

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FERNANDA CRISTINA MENDES BARUSSI

**AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM EQUINOS COM
OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS**

*(The use of bone marrow derived mononuclear cells in horses with recurrent airway
obstruction)*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

FERNANDA CRISTINA MENDES BARUSSI

**AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM EQUINOS COM
OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS**

*(The use of bone marrow derived mononuclear cells in horses with recurrent airway
obstruction)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Professor Dr. Pedro Vicente Michelotto Junior

Coorientador: Dra. Alexandra Cristina Senegaglia

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	ix
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	x
RESUMO GERAL.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 O SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	6
2.2 ANAMNESE.....	6
2.3 EXAME FÍSICO	7
2.4 EXAME ENDOSCÓPICO	9
2.5 SISTEMA IMUNOLÓGICO DAS VIAS AÉREAS.....	9
2.6 OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS	10
2.6.1 Epidemiologia	10
2.6.2 Quadro clínico	11
2.6.3 Fisiopatologia	11
2.6.4 Mediadores.....	12
2.6.5 Diagnóstico	14
2.6.6 Tratamentos	15
2.7 TERAPIA CELULAR.....	16
2.7.1 Células Mononucleares	17
CAPÍTULO 3	
3 EM EQUINOS, O NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEARES É MAIOR NA PRIMEIRA ASPIRAÇÃO MEDULAR EM RELAÇÃO ÀS ASPIRAÇÕES SEGUINTEs	19
Resumo	19
Abstract.....	19

3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.2.1 Animais.....	21
3.2.2 Coleta de medula óssea e contagem de células mononucleares	21
3.2.3 Análise estatística.....	22
3.3 RESULTADOS	22
3.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	23
CAPÍTULO 4	
4 EVIDÊNCIAS DE MELHORA CLÍNICA EM CAVALOS COM OBSTRUÇÃO	
RECORRENTE DAS VIAS AÉREA TRATADOS COM CÉLULAS	
MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
4.1 INTRODUÇÃO.....	29
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.2.1 Delineamento do estudo.....	31
4.2.2 Obtenção e processamento da medula óssea.....	32
4.2.3 Avaliação clínica endoscópica e lavado broncoalveolar.....	34
4.2.4 Tratamentos.....	35
4.2.5 Análise estatística.....	35
4.3 RESULTADOS	36
4.4 DISCUSSÃO.....	42
4.4 CONCLUSÃO.....	45
CAPÍTULO 5	
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICES.....	58
ANEXOS.....	61

A dedicatória deste trabalho é para todos os animais que de alguma forma fizeram ou fazem parte da minha vida; Que 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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela oportunidade e por disponibilizar toda a infraestrutura necessária para a realização de um grande projeto.

Ao meu orientador e amigo Pedro Vicente Michelotto Júnior pela imensa complacência, firmeza e paciência em esclarecer e conduzir os caminhos.

À minha coorientadora Alexandra Cristina Senegaglia pelo carinho, paciência e confiança, tornando ao meu conhecimento diversos protocolos e corrigindo-os ao ponto necessário.

À CAPES pela bolsa auxílio e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Ao Regimento Coronel Dulcídio de Polícia Montada da Polícia Militar do Estado do Paraná, pela parceria com a estrutura física, pessoal, desde a mais alta à mais simples patente, bem como aos civis, médico veterinário Enio Granato e Vladimir Silva, e aos animais lá presentes

Ao Dr. Paulo Roberto Slud Broffman e ao Laboratório Experimental de Cultivo Celular pela estrutura física e pessoal, que me deu subsídio técnico para a realização do projeto, onde também fiz muitos amigos.

Aos residentes Felipe Tavarnaro e Amanda Paulino Crescêncio pela cumplicidade e disposição, sempre auxiliando nos exames e nas terapias dirigidas aos animais do projeto.

A todos os professores do programa de pós-graduação da PUCPR pelos esforços incessantes destinados ao crescimento dos docentes, discentes e do próprio programa.

Agradeço à minha família, meus pais Paulo e Rosane que me compreenderam acima de qualquer limite, e, ao o meu marido, a quem amo e respeito, Igor Barussi e meu filho Heitor, que mais do que compreensão, tiveram a grandeza de aceitar as minhas escolhas e necessidades e ainda assim me amar.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e os objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

O capítulo 3 é constituído de um “short communication”, produzido a partir dos pilotos do estudo, a ser submetido à publicação.

O capítulo 4 é constituído pelo principal artigo a ser submetido à publicação.

O capítulo 5 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

Doenças inflamatórias das vias aéreas são de alta importância na clínica equina, especialmente em animais atletas. A obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) é uma enfermidade crônica dos equinos estabulados por longos períodos, que se manifesta por dispneia, intolerância ao exercício e esforço abdominal expiratório, tosse e corrimento nasal. Este trabalho teve por objetivo avaliar a terapia celular autóloga, utilizando a porção de células mononucleares derivadas da medula óssea (CMNDMO) dos animais com ORVA e comparar com a dexametasona usada convencionalmente. A hipótese do presente estudo é de que o grupo tratado com terapia celular autóloga por células mononucleares apresenta melhora equivalente ao grupo tratado com dexametasona via oral, para equinos com ORVA. Foram estudados treze equinos mestiços, de ambos os gêneros, com idade média de 16,3 ± 2,2 anos e peso de 478,2Kg ±15,8, com histórico de dispneia, os quais tiveram a medula óssea coletada a partir do esterno e a fração mononuclear isolada por gradiente de densidade e posteriormente criopreservada a -192°C. A indução ao quadro clínico foi procedida sacudindo feno próximo às narinas por dois minutos ao dia e revirando as camas 4 minutos por dia até o quadro desejado. Este foi considerado adequado quando os equinos apresentaram expiração abdominal prolongada, tosse, ausência de febre e presença de muco nasal, tendo neutrofilia superior a 25% no lavado broncoalveolar (LBA) e escore clínico de no mínimo 10 segundo Tesarowski et al. (1996). A perda amostral foi de cinco animais que não entraram no quadro desejado, restando oito animais, que foram divididos em dois grupos, o controle positivo Gdex (n=4), que recebeu dexametasona por 21 dias conforme De Luca et al. (2008) e, o Gcel (n=4) que recebeu uma única instilação intratraqueal com 500x10⁶ a 1x10⁹ de CMNDMO. Tiveram a substituição do feno e da aveia por verde fresco e ração peletizada. Durante o tratamento, os cavalos de ambos os grupos foram reavaliados aos sete e 21 dias. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Tukey de múltipla comparação, e teste de Mann Whitney, e os valores são apresentados como média ± desvio padrão da média (SD). Houve diminuição do esforço respiratório nos dias 7 e 21 em relação ao dia 0 para Gdex (p=0,005 e p=0,01, respectivamente) e para Gcel (p=0,047 e p=0,004, respectivamente), e no escore de Tesarowski nos dias 7 e 21 em relação ao dia 0 para Gdex (p=0,003 e p=0,015, respectivamente) e para Gcel (p=0,006 e p=0,004, respectivamente). Houve declínio significativo do número de neutrófilos nos dias 7 e 21 em relação ao dia 0 para Gdex (p=0,0007 e p=0,0001, respectivamente) e para Gcel (p=0,06 e p=0,05, respectivamente). Concomitantemente houve um aumento de macrófagos nos dias 7 e 21 em relação ao dia 0 para Gdex (p=0,001 e p=0,011, respectivamente) e para Gcel (p=0,039 e p=0,056, respectivamente). No presente estudo, conclui-se que a instilação intratraqueal com CMNDMO melhora o quadro inflamatório em cavalos com ORVA mantidos estabulados, por um período de pelo menos 21 dias, igualmente à dexametasona.

Palavras-chave: terapia celular, vias aéreas, cavalos, neutrófilo, macrófago alveolar, célula-tronco.

ABSTRACT

Inflammatory airways diseases are of high importance in equine practice, especially in athletes horses. The recurrent airway obstruction (RAO) is a chronic disease of horses stabled but may be associated with pastures. Is manifested by difficulty breathing, exercise intolerance, abdominal expiratory effort, coughing and nasal discharge, with mainly impact in athletes horses. This study aimed to evaluate the autologous cell therapy using the portion of mononuclear bone marrow derived cells (BMDMC) of animals with RAO and compared with dexamethasone used conventionally. The hypothesis of this study is that cell therapy can interfere beneficially in lung inflammation horses with RAO. Were used thirteen crossbred horses, of both genders, with a mean age 16.3 ± 2.2 years and mean weight 15.8 ± 478.2 Kg, with a history of respiratory distress. Six of them had bone marrow collected from the sternum and mononuclear fraction isolated by density gradient and frozen at -192°C . The clinically was induced with hay near the nostrils shaken for two minutes a day and their beds were overturned four minutes a day. The sample loss was five animals that did not make the desired frame, leaving eight animals were divided into two groups, the Gdex positive control ($n = 4$), where the animals received dexamethasone for 21 days as De Luca et al. (2008), the Gcel ($n = 4$) where horses received one intratracheal instillation with autologous mononuclear cells derived from bone marrow. After induction, were considered in clinical score of RAO horses that had prolonged abdominal breath, coughing and having nasal mucus, without fever, neutrophilia with more than 25% in the BAL and clinical score of at least 10 seconds Tesarowski et al. (1996). All animals had replace the hay and oats with fresh green and pelleted feed. During the treatment the horses in both groups were assessed at 7 and 21 days. Statistical analysis was performed using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test and values are presented as mean \pm SD. Happened to decreased of breathing effort on 7 and 21 in relation to day 0 for Gdex ($p = 0.005$ and $p = 0.01$ respectively) and Gcel ($p = 0.047$ and $p = 0.004$ respectively) and Tesarowski score on days 7 and 21 compared to day 0 to Gdex ($p = 0.003$ and $p = 0.015$ respectively) and Gcel ($p = 0.006$ and $p = 0.004$ respectively). There was a significant decline in the number of neutrophils in 7 and 21 compared to day 0 to Gdex ($p = 0.0007$ and $p = 0.0001$ respectively) and Gcel ($p = 0.06$ and $p = 0.05$ respectively). At the same time an increase of macrophages on days 7 and 21 compared to day 0 to Gdex ($p = 0.001$ and $p = 0.011$ respectively) and Gcel ($p = 0.039$ and $p = 0.056$ respectively). These results suggest that the treatments are equivalents and the cell therapy was similar to dexamethasone treatment for a period of at least 21 days.

