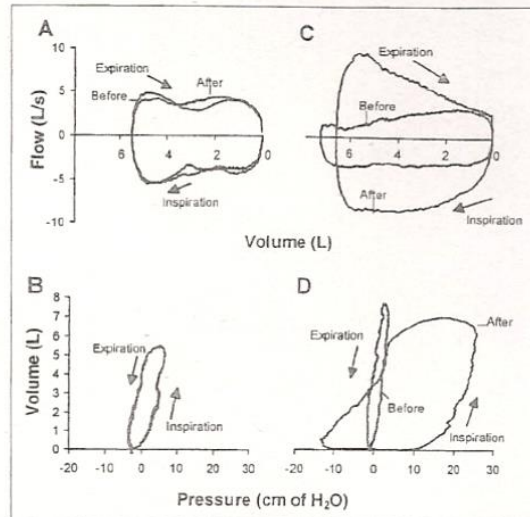


Figure 1—Typical pre- and postchallenge flow- and pressure-volume loops obtained from a control horse and a horse with heaves before and after exposure to moldy hay. A—Flow-volume loops in a control horse. B—Pressure-volume loops in a control horse. C—Flow-volume loops in a horse with heaves. D—Pressure-volume loops in a horse with heaves.

measured as the difference between pressure at the airway opening (facemask) and pressure in a latex esophageal balloon (10 cm long, with 3 ml of air injected, attached to a 2-m polyethylene catheter, 2.69 mm ID, 3.5 mm OD), inserted to mid-thorax to estimate pleural pressure. The frequency response of the transducer/catheter systems were measured, and amplitude was found to be without attenuation up to 20 Hz. The phase lag between the pressure and flow signals was corrected by use of a digital delay system.¹ The system was calibrated prior to each use, using a water manometer and a 10-L syringe⁶ modified to permit easy expulsion of air from within.

The flow and pressure signals were collected and stored on a personal computer for respiratory loop analysis, using software.⁸ A total of 5 to 10 breaths from each recording segment, chosen on the basis of loop closure and uniformity, were averaged and the values were entered along with clinical scores and arterial blood gas values into a computerized spreadsheet for statistical analysis. Flow-volume loops were analyzed as described for cats¹⁵ and horses,¹¹ and values for RF, tidal volume (V_T), peak inspiratory and expiratory flow rates (PIF and PEF), and PEF at 88% of the V_T (EF₈₈) were recorded. Pressure-volume loops were analyzed from the same selected breaths, with the following variables recorded: R_L (averaged over the whole loop), ΔP_{plmax} , C_{dyns}, and W_b, corrected for V_T. Typical flow- and pressure-volume loops were recorded before and after challenge for a control horse and a horse with heaves (Fig 1A–D).

Statistical analysis—Analysis was performed for most variables, using general linear modeling¹ and, when appropriate (probability of F statistic < 0.05), comparison of means was carried out, using a test of least significant difference. When significant difference was detected between visits, each visit was analyzed separately, using either paired or unpaired tests, depending on whether the testing was within or between control and heaves groups. For clinical score, Wilcoxon's signed rank test was used to analyze the difference between pre- and postchallenge observations for the control and heaves groups; the Mann-Whitney U test served to analyze the difference between control and heaves groups before and after challenge; and an unweighted Pois-

son regression¹ was performed to evaluate the effect of visit on scores. The duration of exposure required to induce a clinical score ≥ 6 in the heaves group was analyzed, using a Kruskal-Wallis one-way nonparametric ANOVA. Throughout the text, arithmetic mean and SEM are stated. Given that one of the objectives was to determine which of the measured variables most clearly differed between control horses and horses with heaves, actual levels of significance are reported where appropriate.

Results

With the exception of the horses with induced exacerbation of heaves, all were in good health and all maintained excellent body condition throughout the study.

The duration of exposure in the environmental chamber required to induce clinical signs (score ≥ 6) of disease in horses with heaves was determined (Table 1). Although there appeared to be a shorter required duration of exposure for the horses in visit 3, this difference was not significant.