Keywords: cell therapy, airways, horse, neutrophil, alveolar macrophage, stem cell.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARI	Trato respiratório inferior
ARS	Trato respiratório superior
CMNDMO	Células mononucleares derivadas da medula óssea
DMSO	Dimetilsulfóxido
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INF- α	Interferon alfa
INF- γ	Interferon gama
LB	Linfócito B
LBA	Lavado broncoalveolar
LT	Linfócito T
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófago 1beta
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago 2
ORVA	Obstrução recorrente das vias aéreas
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
Th1	Linfócito auxiliador tipo 1
Th2	Linfócito auxiliador tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Contagem de células mononucleares aspiradas em diferentes tempos	23
Tabela2. Isolamento e congelamento de células mononucleares.....	36
Tabela3. Volume recuperado no LBA e perfil citológico.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura1. Linha temporal do estudo.....	32
Figura2. Resultados do esforço respiratório.....	37
Figura3. Avaliação endoscópica e graduação de muco.....	38
Figura4. Avaliação do volume de LBA recuperado e células totais.....	40
Figura5. Avaliação do perfil citológico do LBA.....	41

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória que afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo todo. Segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o manejo da Asma, publicadas no Jornal Brasileiro de Pneumologia (abril de 2012), estima-se que, no Brasil, existem aproximadamente 20 milhões de asmáticos considerando-se uma prevalência global de 10%. O nível de controle da asma, a gravidade da doença e os recursos médicos utilizados por asmáticos brasileiros são pouco documentados. Entretanto, os gastos com a asma aumentam proporcionalmente com a gravidade da doença.

A asma é uma doença crônica caracterizada por crises recorrentes de dispneia em várias intensidades. A sua definição inclui quatro componentes cardiais, sendo a obstrução do fluxo de ar (broncoconstrição), sintomas, inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas (Mullane, 2011).

Cerca de 10% da população asmática é portadora da asma grave, que é caracterizada pelo fato do paciente apresentar sintomas contínuos com prejuízos às atividades usuais, sono interrompido por episódios de asma mais de duas vezes por semana, uso diário de broncodilatador de resgate e casos com relato prévio de um ou mais episódios de asma grave. (Alves et al., 2009).

Quando portadores de asma grave têm o quadro não controlado com os esquemas terapêuticos atualmente disponíveis, isso se deve a fatores como a pobre resposta ao tratamento, incorreta avaliação diagnóstica, falta de exclusão de doenças concomitantes, fatores agravantes, incorreta utilização das medicações e a refratariedade ao tratamento (Alves et al., 2009).

Por esses motivos, buscam-se novas alternativas de tratamento, ressaltando a importância da efetividade de novas drogas ou formas terapêuticas. Hoje os modelos para o estudo da asma e de seus mecanismos fisiopatológicos com respectivos tratamentos, incluem os ratos, diferentes linhagens de camundongos, cavalos e gatos. O cavalo como modelo para o estudo da asma apresenta vantagens em relação aos murinos, pois desenvolve um quadro natural de asma, a obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA), possibilitando o estudo da doença no cavalo e também da asma, em diferentes momentos e condições (Leclere et al., 2011).

Portanto, o estudo da ORVA contribui com a pneumologia, possibilitando o desenvolvimento de novas opções para o tratamento da asma e de doenças crônicas do sistema respiratório humano (Marinkovic et al., 2007).

Clinicamente, a ORVA é caracterizada pela presença de tosse, dispneia, intolerância ao exercício, presença ou não de corrimento nasal, broncoconstrição e ausência de febre. Na auscultação, são percebidos sons respiratórios como crepitação e sibilos em vários pontos do tórax, devido à presença de muco e ao esforço respiratório, concomitante ao movimento abdominal acentuado, principalmente na expiração, formando a linha de *heaves* pela hipertrofia do músculo abdominal oblíquo (Robinson, 2001; Couëtil et al., 2007; Kutasi et al., 2011).

É uma doença comum de cavalos estabulados por longos períodos, onde a inflamação pulmonar crônica é desencadeada pela inalação de poeira orgânica, que possui endotoxinas, β -D-glucanos de fungos, partículas ultrafinas (<100nm de diâmetro), microrganismos, material vegetal, esporos, poeira e gases tóxicos, presentes na alimentação ou no ambiente (Robinson, 2001; Couëtil et al., 2007).

O macrófago alveolar, célula de defesa em maior quantidade no espaço alveolar de cavalos saudáveis, atua na eliminação de partículas invasoras e influencia o quadro inflamatório da doença tanto por uma diminuição na capacidade de resposta ou pelo exagero desta, tais mecanismos ainda não estão esclarecidos. Contudo, a contínua fagocitose de partículas por estas células, ativa a secreção de interleucina 8 (IL-8), a qual promove a quimiotaxia de neutrófilos para o pulmão (Aharonson-Raz et al., 2012). Devido à importância dos macrófagos alveolares, especialmente no processo fagocitário, o controle da sua atividade pode ter grande influência na taxa de depuração da carga de partículas inaladas (Muehlmann et al., 2012).

Com a participação de mediadores inflamatórios tais como IL-8, proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) (Joubert et al., 2011; Leclere et al., 2011), em poucas horas ocorre um aumento importante na quantidade de neutrófilos no fluido broncoalveolar (Fairbairn et al., 1993; Léguillette, 2003). Uma vez nos pulmões, os neutrófilos contribuem para a hipersecreção de muco, broncoconstrição, e remodelamento pulmonar, pela liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como o TNF- α , elastase e, espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio. O remodelamento resulta em aumento na produção de muco, hipertrofia da musculatura lisa, fibrose peribronquial, com

consequente agravamento dos sinais clínicos de dispneia, resultando em menores possibilidades de tratamento efetivo (Robinson, 2001).

O estresse oxidativo evidenciado no pulmão dos cavalos com ORVA está diretamente relacionado à inflamação pulmonar e à neutrofilia (Kirschvink et al., 2008), que leva ao aumento da produção de ânion superóxido por neutrófilos após a exposição à poeira orgânica ambiental (Marr et al., 1997). Níveis aumentados de oxidantes aumentam a resposta inflamatória, diretamente ou via formação de produtos da peroxidação lipídica, levando a um aumento na gravidade da doença (Kirkham e Rahman, 2006).

Quando a asma passou a ser compreendida como doença inflamatória e passou a ser tratada como tal, basicamente com corticosteroides, os pacientes obtiveram a melhora do quadro clínico e da qualidade de vida. O que acarretou em uma diminuição do número de casos graves e internações. No entanto, apenas um valor entre 9% e 26% dos asmáticos possuem um tratamento com anti-inflamatórios. A manutenção destes pacientes em correto tratamento reflete em uma queda no atendimento público de saúde a casos de asma em até 80%, porém existem casos de asma não controlada, também chamada de asma grave, mesmo com diagnóstico correto e tratamento assíduo há uma alta morbidade. Estes casos são responsáveis pelo maior contingente de custos com a doença (Pinto, 2010).

Esteroides, sabidamente utilizados em tratamentos de pacientes com asma, têm apenas efeitos moderados no controle da hiperresponsividade das vias aéreas. Algumas terapias à base de interleucinas resultaram em pouco ou nenhum alívio aos sintomas da asma, bem como pouco ou nenhum alívio à hiperresponsividade das vias aéreas (Canning et al., 2012). Além disto, os tratamentos convencionais com β_2 agonistas e corticosteroides podem promover diferentes graus de alívio, mas nenhum previne crises futuras e assim, muitas pessoas seguem sofrendo dos efeitos da inflamação crônica e progressiva na asma, tornando urgente a busca por novos tratamentos (Mullane, 2011).

Em cavalos, a administração de corticóides também é preconizada, porém, muitos clínicos veterinários ainda o prescrevem de forma sistêmica, pois apresenta resposta mais rápida e satisfatória em casos agudos. Essa administração sistêmica, porém, pode provocar diversos efeitos deletérios, incluindo disfunção e supressão adrenocortical, laminite, hepatopatia, perda de massa muscular, alteração no metabolismo ósseo e aumento da suscetibilidade à infecção. Além disso, ocorre a

indução periférica de neutrofilia e linfopenia, bem como a diminuição da resposta de anticorpos à vacinação (Dauvillier et al., 2011).

A intervenção à asma envolve, além do controle clínico das manifestações, a prevenção de manifestações futuras, visando combater a resposta inflamatória exacerbada e o rápido declínio da função pulmonar (GINA 2012). Tanto para a asma como para a ORVA, o controle ambiental é parte dos tratamentos instituídos, juntamente com broncodilatadores e corticosteroides.

Tendo esse apanhado de informações, se colocando em um cenário atual das doenças citadas, asma e ORVA, a constante preocupação com o resultado das terapêuticas fez surgir na terapia celular uma esperança de controle do quadro inflamatório e remissão dos sinais clínico, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

O uso da terapia celular para doenças respiratórias está sendo realizado, resultando em efeitos benéficos, porém, ainda não foram desenvolvidas pesquisas em cavalos com ORVA. Cita-se a capacidade de células do estroma da medula óssea em abranger o ambiente imunológico e responder adequadamente (Nemeth et al., 2010). A associação destas células com macrófagos, revelou que em pacientes asmáticos, a presença de macrófagos em cultura de células mononucleares, estimulada com alérgenos reativos, resultou em uma proliferação das células mononucleares oito vezes maior do que em culturas sem macrófagos, favorecendo a atividade de ambos os tipos celulares (Spiteri et al., 1994).

A partir de resultados obtidos em ratos, sabe-se que precursores celulares circulantes estão diminuídos em doenças obstrutivas crônicas em humanos, a administração de células mononucleares derivadas de medula óssea contribui para a diminuição dos danos epiteliais, remodelamento de tecidos e processo inflamatório, por aumento da disponibilidade de células precursoras (Abreu et al., 2011; Cruz et al., 2012).

O presente estudo buscou um aspecto de inovação para o tratamento da asma e também da ORVA, através da terapia celular pelo uso de células mononucleares derivadas da medula óssea, levantando-se a hipótese de que é possível que o transplante autólogo de células tronco reduza o processo inflamatório no ambiente pulmonar acometido por estas enfermidades.

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea, sobre o processo inflamatório em equinos com obstrução recorrente das vias aéreas.

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento autólogo com células mononucleares derivadas da medula óssea sobre parâmetros fisiológicos dos animais, tais como: esforço respiratório, frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura corporal, coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar (TPC), presença ou não de corrimento nasal.
- Avaliar a influência do tratamento autólogo com células mononucleares derivadas da medula óssea sobre a graduação do muco traqueal segundo Gerber et al. (2004) através do endoscópico das vias aéreas.
- Avaliar a influência do tratamento autólogo com células mononucleares derivadas da medula óssea sobre o perfil de células do lavado broncoalveolar (LBA).
- Comparar os parâmetros investigados sobre a influência do tratamento autólogo com células mononucleares derivadas da medula óssea, com tratamento já estabelecido que utiliza como fármaco a dexametasona administrada via oral.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O SISTEMA RESPIRATÓRIO

O sistema respiratório é basicamente composto pela cavidade nasal, a nasofaringe, a laringe, a traqueia e a árvore brônquica, representando a primeira barreira de defesa contra infecções respiratórias (Vairo et al., 2013). É dividido em aparato respiratório superior (ARS) e aparato respiratório inferior (ARI), sendo que o TRS compreende as estruturas de entrada e circulação do ar até a borda caudal da cartilagem cricóidea e o TRI parte daí abrangendo o sistema de trocas gasosas (Gonçalves *in* Feitosa, 2014).

O aparato respiratório superior é responsável pela condução do ar até o aparato respiratório inferior, e um dos responsáveis pelo arrefecimento do sangue, e portanto, uma doença respiratória do trato superior em conjunção com outros fatores, como exercício em demasia, dieta, medicação e alta umidade, pode levar à hipertermia do cavalo (Hodgson et al., 1994).

O aparato respiratório inferior é responsável pela troca gasosa, basicamente composto por epitélio cilíndrico pseudo-estratificado ciliado e uma porção variável de células caliciformes e serosas. O desaparecimento dos cílios, no sistema transicional é gradativo, e as células caliciformes dão lugar a outras células chamadas células Clara, até que se forme então o sistema de trocas gasosas, com os alvéolos (Carlton e McGavin, 1998; Grainge e Davies 2013).

2.2 ANAMNESE

O exame físico sempre deve ser iniciado pela obtenção do histórico do paciente. A idade do animal, o ambiente no qual ele é mantido, alimentação e demais fatores de manejo podem ajudar de forma significativa à condução diagnóstica (Michelotto, 2010).

É fundamental conhecer a duração do processo patológico, bem como saber quando se deu seu início, se foi em forma de surto, ou casos esporádicos ao longo do tempo. O tempo e o tipo de evolução estabelecem a abordagem do problema. Tratamentos anteriores também devem ser esclarecidos (Gonçalves *in* Feitosa, 2014).

2.3 EXAME FÍSICO

Embora tenham surgido muitas novas informações que auxiliem na compreensão de doenças pulmonares em equinos, bem como um grande progresso em procedimentos auxiliares de diagnóstico, tais técnicas não substituem um exame físico completo. No entanto, são capazes de detectar alterações do sistema respiratório (Michelotto et al., 2013).

Alguns sinais gerais podem ser percebidos apenas pela inspeção como: tosse, fadiga durante exercício, ruídos como roncos e sibilos podem ser ouvidos durante a respiração, modificações no ritmo (em equinos adultos o considerado normal é entre 8 e 16 movimentos respiratórios por minuto) e profundidade da respiração (movimento costoabdominal) (Gonçalves *in* Feitosa, 2014)

Após a inspeção geral, o exame clínico respiratório é procedido, normalmente encetado pela cabeça, atentando ao TRS. Ao observar o muflo do animal, pode ser detectada a presença de secreção fluida e incolor, o que é considerado normal, e quando fora da normalidade pode apresentar ressecamento. Nas fossas nasais, deve-se observar modificações na coloração e umidade da mucosa que normalmente é de cor rósea, úmida e não tem lesões visíveis (Gonçalves *in* Feitosa, 2014).

Na inspeção das narinas é importante observar se há corrimento nasal, uni ou bilateral, sua coloração, viscosidade e odor. O fluxo de ar e a temperatura com que este sai de cada narina também é importante, e quando alterado pode indicar alguma obstrução (Gonçalves *in* Feitosa, 2014). A dilatação das narinas nos equinos, se faz necessária quando há maior exigência de ar, podendo ser demonstrada fisiologicamente em exercício ou patologicamente em repouso (Reece 1996).

Deve-se examinar também os linfonodos da cabeça e pescoço, já que os linfonodos drenam regiões específicas do corpo e aumentam a capacidade de

detecção e de apresentação de antígeno, podendo sofrer hipertrofia em locais com processos inflamatórios (Carlton e McGavin 1998).

Ainda na região do pescoço é examinada a traqueia, em grande porção composta por camada muscular lisa e cartilagem (Reece, 1996). Esta deve ser palpada no sentido craniocaudal, verificando se há sensibilidade do animal à palpação, ou ainda a presença de malformações, cicatrizes, obstruções e corpos estranhos (Fortes Júnior, 2005).

Durante o exame traqueal, deve ser realizado o reflexo de tosse com a compressão dos primeiros anéis traqueais logo abaixo da glote até que o animal comece a reagir mostrando incômodo e sacodindo a cabeça, soltando-se em seguida. Logo após à compressão, o animal irá inspirar uma grande quantidade de ar rapidamente, tendendo a tossir se houver inflamação das vias aéreas. A tosse é um dos mecanismos de limpeza do sistema respiratório e ocorre quando há irritação das terminações nervosas da laringe e traqueia provocada pela inflamação da mucosa (Gonçalves in Feitosa, 2014).

Além da inspeção e palpação, deve ser feita a auscultação. Os sons traqueais são transmitidos pela sua parede, onde, em condições de higidez, a passagem do ar soa claramente e o som inspiratório se aproxima do expiratório (Fortes Júnior, 2005).

Passando à região torácica, é indicada a observação da movimentação da respiração, observando especificamente a transição costoabdominal para identificar se há prevalência de movimentos costais ou abdominais na mesma, bem como identificar esforço ou dificuldade respiratória (Gonçalves in Feitosa, 2014).

Os movimentos respiratórios de um cavalo saudável são muito sutis, quase imperceptíveis (Fortes Júnior, 2005). Sob condições híginas a inspiração requer mais esforço do que expiração. Esta última pode se tornar um processo inteiramente ativo em exercícios intensos ou em casos de doenças obstrutivas (Reece, 1996). Qualquer anormalidade no sistema respiratório resulta em um aumento da frequência e/ou da intensidade respiratória e aumenta o nível de ventilação (Erck-Westergren et al., 2013).

Após a observação, é procedida a auscultação torácica. Os sons normais do fluxo de ar podem ser suaves e pouco audíveis, portanto, pode-se lançar mão de alguns artifícios. Para exacerbar esses sons pode-se provocar o aumento da intensidade respiratória, obstruindo uma das narinas ou ainda colocar um saco

plástico médio envolvendo ambas as narinas, forçando o animal a aprofundar sua respiração, intensificando os sons (Fortes Júnior, 2005).

Em condições patológicas podem ser percebidos alguns ruídos, entre eles estão o sibilo e a crepitação, que pode estar associada com enfizema e secundário à broncoconstrição (Léguillette, 2003). Em seres humanos foi relatado que pessoas jovens e saudáveis possuíam crepitação pulmonar quando realizavam inspiração profunda. Este dado nos leva a crer que estes sons não são exclusivos de indivíduos com acometimento patológico e sim, também, dos volumes pulmonares envolvidos durante a ausculta (Carvalho e Souza, 2007).