Statistical analysis of measurements obtained for the repeats, either before or after environmental challenge, was performed (Table 2). With the exception of C_{dyn} before challenge in control horses ($P = 0.03$), there was no significant difference between any of the other measurements, indicating their repeatability. Thus, for subsequent analysis, data for all variables other than C_{dyn} from the 3 visits were pooled and analyses were performed on the pooled means.

There was no statistically significant difference in clinical scores between groups prior to environmental challenge (Fig 2). Challenge with moldy hay in the environmental chamber caused significant increase in clinical scores for both groups (control, $P = 0.016$; heaves, $P = 0.001$) with the difference between heaves and control groups also significant ($P = 0.001$). No

Table 1—Days to develop clinical score ≥ 6 in environmental chamber for horses with heaves

Horse	Visit 1	Visit 2	Visit 3
1	2	2	2
2	2	2	1
3	3	3	2
4	3	2	2
5	2	2	1
6	2	2	ND
Mean	2.33	2.17	1.40
SEM	0.21	0.17	0.24

ND = not determined.

Table 2—General linear model results for variation between visits before and after environmental challenge

Variable	Control horses		Horses with heaves	
	Before Pr > F	After Pr > F	Before Pr > F	After Pr > F
f	0.85	0.51	0.89	0.98
Vr	0.22	0.40	0.51	0.95
PIF	0.52	0.06	0.92	0.93
PEF	0.60	0.79	0.95	0.49
EF ₈₈	0.93	0.63	0.45	0.99
PEF/EF ₈₈	0.53	0.95	0.61	0.82
R _L	0.11	0.95	0.55	0.84
C _{dyn}	0.03	0.53	0.91	0.82
W _b	0.37	0.97	0.81	0.89

Pr > F = probability of the value obtained during general linear modeling is greater than the F statistic; f = respiratory frequency (breaths/min); Vr = tidal volume (L); PIF = peak inspiratory flow rate (L/s); PEF = peak expiratory flow rate (L/s); EF₈₈ = expiratory flow rate at 88% of expired volume (L/s); PEF/EF₈₈ = ratio of PEF/EF₈₈; R_L = lung resistance (cm of H₂O/L/s); C_{dyn} = dynamic compliance (L/cm of H₂O); and W_b = work of breathing (kg-cm of H₂O/L).

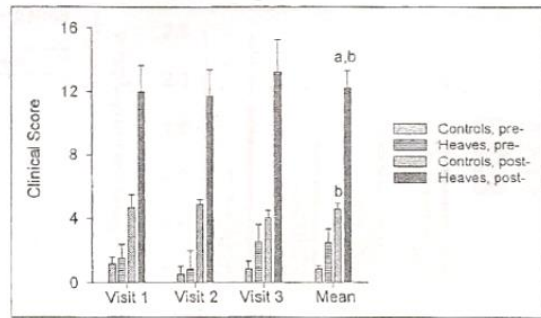


Figure 2—Effect of environmental challenge on clinical scores in horses. Challenge with moldy hay resulted in high scores in horses with heaves and control horses. *Significantly different from the same time-point control values; ^asignificantly different from pre-environmental challenge values. Mean \pm SEM are shown for each visit; $n = 6$ for each group, with the exception of the heaves group for visit 3, where $n = 5$. The pooled mean and SEM for the visits also is shown.

significant differences in scores between any of the visits for either group were observed.

There were no significant differences in the measurements of Pa_{O_2} and Pa_{CO_2} in control horses. Measurements of Pa_{O_2} and Pa_{CO_2} indicated significant decrease in Pa_{O_2} ($P = 0.023$) and increase in Pa_{CO_2} ($P = 0.019$) in horses with heaves after challenge (Table 3). The difference in Pa_{O_2} values between groups after environmental challenge was significant ($P = 0.0015$). The values obtained for Pa_{CO_2} in horses with heaves after challenge on visit 1 were significantly different ($P = 0.0343$) from values for the other visits.