2.4 EXAME ENDOSCÓPICO

A endoscopia é uma ferramenta importante tanto para trabalho de investigação da doença das vias aéreas inferiores equinos, como para o acompanhamento da remissão da mesma. Este sistema diagnóstico pode ser utilizado para a observação do ARI e avaliação de acúmulo de secreções nas vias aéreas, bem como para o recolhimento de amostras de fluidos locais (Gerber et al., 2004).

A endoscopia das vias aéreas fornece informações sobre a gravidade das doenças que as acometem. Pontuações endoscópicas são descritas para atribuir um escore de acúmulo e coloração de muco na traqueia e espessura do septo traqueal (Koblinger et al., 2011).

Normalmente é procedido com o animal sob sedação e é realizado com um fibroscópio flexível para vídeo-endoscopia que é passado pela narina, faringe, traqueia, e direcionado para o pulmão. O endoscópio deve entrar facilmente, sem encontrar resistência e o animal deve estar com a cabeça esticada para facilitar a passagem do equipamento. A tosse durante o procedimento é normal, mas pode ser diminuída com a sedação correta (Hoffman 2008).

2.5 O SISTEMA IMUNOLÓGICO DAS VIAS AÉREAS

Composto por barreiras físicas, químicas e mecanismos celulares, limita a entrada de partículas e microrganismos indesejáveis no sistema respiratório. As

barreiras físicas, como a pele, e defesas químicas associadas, como a saliva, previnem que a maioria dos micro-organismos invadam o corpo. Há ainda a defesa realizada por células e proteínas especializadas, agindo imediatamente após a implantação de uma infecção e não dependendo da exposição anterior do hospedeiro, compondo o sistema imunológico inato, enquanto as respostas imunes adaptativas são altamente específicas para o patógeno que as induz (Alberts et al., 2010).

A configuração anatômica do sistema condutor do ar tem importante papel na redução da penetração de materiais nocivos para os pulmões. O arranjo espiralado das conchas nasais cria uma turbulência, retendo partículas maiores (Carlton e McGavin 1998). Porém, as partículas que chegam ao TRI são capazes de induzir resposta imune inata, alterando o perfil celular considerado normal, bem como a resposta adaptativa, através do recrutamento de linfócitos com consequente secreção de citocinas e produção de anticorpos (Lavoie-Lamoureux et al., 2012).

2.6 OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS

2.6.1 Epidemiologia

É uma doença mais encontrada em animais de meia idade, mantidos estabulados por longos períodos (Robinson, 2001), que sofrem contínua exposição à poeira e por vezes ao mofo (Venugopal et al.; 2012). A inalação de poeira que possua endotoxinas, esporos de fungos, partículas ultrafinas (<100nm de diâmetro), microorganismos, material vegetal, e gases tóxicos presentes na alimentação e no ambiente das cocheiras pode desencadear a ORVA (Robinson, 2001; Couëtil et al., 2007). Entre os fatores presentes na alimentação que favorecem a doença, estão esporos de *Faeniarectivirgulae* *Aspergillus fumigatus*, além de endotoxinas. (McGorum et al., 1993; Pirie et al., 2014).

Além de animais estabulados, pode estar associada às pastagens de verão (Bowles et al., 2002) especialmente nos climas subtropicais, quando o capim está alto (Venugopal et al.; 2012). Inúmeros fatores ambientais, imunológicos, infecciosos e genéticos desempenham um papel importante na patogênese da doença, muito embora não totalmente elucidados. (Niedzwiedz et al. 2014).

O impacto da obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) sobre o desempenho de animais atletas é reconhecido há muito um tempo, devido ao baixo rendimento esportivo dos animais acometidos pela ORVA (Erck-Westergren et al 2013). Durante a fase de exacerbação da doença há alterações funcionais significativas, como um aumento das pressões transpulmonares máximas, resistência das vias aéreas, diminuição da complacência pulmonar dinâmica, hipoxemia arterial, portanto, intolerância ao exercício e queda no rendimento (Leclere et al., 2011)

2.6.2 Quadro clínico

A Obstrução Recorrente das Vias Aéreas é clinicamente caracterizada pela presença de tosse, dispneia, intolerância ao exercício, broncoconstrição, hipersecreção de muco, corrimento nasal e ausência de febre (Kutasi et al., 2011). Na auscultação, percebem-se sons respiratórios proeminentes devido à obstrução e ao esforço respiratório, concomitante a crepitação e sibilos em vários pontos (Aharonson-Raz, 2012; Pirie, 2014).

Com o agravamento do quadro, além dos sinais anteriormente citados, o animal pode apresentar dilatação das narinas, frequência respiratória aumentada, formação da linha de *heaves* pela hipertrofia do músculo abdominal oblíquo em decorrência da expiração forçada (Robinson, 2001).

A exacerbação é caracterizada pela acentuação da inflamação nas vias aéreas, está ainda associada com o recrutamento significativo de neutrófilos. Em paralelo, os pacientes manifestam piora dos sinais clínicos e restrição do fluxo de ar, e suas consequências podem ser difíceis de tratar, chegando a ser fatal (Joubert et al., 2011).

2.6.3 Fisiopatologia

Sua fisiopatologia envolve a hiperresponsividade, que se manifesta como a broncoconstrição em resposta a estímulos não específicos (inalação de ar frio, gases nocivos, as partículas de poeira e outros irritantes) (Robinson, 2001; Couëttil et al., 2007; Kutasi et al., 2011). Em cavalos mais velhos, pode haver o remodelamento das vias aéreas acentuando ainda mais a disfunção e hipertrofia da musculatura peribrônquica (Erck-Westergren et al. 2013). Assim, os animais acometidos podem

apresentar alterações dos sons pulmonares tais como crepitação e sibilo, corrimento nasal bilateral e aumento na frequência respiratória e no esforço expiratório (Léguillette et al., 2003; Aharonson-Raz, 2012).

Há um crescimento significativo da massa muscular lisa de animais com ORVA em comparação a animais saudáveis, evidenciando uma hiperplasia e o aumento de apoptoses neste mesmo tecido, sugerindo a tentativa de compensar o aumento da proliferação dos miócitos. Pode ocorrer desde os estágios iniciais da doença, e envolve alterações como hiperplasia de células caliciformes e glândulas de muco, fibrose subepitelial, neovascularização, aumento da massa de musculatura lisa e espessamento total da parede das vias aéreas (Herszberg et al., 2006)

Ao contrário do perfil tradicional da ORVA, os resultados revelaram que o infiltrado neutrofílico não está presente o tempo todo nos pulmões, e essa ausência de neutrófilos pode indicar um remodelamento pulmonar irreversível, havendo continuidade da inflamação crônica das vias aéreas, bem como as alterações de remodelamento, como a fibrose subepitelial e metaplasia de células caliciformes (Bunting et al, 2013)

Frente à persistência de um quadro inflamatório as principais lesões histológicas nas grandes vias aéreas são a perda de células epiteliais ciliadas e nas vias aéreas menores, hiperplasia e metaplasia de células secretoras de muco. O aumento da descamação celular e o acúmulo de muco, o espessamento da musculatura lisa, o edema das paredes das vias aéreas, resultam na obstrução das mesmas (Marinković et al., 2007; Leclere et al.; 2011).

2.6.4 Mediadores

A célula mais abundante no pulmão saudável é o macrófago alveolar, cerca de 60% do total de células (Michelotto et al. 2010), que tem o primeiro contato com o antígeno e desencadeiam a resposta inflamatória, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias que entre outras atividades atrai os neutrófilos (Laan et al., 2006; Joubert et al., 2011).

Os linfócitos também são comuns no ambiente pulmonar, mas em menor quantidade, em fluidos broncoalveolares pode variar muito nos cavalos, sendo considerado normal até 35% (Robinson 2001). Eles atuam como coordenadores da resposta imune e podem controlar outras células através da secreção de diferentes

citocinas, sendo no pulmão em sua maioria linfócitos T (90%) que são responsáveis pelas respostas Th1 e Th2 e secretam entre outras as IL-4 IL-10, enquanto os linfócitos B que secretam IgE representam apenas 10% (Léguillete et al., 2003; Jackson et al., 2004; Marinkovic et al., 2007).

Concentrações mais elevadas ou maior frequência de detecção de anticorpos (IgG e IgE) específicos para o *A. fumigatus* ou *Alternaria* extratos brutos, foram encontrados em amostras de soro de equinos com ORVA em comparação com cavalos de controle negativos, mas não em todos estudos. Além disso os cavalos podem desenvolver diferentes quantidades de anticorpos séricos IgG e IgE em relação a antígenos comuns, dependendo muito do ambiente, genética, sexo e idade, não sendo um critério bem definido para a ORVA (Leclere et al., 2011).