Analysis of flow-volume loop data revealed no significant differences in the repeatability of variables measured during the 3 challenge cycles, before or after challenge in either group (Table 4). However, significantly higher Rf ($P = 0.02$), PIF ($P = 0.04$), PEF ($P = 0.02$), and EF₈₈ ($P = 0.047$) and an increase in the ratio of PEF to EF₈₈ ($P = 0.003$) were observed in horses with heaves comparing pre- and postchallenge values. Compared with the control group after challenge, horses with heaves had significantly higher Rf ($P = 0.035$), PIF ($P = 0.0001$), and PEF ($P = 0.0001$) and an increase in the PEF-to-EF₈₈ ratio ($P = 0.0001$).

With respect to variables obtained from pressure-volume loop analyses, there was a significant difference before challenge between groups for R_L ($P = 0.016$; Fig 3) and W_b ($P = 0.025$). After environmental challenge, these differences were greater ($P = 0.001$ for R_L and W_b).

There was a significant difference between C_{dyn} values obtained between visits for the control group before environmental challenge. Thus, the data were analyzed per visit (Fig 4). During visit 1, there was no statistical difference between values in the control horses before challenge versus after challenge, or in horses with heaves, or between groups, either before or after challenge, although values in horses of the heaves group were, on average, lower. During visit 2, there was significant difference between the control and heaves group data before ($P = 0.04$) and after environmental challenge ($P = 0.01$). Environmental challenge caused significant decrease in C_{dyn} in horses of the heaves group ($P = 0.01$), but not in control

Table 3—Arterial blood oxygen and carbon dioxide partial pressures observed during repeated visits

Variable	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Mean
Control horses				
Before environmental challenge				
PaO ₂	95.7 ± 2.3	97.3 ± 1.8	95.2 ± 2.6	96.06 ± 1.23
Paco ₂	41.2 ± 1.5	42.3 ± 2.2	43.7 ± 1.3	42.44 ± 0.96
After environmental challenge				
PaO ₂	96.0 ± 2.0	95.9 ± 3.6	92.6 ± 2.2	94.86 ± 1.50
Paco ₂	40.5 ± 2.1	43.4 ± 1.2	44.8 ± 1.3	42.87 ± 0.96
Horses with heaves				
Before environmental challenge				
PaO ₂	95.5 ± 4.4	92.8 ± 4.7	89.4 ± 6.5	92.75 ± 2.85
Paco ₂	42.5 ± 1.1	42.1 ± 0.9	40.5 ± 0.8	41.78 ± 0.55
After environmental challenge				
PaO ₂	85.5 ± 5.1 ^{a,b}	81.8 ± 4.3 ^{a,b}	78.5 ± 9.2 ^{a,b}	82.11 ± 3.42 ^{a,b}
Paco ₂	41.6 ± 1.5 ^c	46.2 ± 1.3 ^b	49.0 ± 4.1 ^b	44.69 ± 1.04 ^b

^aSignificantly different from the same time-point values in control horses; ^bsignificantly different from values obtained before environmental challenge; and ^csignificant effect of visit.

PaO₂ = arterial blood partial pressure of oxygen, mm of Hg; Paco₂ = arterial blood partial pressure of carbon dioxide, mm of Hg.

Data are expressed as mean ± SEM (n = 6); data from visits 1-3 were pooled.

Table 4—Effect of environmental challenge on flow-volume loop parameters observed during repeated visits