No quadro da asma humana é possível observar um infiltrado eosinofílico, no entanto, nos cavalos a célula de destaque é o neutrófilo (Debrue et al., 2005). Embora a celularidade apresentada no LBA seja diferente em humanos e equinos, a resposta inflamatória dos equinos também apresenta um perfil de citocinas compatível com a resposta Th2, aumento de IL-4 e decréscimo de IFN- γ sugerindo um perfil típico de resposta alérgica do sistema respiratório e comparada a asma humana (Lavoie et al., 2001). Enquanto a IL-4 é bem conhecida no papel da diferenciação de LT e LB, assim como ela, outras duas citocinas parecem ter fortes efeitos na desativação dos macrófagos, o TGF- β e IL-10, desempenhando um importante papel no equilíbrio das respostas Th1 e Th2 (Jackson et al., 2004)

Diretamente ligada ao recrutamento de neutrófilos está a IL-17, que acredita-se ser um dos primeiros fatores controladores de citocinas nas doenças pulmonares. Induz a liberação de outros mediadores químicos pelas células do epitélio bronquial, macrófagos e fibroblastos dominando a atividade de estresse oxidativo e agravamento do quadro (Lavoie et al., 2001; Molet et al., 2001; Debrue et al. 2005). Assim como a IL-17 o TNF- α também é responsável pelo recrutamento de neutrófilos, bem como por sua ativação (Hoshino et al., 2000).

Acredita-se que embora a IL-17 seja um dos primeiros fatores controladores de citocinas nas doenças pulmonares e esteja diretamente envolvida no recrutamento de neutrófilos, sua ativação e sua modulação depende da ação da IL-1 β , citocina pró-inflamatória que encontra-se aumentada nas fases agudas da asma, (Hoshino et al., 2000; Schuijs et al., 2013).

Outros mediadores como a IL-8, IL-13 e INF- γ também foram estudados em animais com o perfil de ORVA, e embora em valores variáveis, todos tiveram um aumento. Os mediadores químicos têm um papel importante na detecção da ORVA e podem servir para o entendimento da doença, (Jackson et al., 2004, Lann et al., 2006) quanto mais precoce o diagnóstico, melhor será a recuperação desta função a longo prazo (Miskovic et al, 2007).

2.6.5 Diagnóstico

A ORVA tem maior propensão a ser diagnosticada durante os meses quentes e a maioria dos cavalos começam a mostrar sinais clínicos durante este período. A história específica e um exame clínico completo podem ser confiáveis para o diagnóstico de cavalos com ORVA (Kutasi et al., 2011)

Leclere e colaboradores (2011), avaliando o esforço abdominal respiratório e o grau de dilatação nasal concluiu que estes parâmetros, assim como a tosse estão fortemente associados com a inflamação das vias aéreas, o que corrobora com a tabela de escore clínico da ORVA criado por Tesarowski e autores (1996) que avalia muitos desses sinais clínicos e é significativamente correlacionada com o percentual de neutrófilos superior a 20% no LBA em animais com média de 20 anos de idade (Leclere et al., 2011)

A endoscopia, é um método diagnóstico fundamental (Kutasi et al., 2011), pois possibilita a avaliação dos aspectos traqueal e do muco, sendo este um indicativo de inflamação das vias aéreas inferiores muito comum na ORVA (Jackson et al., 2000), e pode ser mensurado com graduações já consagradas, como a escala de Gerber e colaboradores (2004) onde é atribuída uma pontuação para cada item da escala, composta por acúmulo de muco, localização, viscosidade e coloração.

O LBA, normalmente procedido após a avaliação endoscópica, possibilita a contagem diferencial de células, e é considerado uma técnica consistente, podendo ser reproduzido quando o cavalo está adequadamente sedado, a amostra é adequadamente colhida e um grande volume de líquido é utilizado na instilação (Hoffman 2008). A avaliação da amostra citológica presente no LBA é de grande importância para uma investigação diagnóstica bem sucedida. O aumento do número de neutrófilos é o principal critério diagnóstico para animais acometidos por ORVA (Kutasi et al., 2011).

Em casos de animais jovens, que estão manifestando a enfermidade pela primeira vez, ou em casos de diagnóstico inconclusivo, pode-se recorrer à confirmação do processo inflamatória por um perfil de citocinas no LBA (Miskovic et al., 2007)

2.6.6 Tratamentos

O restabelecimento do animal e o controle do quadro inflamatório são feitos com a redução à exposição a antígenos ambientais, terapia anti-inflamatória e uso de broncodilatadores. As drogas sistêmicas mais comumente utilizadas são a dexametasona e a prednisolona, sendo administradas duas vezes ao dia por via oral nas doses de 0,05mg/kg e 2mg/kg respectivamente (Leclere et al. 2010).

Tratamentos com corticóides inalatórios são comumente prescritos para animais com ORVA, e incluem a fluticasona e beclometasona, com doses especificamente calculadas para garantirem sua efetividade e minimizarem os efeitos colaterais sistêmicos. As medicações sistêmicas incluem a dexametasona e a prednisolona. O tratamento sistêmico age mais rápido no combate à ORVA, porém os efeitos adversos associados a ele são bem maiores do que o tratamento inalatório. Os broncodilatadores normalmente são associados devida à persistência do quadro inflamatório, isso se prolonga por no mínimo duas semanas. (Couëttil et al. 2007)

Entre os efeitos adversos dos corticóides sistêmicos estão: supressão e disfunção da adrenocortical, laminite, hepatopatia, fadiga muscular, alteração do metabolismo ósseo e aumento da suscetibilidade à infecção. Corticóides sistêmicos têm levado a uma transição periférica de neutrofilia e linfopenia, acarretando em uma subpopulação de linfócitos e células marcadoras, diminuindo a resposta dos anticorpos frente à vacinação. (Dauviller et al. 2011)

Esteroides, sabidamente utilizados em tratamentos de pacientes com asma, têm apenas efeitos modestos no controle da hiperresponsividade das vias aéreas. Algumas terapias à base de interleucinas, também deram pouco ou nenhum alívio aos sintomas da asma, bem como pouco ou nenhum alívio à hiperresponsividade das vias aéreas (Canning et al. 2012).

Além disto, os tratamentos convencionais com β_2 agonistas e corticosteroides podem promover diferentes graus de alívio e embora previnam os sintomas, muitas

peessoas seguem sofrendo dos efeitos da inflamação crônica e progressiva na asma, tornando urgente a busca por novos tratamentos (Mullane, 2011).

O Albuterol é o medicamento aerossol mais comumente prescrito, demonstrando grande efetividade e mínimos efeitos colaterais, com especial eficácia no início do quadro de RAO. Alguns animais já atingem a broncodilatação máxima com apenas duas instilações (180µg), outros no entanto, exigem até 10 (900µg). Mas assim como na asma humana, os broncodilatadores são utilizados associados com corticoides, após a confirmação diagnóstica de ORVA, (BERTIN et al. 2011).

Alguns mediadores químicos como TNF- α e IFN- γ diminuem a efetividade de esteroides em células do músculo liso das vias respiratórias e em células epiteliais das vias aéreas de pessoas asmáticas. É possível que o papel Th17 também leve à grave resistência ao tratamento com esteroides. (Vazquez-Tello et al., 2013)

A alteração ambiental é fundamental para o controle da ORVA, pois tem como papel a diminuição aos alérgenos, a redução da poeira e o aumento na ventilação (Jackson et al., 2000). Mesmo assim, animais mantidos em ambiente com baixos níveis de poeira podem ter a função pulmonar alterada por mais 1 a 3 anos após a mudança ambiental (Miskovic et al, 2007).

2.7 TERAPIA CELULAR

Embora as terapias atuais para a asma sejam eficazes na redução da inflamação, a remodelação das vias aéreas é pouco sensível às terapias atuais, como os corticosteróides inalados, antileucotrienos, e outros (Firinci et al., 2011)

Muitos estudos recentes têm demonstrado que células-tronco derivadas de tecidos adultos podem desenvolver tecido pulmonar, o que vem estimulando a busca por terapias celulares em doenças neste órgão. Alguns resultados mostraram que o enxerto de células-tronco foi mais efetivo em camundongos que tiveram injúria pulmonar induzida do que em animais saudáveis. Essas células foram capazes de promover a redução da extensão do processo inflamatório pulmonar. Os resultados apontam ainda para o sucesso da via sistêmica para a administração da terapia celular em doenças pulmonares neste modelo. É possível que, o transplante autólogo de células tronco, bem como sua dose e tempo de administração, possam aumentar a eficiência terapêutica (Ortiz et al. 2003).

O papel das CMNDMO pode ser resumido em duas funções principais, o mecanismo direto, onde se diferenciam em células maduras que se incorporam ao ambiente ou o mecanismo indireto, que consiste nos efeitos parácrinos destas células. São capazes de regenerar tecidos, tais como fígado, pulmão, cérebro, coração, intestino, músculos e também endotélio (Cuende et al., 2012). A administração de CMNDMO pode potencializar a reparação celular das vias aéreas, bem como reduzir a remodelação e processos inflamatórios através de efeitos parácrinos (Abreu et al, 2011).

Há evidências que sustentam a hipótese de que mecanismos parácrinos mediados por fatores liberados pelas células-tronco adultas sejam residentes ou transplantadas, desempenham um papel essencial no processo de reparação tecidual, produzem e secretam uma ampla variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem estar envolvidos neste processo. Os fatores parácrinos são expressos em diferentes tempos e exercem diferentes funções dependendo do microambiente após lesão, influenciando as células adjacentes, podem assim contribuir para a regeneração e remodelamentos (Gnecchi et al., 2008).

Quando ratos induzidos à pneumonia com E.coli, foram infundidos com células-tronco mesenquimais quatro horas mais tarde o tratamento com células-tronco mesenquimais demonstrou uma redução na severidade da lesão do pulmão, uma melhor depuração bacteriana e redução de TNF- α no LBA 24 h após a infecção (Morrison et al., 2013).

Usando camundongos como modelos no estudo da asma, as células-tronco mesenquimais migraram para o tecido pulmonar lesionado e atenuaram os efeitos da asma brônquica (Firinci et al., 2011). Grupta e autores (2007) mostraram que a administração intratraqueal de células mesenquimais poderia minimizar a lesão pulmonar, diminuindo o edema pulmonar, os níveis de TNF- α e de MIP-1 β no LBA a e o índice de mortalidade, quando comparado com os ratos tratados.

2.7.1 Células mononucleares

O termo células mononucleares derivadas da medula óssea serve para designar todo o conjunto de células com núcleo unilobulado e citoplasma agranular provindas da medula óssea (Cuende et al., 2012). Células adultas, derivadas de

medula óssea são potentes moduladores de resposta imunológicas, promovendo proliferação celular e re-epitelização pulmonar, que tem sido atribuído à imunomodulação sobre a liberação de citocinas ou ativação do sistema imunológico endógeno. (Cruz et al. 2012)

Em humanos é utilizada como terapêutica frequentemente em pacientes imunocomprometidos, além disso é utilizada em doenças isquêmicas pois têm um papel determinante nos processos de neovascularização (Cuende et al., 2012). O uso da fração mononuclear pode se dar de forma rápida e menos custosa, uma vez que não exige cultivo. Composta por diversos tipos celulares, possui uma porção de células mesenquimais que pode variar entre 0,001% e 0,01% (Alves et al. 2009).

As células-tronco desempenham um papel importante no processo inflamatório da asma alérgica experimental. Em um estudo que utilizou murinos no modelo da inflamação alérgica crônica, utilizando terapia intravenosa precoce com CMNDMO, conseguiu-se uma redução significativa na hiperresponsividade das vias aéreas, diminuição do de colapso alveolar e índice de broncoconstrição, obtendo-se a reparação do epitélio das vias aéreas, reduzindo fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia. Os efeitos parácrinos destas células agiram por via aérea e remodelação parênquima pulmonar, resultando em uma melhora na mecânica pulmonar e reduzir a capacidade de resposta das vias aéreas, concluindo que é um protocolo de pré-tratamento eficaz (Abreu et al., 2011).

Os resultados sugerem que as células mononucleares derivadas de medula óssea são mais eficazes do que as mesenquimais no processo de remodelamento. As células mononucleares reduziram a área de colapso alveolar e fibrose em ratos sensibilizados com ovalbumina (Abreu et al., 2013). Isso possivelmente se deve ao fato de que os efeitos funcionais destas células resultam de um equilíbrio entre os diferentes tipos de células, com o envolvimento de todas as células com o potencial de produzir efeitos benéficos (Cruz et al, 2012). Além disso, a fração mononuclear pode ser administrada facilmente e com segurança, no dia da colheita se necessário, a custos mais baixos, e sem risco de rejeição celular (doença do enxerto contra o hospedeiro) (Abreu et al., 2013).

CAPÍTULO 3

3 EM EQUINOS, O NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEARES É MAIOR NA PRIMEIRA ASPIRAÇÃO MEDULAR EM RELAÇÃO ÀS ASPIRAÇÕES SEGUINTEs. (*In horses, the number of mononuclear cells is greater in the first aspiration with respect to the following aspirations*)

RESUMO

Objetivo: Investigar o número de células mononucleares obtidas após aspirações consecutivas em um mesmo ponto de coleta de medula óssea. **Material e Métodos:** Foram estudados quatro cavalos sem raça definida, sedados através da administração de acepromazina, xilazina e cloridrato de petidina, para a coleta de medula óssea a partir do esterno, com agulha Jamshidi 11G, até o volume total de 200 mL de medula óssea por animal. Alíquotas de 500µL da primeira e da última seringa coletadas em cada ponto foram armazenadas para contagem do número total de células nucleadas. **Resultados:** A coleta de medula ocorreu de forma adequada, sendo possível a obtenção de 200 mL de medula óssea com duas a quatro punções por animal. A média para a primeira seringa de cada punção foi de $41,73 \times 10^6$ células vs. $5,88 \times 10^6$ células para a última seringa de cada punção ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Conclui-se que é possível obter grande volume de medula óssea a partir de poucos pontos de coleta, mesmo em animais de idade avançada, mas com redução do número de células nos sucessivos aspirados.

Palavras-chave: terapia celular, células-tronco, cavalo.

ABSTRACT

Objective: investigate the number of mononuclear cells that are obtained after consecutive aspirations at the same point of bone marrow collection. **Material and Methods:** four mongrel horses were studied, sedated by the administration of acepromazine, xylazine and hydrochloride of pethidine for the bone marrow collection

from the sternum with a Jamshidi needle 11G, to a total volume of 200 mL of bone marrow per animal. Aliquots of 500 μ L from the first and last syringe collected in each point were stored for counting to the total number of nucleated cells. **Results:** The bone marrow was collected appropriately and it was possible to obtain 200 mL of bone marrow with two to four punctures per animal. The mean for the first syringe was 41.73 x 10⁶ cells vs. 5.88 x 10⁶ cells for the last syringe (p <0.0001). **Conclusion:** We conclude that it was possible to obtain a large amount of bone marrow from a few collection points, even in older animals, but with reduced numbers of cells in successive aspirated.

Keywords: cell therapy, stem cells, horse.

3.1 INTRODUÇÃO

Apesar do crescimento do uso da terapia celular em equinos, sendo difundida em afecções musculoesqueléticas como tendinite, osteoartrite e recentemente, na laminite (Schnabel et al., 2013), alguns aspectos da coleta de medula óssea em cavalos continuam pouco estudados, como os pontos ideais de coleta, volume e número de células obtidas e os riscos nos quais implicam o procedimento (Durando et al., 2006; Adams et al., 2013).

Para a obtenção de um grande número de células derivadas da medula óssea, é necessário coletar um grande volume de medula óssea, ou um pequeno volume que seja destinado ao cultivo celular (Kasashima et al., 2011; Godwin et al. 2012). Embora não seja completamente estabelecida uma dose adequada para cada terapia celular, os pesquisadores calculam e ponderam os valores baseados em estudos anteriores (Souza et al., 2005; Murphy et al, 2011; Cuende et al., 2012; Abreu et al., 2013).

Essa implicação gera algumas questões sobre a quantidade de medula óssea que pode ser aspirada por punção para atingir o número de células desejado tanto para cultivo, quanto para a aplicação de células mononucleares.

Em humanos, são feitas diversas punções de no máximo 5 mL para se obter o volume final desejado, devido ao já conhecido fato da redução no número de células

após várias coletas num mesmo ponto (Riul e Aguillar 1997; Castro Jr et al., 2001). Em cavalos, várias punções podem não ser bem aceitas pelos proprietários, e quando é preciso um grande volume de medula óssea, parece preferível que se obtenha o mesmo por meio do menor número de punções possível.

Nosso grupo de estudo vem estudando o efeito de células mononucleares derivadas de medula óssea em cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, sendo necessário um mínimo de 500 milhões de células, obtidos a partir de 200 mL de medula óssea do esterno. Até o momento, não existem estudos sobre o número de células obtidos em um volume elevado, assim como se é possível obter 200 mL de medula óssea a partir de um número mínimo de punções.

Assim, o presente estudo busca investigar a possibilidade de extração de um grande volume de medula óssea do esterno bem como comparar o número de células mononucleares que são obtidas nas primeiras e últimas aspirações em cada ponto puncionado para a coleta de medula óssea.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

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

Foram estudados quatro cavalos sem raça definida, pesando entre 440kg e 520kg e com idade entre 18-24 anos, em bom estado de saúde atestado por meio de exame clínico e análise hematológica. Três meses antes do experimento os animais foram desverminados e vacinados contra tétano, influenza equina, raiva e encefalomielite.

3.2.2 Coleta de Medula Óssea e Contagem de Células Mononucleares

Os cavalos foram mantidos em jejum por no mínimo seis horas antes do procedimento, para sedação com acepromazina 1% intravenosa (IV) (Acepran, 0.035 mg/kg, Vetnil, São Paulo, Brasil). O local de coleta entre a quarta e a sexta

esternébras foi tricotomizado, seguido por anestesia subcutânea local com 8 mL de cloridrato de lidocaína 2% (Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) e antissepsia com iodo povidona degermante e álcool. Após, a sedação foi complementada com xilazina 10% IV (Sedomin, 0.5 mg/kg, König, São Paulo, Brasil) e cloridrato de petidina 5% IV (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brasil).

Para a punção, utilizou-se agulha Jamshidi 11G (Angiotech, Gainesville, Florida, Estados Unidos) e seringas de 20 mL previamente preenchidas com 7mL de Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e 0,35mL de heparina sódica 5000UI/mL (Hemofol, Cristália, São Paulo, Brasil), sendo coletadas 30 seringas para cada animal, totalizando 200 mL de medula óssea (aproximadamente 7 mL por seringa).

Cada seringa foi numerada de forma crescente, da primeira até a última aspiração em cada ponto de coleta, mas como objetivo do presente estudo, comparou-se a primeira e a última seringa de cada ponto puncionado, para avaliar a quantidade de células nas amostras. Com esta finalidade, foram reservadas alíquotas de 500µL da primeira e da última seringa coletadas em cada ponto e a contagem do número total de células nucleadas foi realizada utilizando o contador Cell-Dyn 1300 (Abbott Laboratories, Estados Unidos).