Variable	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Mean
Control horses				
Before environmental challenge				
f	15.00 ± 1.24 ^b	15.50 ± 1.95	13.83 ± 2.79	14.78 ± 1.14
Vt	6.47 ± 0.40	6.66 ± 0.66	7.34 ± 0.63	6.82 ± 0.33
PIF	4.79 ± 0.28	5.44 ± 0.47	5.17 ± 0.42	5.13 ± 0.22
PEF	4.56 ± 0.11	5.09 ± 0.60	4.56 ± 0.40	4.74 ± 0.24
EF ₈₈	3.63 ± 0.24	3.61 ± 0.46	3.45 ± 0.35	3.56 ± 0.19
PEF/EF ₈₈	1.29 ± 0.11	1.45 ± 0.14	1.36 ± 0.05	1.36 ± 0.06
After environmental challenge				
f	17.00 ± 2.29	14.00 ± 1.44	14.00 ± 2.27	15.00 ± 1.16
Vt	5.99 ± 0.48	6.39 ± 0.15	6.96 ± 0.74	6.44 ± 0.30
PIF	4.76 ± 0.33	4.68 ± 0.30	5.17 ± 0.54	4.87 ± 0.23
PEF	5.05 ± 0.55	4.54 ± 0.42	4.86 ± 0.62	4.82 ± 0.30
EF ₈₈	3.59 ± 0.44	3.04 ± 0.46	3.22 ± 0.25	3.28 ± 0.22
PEF/EF ₈₈	1.53 ± 0.29	1.53 ± 0.29	1.54 ± 0.21	1.59 ± 0.14 ^d
Horses with heaves				
Before environmental challenge				
f	15.50 ± 1.95	14.33 ± 1.58	15.00 ± 1.92	14.94 ± 0.99
Vt	6.34 ± 0.15	7.06 ± 0.21	6.53 ± 0.53	6.64 ± 0.19
PIF	5.04 ± 0.67	5.34 ± 0.36	5.13 ± 0.55	5.17 ± 0.29
PEF	5.82 ± 1.17	5.42 ± 0.64	5.81 ± 1.22	5.68 ± 0.55
EF ₈₈	2.82 ± 0.26	3.25 ± 0.23	3.04 ± 0.22	3.04 ± 0.14 ^a
PEF/EF ₈₈	2.09 ± 0.39	1.96 ± 0.15	1.89 ± 0.33	1.88 ± 0.17 ^a
After environmental challenge				
f	18.50 ± 2.45	18.83 ± 1.38	18.00 ± 1.87	18.47 ± 1.06 ^{a,b}
Vt	6.29 ± 0.38	5.78 ± 0.32	6.09 ± 0.36	6.05 ± 0.20
PIF	6.34 ± 0.76	6.09 ± 0.61	6.13 ± 0.74	6.19 ± 0.38 ^a
PEF	7.46 ± 0.90	6.36 ± 0.54	7.04 ± 0.43	6.94 ± 0.39 ^{a,b}
EF ₈₈	2.73 ± 0.39	2.73 ± 0.31	2.67 ± 0.21	2.71 ± 0.18 ^b
PEF/EF ₈₈	2.87 ± 0.37	2.55 ± 0.43	2.69 ± 0.22	2.71 ± 0.20 ^{a,b}

^aSignificantly different from control values; ^bsignificantly different from values obtained before environmental challenge. n = 5 to 6 for each group.

horses. During visit 3, there was no difference between pre- and postchallenge values for the control group, the heaves group, and between groups before challenge, although there was significant difference between groups after challenge ($P = 0.018$). The difference in averaged C_{dV1} values across the visits (to be consistent with other variables) between groups before challenge was not significant, but postchallenge values were significantly ($P = 0.01$) different.

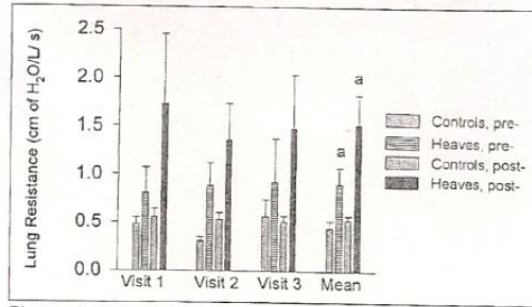


Figure 3—Effect of environmental challenge on lung resistance in horses. Challenge with moldy hay resulted in increased resistance in horses with heaves. See Figure 2 for key.