3.2.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do teste de Wilcoxon, usando o software Graph Pad Prism versão 3.0 para Windows (San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.3 RESULTADOS

O procedimento de coleta de medula óssea ocorreu sem complicações nos quatro cavalos. Foi possível coletar o volume estimado para todos os animais e fazer mais de uma punção em cada. Dentre os animais utilizados no experimento, dois tiveram dois pontos do esterno puncionados, um teve três pontos e o outro teve quatro, totalizando 11 punções. Nos dias seguintes ao procedimento os animais foram monitorados, e não demonstraram alterações no comportamento.

Depois de obter as contagens por mililitro de medula coletada (Tabela 1), a média para a primeira seringa da punção foi de $41,73 \times 10^6$ células e para a última seringa da mesma punção foi de $5,88 \times 10^6$ células, mostrando uma diferença significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 1 – Valores em milhões de células mononucleares por mililitro de medula óssea coletada do esterno de equinos, na primeira e última seringa de cada punção.

	Ponto de Coleta	Primeira aspiração	Última aspiração
Cavalo 1	1º	76,5	9,2
	2º	71,3	6,7
Cavalo 2	1º	36,2	6,4
	2º	50,6	6,8
	3º	22,8	7
Cavalo 3	1º	26,4	5,8
	2º	31,6	3,7
	3º	22,2	3,7
	4º	54,8	4,7
Cavalo 4	1º	29,8	6,4
	2º	36,8	4,3
Médias	2,75	41,73	5,88

3.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A coleta de medula óssea em cavalos com idade avançada representa um nicho importante, já que estes animais comumente apresentam doenças crônicas e vêm de tratamentos repetidos, muitas vezes tolerantes ou refratários, portanto, são potenciais pacientes para a terapia celular.

O esterno foi escolhido como local de coleta de medula óssea por ser a fonte mais adequada em animais de meia idade. Isso se deve ao fato de que neste local a atividade hematopoiética persiste durante toda a vida do animal (Alves et al. 2009), enquanto que na crista ilíaca a coleta pode estar dificultada ou em menor volume, além disso o rendimento de células obtidas pela aspiração na crista ilíaca é menor (Delling et al., 2012). Embora o esterno seja uma boa fonte de coleta, existe um grande risco pelo fato do coração estar logo acima das esternébras indicadas à coleta,

podendo ser perfurado durante o processo (Durando et al., 2006), assim o fato de se poder conseguir obter o volume de 200 mL com poucas punções parece vantajoso, especialmente para quem deseja a obtenção de células mononucleares para tratamento no mesmo dia.

A aspiração de medula óssea em equinos é comumente praticada em pequenos volumes, variando entre 5mL a 30 mL (Kasashima et al., 2011; Adams et al. 2013), exceto no trabalho feito por Toupadakis et al. (2010) que extraiu 120mL de medula óssea do esterno dos cavalos. Os volumes aspirados são pequenos porque são normalmente destinados ao cultivo de células-tronco mesenquimais utilizadas para o tratamento de afecções do sistema musculoesquelético dos equinos, necessitando de um baixo número de células, entre 10 e 20 milhões (Godwin et al., 2012; Schnabel et al., 2013). Contudo, para a obtenção de um volume maior de células mononucleares, pode ser necessário um volume maior de medula óssea. Desta forma, no presente estudo foram coletados 200 mL de medula óssea de cada animal. Neste caso, precisou-se estabelecer as diferenças entre o número de células mononucleares obtidas na primeira e na última aspiração, já que em outros trabalhos em humanos e em equinos jovens foi demonstrado que essa diferença é importante (Muschler et al., 1997; Adams et al. 2013).

Em humanos, o volume de medula óssea coletada é estabelecido de acordo com as condições físicas do doador e aproximadamente 10 a 15mL/kg de peso do paciente podem ser coletados, resultando em um total que pode passar de um litro de medula óssea. Este volume é obtido em diversas aspirações que variam entre 3 mL e 5 mL por local puncionado, o que proporciona um número maior de células progenitoras (Riul e Aguillar 1997; Castro Jr et al., 2001).

Os animais empregados no presente estudo fizeram parte de outro trabalho onde se investigou os efeitos das células mononucleares derivadas da medula óssea na obstrução recorrente das vias aéreas. Assim, foi interessante de se constatar que a coleta de 200 mL de medula óssea foi possível a partir do esterno desses animais, sem que houvesse prejuízo à saúde dos mesmos, possibilitando a obtenção do número de células desejado de no mínimo 500 milhões para o tratamento (dados não demonstrados).

Os nossos resultados mostram que o número de células mononucleares obtido na primeira aspiração da medula óssea é significativamente mais elevado do que na aspiração final. Os primeiros 5mL aspirados de cada ponto geram uma contagem

significativamente maior de células nucleadas por mililitro (Adams et al. 2013) e um maior número de unidades formadoras de colônias quando em cultivo (Kasashima et al., 2011). Em um estudo recente, Kasashima et al. (2011) recomenda múltiplas punções da mesma esternébra com a aspiração de pequenas quantidades.

Esta diferença no número de células de acordo com o volume de aspiração pode ser explicada pela diluição progressiva da medula óssea com o sangue periférico, dependendo das características locais de vasos e fluxo sanguíneo (Muschler et al., 1997). Além disso, alguns autores também alertam sobre as diferenças individuais entre os animais (Carter-Arnold et al., 2013).

Em pacientes com idade avançada, foi possível coletar um grande volume de medula óssea do esterno. Da mesma maneira que encontrado em humanos, a aspiração de volumes iniciais proporcionou um maior número de células mononucleares. Porém, um grande volume aspirado em poucas punções pode significar um ganho importante para o paciente, já que este fica sob efeito anestésico durante um tempo mais curto e sofre menos perfurações, diminuindo a exposição ao risco durante e após o procedimento.

CAPÍTULO 4

4 EVIDÊNCIAS DE MELHORA CLÍNICA EM CAVALOS COM OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREA TRATADOS COM CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA. (Clinical evidence of improvement in horses with recurrent airway obstruction medicated with autologous bone marrow mononuclear derived cells)

RESUMO

Introdução: A obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) é uma enfermidade crônica dos equinos estabulados, que manifesta-se por dispneia, intolerância ao exercício, esforço abdominal expiratório, tosse e secreção nasal, impactando principalmente animais atletas. A terapia celular apresenta resultados benéficos na inflamação pulmonar, mas não foi estudada na ORVA dos cavalos. No presente estudo levanta-se a hipótese de que o tratamento com terapia celular autóloga por células mononucleares resulta em melhora, equivalente a tratamento convencional, para equinos com ORVA. **Objetivo:** Avaliar a terapia celular autóloga, utilizando a porção de células mononucleares derivadas da medula óssea (CMNDMO), em animais com ORVA, e comparar com a terapia convencional com dexametasona. **Métodos:** Foram usados treze equinos mestiços, de ambos os gêneros, com média de idade $16,3 \pm 2,2$ anos e média de peso de $478,2\text{Kg} \pm 15,8$, com histórico de dispneia crônica e recorrente. Seis deles tiveram medula óssea coletada a partir do esterno e a fração mononuclear isolada por gradiente de densidade e congelada a -192°C . O quadro clínico foi induzido tendo feno sacudido próximo às narinas por dois minutos ao dia e suas camas eram reviradas 4 minutos por dia. A perda amostral foi de cinco animais que não entraram no quadro desejado, restando oito animais, que foram divididos em dois grupos, o controle positivo Gdex ($n=4$), onde os animais receberam dexametasona por via oral por 21 dias (De Luca et al., 2008) e, o Gcel ($n=4$) onde os cavalos receberam a instilação intratraqueal com células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea. Após a indução, foram considerados no quadro de ORVA os equinos que apresentaram expiração abdominal prolongada, tosse e presença de muco nasal, sem febre, tendo neutrofilia superior a 25% no lavado broncoalveolar (LBA) e escore clínico de no mínimo 10segundo Tesarowski et al. (1996). Todos os

animais foram mantidos estabulados durante o período do estudo, mas com a substituição do feno e da aveia por verde fresco e ração peletizada. Durante o tratamento, os cavalos de ambos os grupos foram reavaliados em 7 e 21 dias. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Tukey de múltipla comparação e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão da média (SD). **Resultados:** As terapias demonstraram decréscimo do esforço respiratório nos dias sete e 21 em relação ao dia 0 para Gdex ($p=0,005$ e $p=0,01$ respectivamente) e para Gcel ($p=0,047$ e $p=0,004$ respectivamente) e no escore de Tesarowski nos dias sete e 21 em relação ao dia 0 para Gdex ($p=0,003$ e $p=0,015$ respectivamente) e para Gcel ($p=0,006$ e $p=0,004$ respectivamente). Houve declínio significativo do número de neutrófilos nos dias sete e 21 em relação ao dia 0 para Gdex ($p=0,0007$ e $p=0,0001$ respectivamente) e para Gcel ($p=0,06$ e $p=0,05$ respectivamente). Concomitantemente houve um aumento de macrófagos nos dias sete e 21 em relação ao dia 0 para Gdex ($p=0,001$ e $p=0,011$ respectivamente) e para Gcel ($p=0,039$ e $p=0,056$ respectivamente). No presente estudo, conclui-se que a instilação intratraqueal com CMNDMO melhora o quadro inflamatório em cavalos com ORVA mantidos estabulados, por um período de 21 dias, igualmente à dexametasona.