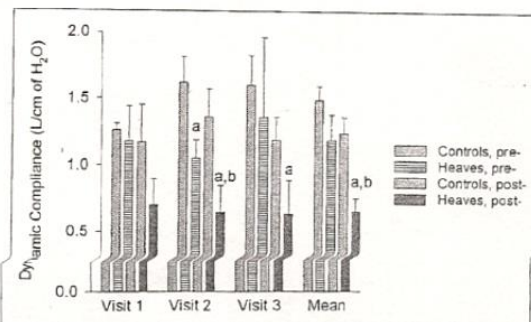


Figure 4—Effect of environmental challenge on dynamic compliance in horses. Challenge with moldy hay resulted in decreased compliance in horses with heaves. See Figure 2 for key.

Discussion

Results of this study indicate that intermittent environmental challenge with moldy hay causes repeatable changes in clinical signs of disease, arterial blood gas tensions, and pulmonary function variables in a group of horses with heaves, a recurrent airway obstruction syndrome.

Heaves in horses is a naturally acquired disease. Daily feeding of poor-quality hay has been known for centuries to induce and provoke heaves in a segment of the equine population.^{1,16} Hay contains a number of fungi and actinomycetes that are potential allergens.^{4,17} Research workers¹⁸ have published a list of 53 such agents. The high prevalence of heaves is likely a result of sensitization to these agents, as evidenced by positive skin test result, Prausnitz-Kustner passive cutaneous anaphylaxis results, and a Schultz-Dale response in pulmonary vein strips.¹⁹

The moldy hay challenge used in this study was performed in a specially constructed environmental chamber with regulated airflow rather than in an open barn, to ensure an intense challenge. In each affected horse, heaves was exacerbated within 1 to 3 days (mean, 2) during each repeat of the challenge. Although not statistically significant, a decrease in required time of exposure was observed for visit 3, likely because of persistence of airway inflammation in the absence of clinical airway obstruction. The time to achieve clinical signs of heaves has been reported by Gray et al²⁰ to be between 6 and 30 days. This duration is far longer than that observed in this study, although

the method used to induce clinical signs of heaves is different (ie, their ponies were left in a barn, bedded on straw, and fed poor-quality hay whereas horses of this study were actively challenged twice per day with moldy hay in a controlled airspace chamber).

Development of early onset of airway obstruction (within hours) in these horses was not evaluated. For practical purposes, pulmonary function and other testing was not initiated until clinical signs of airway obstruction were detected during the daily morning physical examinations.

The data presented here for arterial blood gas analysis compared favorably with reports in literature for P_{aO_2} values.^{2,10,21} Analysis indicated that horses with exacerbated heaves were significantly hypoxemic (P_{aO_2} , 82.11 ± 3.42 mm of Hg), compared with the control group and with normal reference values.²² Horses of the heaves group after challenge were also hypercapnic (P_{aCO_2} , 44.69 ± 1.04 mm of Hg), compared with the control group and normal reference values.²² This difference between groups of horses was not found in previous studies.^{1,10,20} Results of this study also confirm previous findings relating to a number of pulmonary function variables. They include decreases in C_{dyn} and increases in R_L , breath frequency,^{2,8,10} W_b ,¹⁰ PIF and PEF, and ratio of peak expiratory flow and flow near the conclusion of expiration¹² during exacerbation of heaves.

Petsche et al¹¹ reported that the most useful variables in differentiating between control horses and horses with heaves in remission were inspiratory and expiratory flow rates at 50% of VT and the volume at peak inspiratory flow. Although these variables were not initially chosen for analysis in our study, posthoc analysis revealed no significant differences between values for control horses and horses with heaves in remission. Our values for control horses were higher than those observed by Petsche et al,¹¹ although a striking dissimilarity exists between the ages of horses used in the latter study (control horses, 5 years old; horses with heaves, 19 years old) and our study in which horses were approximately age-matched (controls, 13.5 years old; horses with heaves, 10 years old). Our control horses were chosen on the basis of lack of a clinically important response to moldy hay challenge (clinical score ≥ 6) in the environmental chamber and absence of respiratory tract disorders. Clearly, our horses are not "normal" in view of the Petsche et al¹¹ study, but made excellent controls for the horses with heaves used in our study. Another difference between the testing systems was our use of a nonbreathing valve attached to the pneumotachograph to facilitate another pulmonary function test. This increases dead space and volumes and could interfere with sensitivity of the use of those variables to detect disease, although both groups of horses would be affected, not just the control group.

The small magnitude of changes and repeatability of objective variables, such as arterial blood gas tensions and lung function, was evident during the course of the study when repeat pre- and postchallenge observations were compared. Generally, there was no statistically significant difference between variables when either the pre- or postenvironmental challenge data were compared over the 3 independent testing periods. The only exceptions were the P_{aCO_2} values in the

postchallenge period of the horses of the heaves group and the compliance values in the control horses before challenge. It should be noted, however, that significant interhorse variability exists, with coefficients of variation in normal animals reported to be $> 39\%$.²³ This variability can be minimized by pooling data within groups as we did in this study. This conclusion also was made by Derksen et al.²³ The C_{dyn} data by itself should be interpreted with caution. However, given the reproducibility and direction of changes in other measurements and the trends observed with C_{dyn} , these concerns can be minimized.

In conclusion, reproducibility of the challenge and the reversible nature of airway obstruction observed in this study argue for continued study to benefit the equine population to elucidate the pathogenesis of heaves. These data are also important in the context of comparative asthma research; Snapper²⁴ suggests that horses with heaves are perhaps the best large animal model available for the study of asthma in human beings.

Appendix 1 Weighted clinical scoring system

Variable	Descriptor	Score
Respiratory rate (breaths/min)	< 15	0
	16-20	1
	21-25	2
	25-29	3
	> 30	4
Nasal discharge	None	0
	Serous	1
	Mucopurulent	3
Abdominal lift	None	0
	Mild (perceptible heave line)	1
	Pronounced (abdomen, thorax, and anal movement)	3
Nasal flaring	None	0
	Present	1
Tracheal sounds	Normal (tubular sound)	0
	Increase in intensity	1
	Mucus movement	3
Bronchial tones	Normal	0
	Audible ventral and dorsal sounds	2
	Crackles	0
Wheezes	Present	2
	None	0
Cough	Present	2
	None	0
	Intermittent	1
Thoracic resonance	Paroxysmal	3
	Normal lung field	0
	Expanded dorsal and ventral lung fields	2
Total	25

¹Viel L. *Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease*. PhD thesis, Department of Pathology, University of Guelph, Guelph, 1983.

²Model PDM-3, Hoskin Scientific, Burlington, Ontario, Canada.

³Model ABL3/30, Radiometer Inc, Copenhagen, Denmark.

⁴Gould Electronics, Bilthoven, The Netherlands.

⁵Pulmonary mechanics analyzer model 6, Buxco Electronics Inc, Sharon, Conn.

⁶Digital delay line, Buxco Electronics Inc, Sharon, Conn.

⁷Model OV6-7966, Houston Atlas Inc, Houston, Tex.

⁸Respiratory loop analysis, Buxco Electronics Inc, Sharon, Conn.

⁹PC SAS, SAS Institute, Cary, NC.

¹⁰Statistix, Analytical Software, St Paul, Minn.

References

- Lowell FC. Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse. *J Allergy* 1964;35:322-330.
- Derksen FJ, Robinson NE, Armstrong PJ, et al. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J Appl Physiol* 1985;58:598-604.

3. Halliwell REW, Feischman JB, Mackey-Smith M, et al. The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses. *J Am Vet Med Assoc* 1979;174:277-281.
4. McPherson EA, Lawson GHK, Murphy JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses: aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge. *Equine Vet J* 1979;11:159-166.
5. Gerber H. Chronic pulmonary disease in the horse. *Equine Vet J* 1973;5:26-33.
6. Breeze RG. Heaves. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1979;1:219-230.
7. Gillespie JR, Tyler WS, Eberly VE. Pulmonary ventilation and resistance in emphysematous and control horses. *J Appl Physiol* 1966;21:416-422.
8. Muylle E, Oyaert W. Lung function tests in obstructive pulmonary disease in the horse. *Equine Vet J* 1973;35:37-44.
9. McPherson EA, Lawson GHK, Murphy JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses. *Equine Vet J* 1978;10:47-53.
10. Willoughby RA, McDonell WN. Pulmonary function testing in horses. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1979;1:171-196.
11. Petsche VM, Derksen FJ, Robinson NE. Tidal breathing flow-volume loops in horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res* 1994;55:885-891.
12. Hoffman AM, Viel L, Muckle CA, et al. Evaluation of sulbactam plus ampicillin for treatment of experimentally induced *Klebsiella pneumoniae* lung infection in foals. *Am J Vet Res* 1992;53:1059-1067.
13. Gallivan GJ, McDonell WN. Comparative pulmonary mechanics measurements in the horse and cow. *Res Vet Sci* 1989;46:331-336.
14. Gallivan GJ, Bignell W, McDonell WN, et al. Simple non-rebreathing valves for use with large animals. *Can J Vet Res* 1989;53:143-146.
15. McKiernan BC, Dyne JA, Rozanski EA. Tidal breathing flow-volume loops (TBFVL) in healthy and bronchitic cats. *J Vet Intern Med* 1993;7:388-393.
16. Cook WR, Rossdale PD. The syndrome of broken wind in horse. *Proc R Soc Med* 1963;56:22-27.
17. Woods PSA, Robinson NE, Swanson M, et al. Measurement of airborne dust and aeroallergen concentration in pony barns with two different management systems. *Equine Vet J* 1993;25:208-213.
18. Clarke AF, Madelin T. Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source materials. *Equine Vet J* 1987;19:442-447.
19. Eyre P. Equine pulmonary emphysema: a bronchopulmonary mould allergy. *Vet Rec* 1972;91:134-140.
20. Gray PR, Derksen FJ, Broadstone RV, et al. Decreased airway mucosal prostaglandin E₂ production during airway obstruction in an animal model of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:586-591.
21. Armstrong PJ, Derksen FJ, Slocombe RF, et al. Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am Rev Respir Dis* 1986;133:357-361.
22. *Veterinary teaching hospital undergraduate manual*. Guelph, Ontario, Canada: Ontario Veterinary College, 1992.
23. Derksen FJ, Robinson NE, Slocombe RF, et al. Pulmonary function tests in standing ponies: reproducibility and effect of vagal blockade. *Am J Vet Res* 1982;43:598-602.
24. Snapper JR. Large animal models of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:351-352.

FICHA CLÍNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS

Proprietário: _____ Médico Veterinário: _____
 Nome do animal: _____ data: / / _____ hora: _____
 Raça: _____ Sexo: _____ Idade: _____
 Queixa: _____

Exame geral

Comportamento <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> deprimido <input type="checkbox"/> agitado	Posição <input type="checkbox"/> estação <input type="checkbox"/> decúbito _____	Assimetria facial <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Direita <input type="checkbox"/> Esquerda
Escore corporal <input type="checkbox"/> 1 a 5	FC _____ bpm FR _____ rpm TPC _____ s	Vacinas: / / Herpes 1 / / Herpes 4 / / Influenza / / Outros _____
Pele <input type="checkbox"/> urticária <input type="checkbox"/> outros _____	Temperatura retal _____ °C	Vermífugo: / / -

Alimentação

<input type="checkbox"/> ração _____ <input type="checkbox"/> aveia _____ <input type="checkbox"/> outros _____	<input type="checkbox"/> feno _____ <input type="checkbox"/> verde fresco _____	Ingestão <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> inapetência <input type="checkbox"/> anorexia
---	--	---

Ambiente

<input type="checkbox"/> Pasto <input type="checkbox"/> Cocheira <input type="checkbox"/> cama de serragem <input type="checkbox"/> outros _____	Odor de urina <input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> fortemente presente	Poeira <input type="checkbox"/> limpa <input type="checkbox"/> pouca <input type="checkbox"/> muita
---	---	---

Exame respiratório em repouso

Amplitude respiratória	Tipo	Modo	Ruído respiratório
<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Superficial <input type="checkbox"/> Profunda	<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Predominância costal <input type="checkbox"/> Predominância abdominal	<input type="checkbox"/> Eupneia <input type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Inspiratória <input type="checkbox"/> Expiratória	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Inspiratório <input type="checkbox"/> Expiratório <input type="checkbox"/> Misto
Mucosa nasal		Muflo	Secreção nasal
DIREITA <input type="checkbox"/> Normocorada <input type="checkbox"/> Hiperêmica	ESQUERDA <input type="checkbox"/> Normocorada <input type="checkbox"/> Hiperêmica	<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Ressecado <input type="checkbox"/> Fissuras	DIREITA <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Serosa <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Mucopurulenta <input type="checkbox"/> Presença de sangue <input type="checkbox"/> Odor fétido
ESQUERDA <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Serosa <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Mucopurulenta <input type="checkbox"/> Presença de sangue <input type="checkbox"/> Odor fétido			ESQUERDA <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Serosa <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Mucopurulenta <input type="checkbox"/> Presença de sangue <input type="checkbox"/> Odor fétido
Tosse			
Espontânea <input type="checkbox"/> Presente <input type="checkbox"/> Ausente			
Reflexo de tosse <input type="checkbox"/> Presente <input type="checkbox"/> Ausente			
Tipo de tosse <input type="checkbox"/> Seca <input type="checkbox"/> Produtiva <input type="checkbox"/> Superficial <input type="checkbox"/> Profunda			
Linfonodos			
Submandibulares (D) (E)		Retrofaringeos (D) (E)	
<input type="checkbox"/> (<input type="checkbox"/>) Inalterados		<input type="checkbox"/> (<input type="checkbox"/>) Inalterados	
<input type="checkbox"/> (<input type="checkbox"/>) Linfomegalia		<input type="checkbox"/> (<input type="checkbox"/>) Linfomegalia	
<input type="checkbox"/> (<input type="checkbox"/>) Abcedados		<input type="checkbox"/> (<input type="checkbox"/>) Abcedados	

Exame respiratório em exercício

Ruído respiratório	Secreção nasal	Recuperação após exercício
<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Inspiratório <input type="checkbox"/> Expiratório <input type="checkbox"/> Misto	DIREITA <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Serosa <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Mucopurulenta <input type="checkbox"/> Presença de sangue	ESQUERDA <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Serosa <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Mucopurulenta <input type="checkbox"/> Presença de sangue
		Tempo de repouso _____ min FC _____ bpm FR _____ rpm <input type="checkbox"/> Rápida <input type="checkbox"/> Demorada

Ausculta Traqueal

Normal
 Aumentada
 Crepitação
 Sibilos

Ausculta Pulmonar

Crepitação grossa

ausente
 presente
 direito esquerdo

Crepitação fina

ausente
 presente
 direito esquerdo

Percussão

direito esquerdo

normal normal
 timpânico timpânico
 maciço maciço

Sibilos

ausente
 presente
 direito esquerdo

Propagação cardíaca

normal
 direito esquerdo

Observações:

FICHA DE ESCORE CLÍNICO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS

VARIABLE	DESCRIPTOR	SCORE	Animal: Day:	Animal: Day:
Respiratory rate (breaths/min)	< 15	0		
	16-20	1		
	21-25	2		
	25-29	3		
	> 30	4		
Nasal discharge	none	0		
	serous	1		
	mucopurulent	3		
Abdominal lift	none	0		
	mild (perceptible heave line)	1		
	pronounced abdomen, thorax and anal movement)	3		
Nasal flaring	none	0		
	present	1		
Tracheal sounds	normal (tubular sound)	0		
	increase in intensity	1		
	mucus movement	3		
Bronchial tones	normal (tubular sound)	0		
	audible ventral and dorsal sounds	2		
Crackies	none	0		
	present	2		
Wheezes	none	0		
	present	2		
Cough	none	0		
	intermittent	1		
	paroxysmal	3		
Thoracic resonance	normal lung field	0		
	expanded dorsal and ventral lung fields	2		
TOTAL	25		