Palavras-chave: terapia celular, vias aéreas, cavalos, neutrófilo, macrófago alveolar, célula-tronco.

ABSTRACT

Introduction: The applicant airway obstruction (RAO) is a chronic disease of horses stabled, which is manifested by respiratory distress, exercise intolerance, abdominal expiratory effort, cough and runny nose, impacting mainly athletes horses. Cell therapy has beneficial results in pulmonary inflammation, but has not been studied in RAO affected horses. In the present study raises the possibility that treatment with autologous mononuclear cell therapy results in an improvement equivalent to standard treatment for horses with RAO. **Objective:** To evaluate the autologous cell therapy using the portion of mononuclear cells derived from bone marrow (BMDMC) in animal ORVA, and compare with conventional therapy with dexamethasone. **Methods:** Were used thirteen crossbred horses, of both genders, with a mean age 16.3 ± 2.2 years

and mean weight $15.8 \pm 478.2\text{Kg}$, with a history of respiratory distress. Six of them had bone marrow collected from the sternum and mononuclear fraction isolated by density gradient and frozen at -192°C . The clinically was induced with hay near the nostrils shaken for two minutes a day and their beds were overturned four minutes a day. The sample loss was five animals that did not make the desired frame, leaving eight animals were divided into two groups, the Gdex positive control ($n = 4$), where the animals received dexamethasone for 21 days as De Luca et al. (2008), the Gcel ($n = 4$) where horses received one intratracheal instillation with autologous mononuclear cells derived from bone marrow. After induction, were considered in clinical score of RAO horses that had prolonged abdominal breath, coughing and having nasal mucus, without fever, neutrophilia with more than 25% in the BAL and clinical score of at least 10 seconds Tesarowski et al. (1996). All animals had as part of treatment to environmental change, carried out with the replacement of hay with fresh green and pelleted feed, eliminating the oats. During the treatment the horses in both groups were assessed at seven and 21 days. The statistical analysis was performed using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test and values are presented as mean \pm SD. **Results:**The therapies demonstrated decrease of breathing effort on seven and 21 in relation to day 0 for Gdex ($p = 0.005$ and $p = 0.01$ respectively) and Gcel ($p = 0.047$ and $p = 0.004$ respectively), and Tesarowski score on days seven and 21 compared to day 0 to Gdex ($p = 0.003$ and $p = 0.015$ respectively) and Gcel ($p = 0.006$ and $p = 0.004$ respectively). There was a significant decline in the number of neutrophils in seven and 21 compared to day 0 to Gdex ($p = 0.0007$ and $p = 0.0001$ respectively) and Gcel ($p = 0.06$ and $p = 0.05$ respectively). At the same time an increase of macrophages on days seven and 21 compared to day 0 to Gdex ($p = 0.001$ and $p = 0.011$ respectively) and Gcel ($p = 0.039$ and $p = 0.056$ respectively). These results suggest that the treatments are equivalents and the cell therapy was similar to dexamethasone treatment for a period of 21 days.

Keywords: cell therapy, airways, horse, neutrophil, alveolar macrophage, stem cell.

4.1 INTRODUÇÃO

A obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) é uma enfermidade crônica dos equinos bastante conhecida. Acomete em sua maioria, animais estabulados por longos períodos, mas pode ser encontrada em animais a pasto, associada às pastagens de verão. Manifesta-se por dispneia, intolerância ao exercício e esforço abdominal expiratório, tosse, corrimento nasal e ausência de febre (Couëtil et al., 2007; Erck-Westergrenn 2013; Venugopal et al., 2013).

Sua patofisiologia envolve a hipersensibilidade a alérgenos e irritantes inalantes, hiperresponsividade das vias aéreas, broncoconstrição e hipersecreção de muco (Robinson, 2001; Couëtil et al., 2007; Kutasi et al., 2011) que é maior nos animais estabulados, mas em sua maioria não visível externamente (Millerick-May et al., 2008). Animais acometidos podem apresentar alterações dos sons pulmonares tais como crepitação e sibilo, corrimento nasal bilateral e aumento na frequência e intensidade respiratória (Léguillette et al., 2003; Aharonson-Raz, 2012).

Seu impacto é mais significativo em animais ligados à prática esportiva, visto estes animais dependem da atividade física, e já que durante a fase de exacerbação da doença, ocorrem alterações funcionais significativas, tais como um aumento da pressão transpulmonar, dispneia, diminuição na capacidade ventilatória e em casos graves, hipoxemia, e sérios déficits no rendimento esportivo (Erck-Westergrenn, 2013).

Quando os cavalos susceptíveis entram em contato com o antígeno, normalmente através das células apresentadoras de antígeno, especialmente os macrófagos alveolares, ocorre a liberação de mediadores químicos que fazem a quimiotaxia de neutrófilos (Laan et al., 2006; Joubert et al., 2011), provocando reações alérgica e inflamatória ocorrem simultaneamente, e a hipersensibilidade da mucosa das vias aéreas estimula um grande número neutrófilos, que ultrapassam os 25% na contagem citológica diferencial do lavado broncoalveolar (De Luca et al., 2008) e linfócitos que são responsáveis pelas respostas Th1 e Th2 e pela secreção de IgE (Léguillette et al., 2003; Jackson et al., 2004; Marinkovic et al., 2007), o que foi evidenciado em animais com ORVA (Deaton et al., 2007).

O tratamento habitual é feito com a mudança ambiental, reduzindo à exposição de antígenos ambientais, associado a anti-inflamatórios esteroidais e broncodilatadores combinados (Leclere et al., 2010). A administração sistêmica de

corticóides para o tratamento da ORVA se mostra a mais eficaz em casos graves, mas provoca diversos efeitos indesejáveis (Dauvillier et al., 2011).

Em virtude da necessidade de terapia intermitente e de manutenção em equinos com ORVA, e dos efeitos colaterais associados a corticoterapia crônica em equinos, este trabalho teve por objetivo avaliar a terapia celular autóloga com células mononucleares da medula óssea dos animais com ORVA, e comparar sua eficácia com a terapia convencionalmente utilizada, a base de corticoides segundo De Luca et al. (2008).

A terapia celular vem sendo utilizada devido à sua capacidade de repovoamento e regeneração teciduais, assim como neovascularização, uma vez que as células-tronco tem capacidade de se diferenciar em tecido mesodérmico, ectodérmico, e endodérmico, demonstrado *in vivo* e *in vitro*, gerando tecidos como fígado, pulmão, cérebro, coração, intestino, e músculo e também células endoteliais (Cuende et al., 2012).

Além da diferenciação e replicação celular, há evidências de que um dos efeitos benéficos (provavelmente o mais importante) de células derivadas de medula óssea refletem em um mecanismo parácrino. Isso inclui a produção de quantidades significativas de citocinas e fatores de crescimento com diferentes ações, incluindo a prevenção de apoptose, citoproteção das células nativas viáveis, efeitos anti-inflamatórios, redução de fibrose, e o recrutamento de células específicas (Cuende et al., 2012). A interação entre os diferentes tipos de células, dependendo do meio de cultura ou de onde se encontram, influenciam as interações parácrinas. (Kolbe et al., 2011).

Existem resultados em murinos que foram desafiados à asma e tratados com células mononucleares, que demonstram uma melhora importante na mecânica pulmonar, com a redução do colapso alveolar, de fibrose e de broncoconstrição. Ocorreu ainda a reparação do epitélio das vias aéreas, com redução da hipertrofia e hiperplasia locais. Estes resultados foram alcançados com um pequeno grau de enxerto pulmonar, sugerindo um papel importante dos efeitos parácrinos, e denotam que a terapia com células mononucleares é um tratamento eficaz (Abreu et al., 2011).

A hipótese do presente estudo é que o grupo tratado com terapia celular autóloga por células mononucleares, apresenta melhora clínica equivalente ao grupo tratado com dexametasona via oral, para equinos com ORVA.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Delineamento do estudo

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da PUCPR sob o número de registro 788. Foram estudados treze equinos mestiços, de ambos os gêneros, com a média de idade $16,3 \pm 2,2$ anos e média de peso de $478,2\text{Kg} \pm 15,8$, com histórico de dispneia, intolerância ao exercício, corrimento nasal bilateral, tosse e ausência de febre. Foram desverminados e vacinados contra Herpes-vírus tipos I e IV, tétano e influenza. Três deles pertenciam ao Regimento de Polícia Militar Montada do Paraná, e assim, permaneceram em atividade, sendo mantidos estabulados durante todo o experimento, o restante pertencia a Pontifícia Universidade Católica do Paraná, e permaneceram a pasto por três meses antes do início do experimento. Todos os equinos foram clinicamente e hematologicamente avaliados, excluindo que qualquer enfermidade estivesse presente. No período que antecedeu o tratamento, os cavalos eram alimentados com de ração peletizada, aveia amassada e feno de gramínea *ad libitum* bem como água.

Os cavalos permaneceram sem medicação prévia por no mínimo 7 dias (Venugopal et al., 2013), foram aleatoriamente separados em dois grupos, sendo o grupo controle positivo Gdex (n=4), onde os animais receberam dexametasona e, o Gcel (n=4) onde os cavalos receberam a instilação traqueal com células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea.

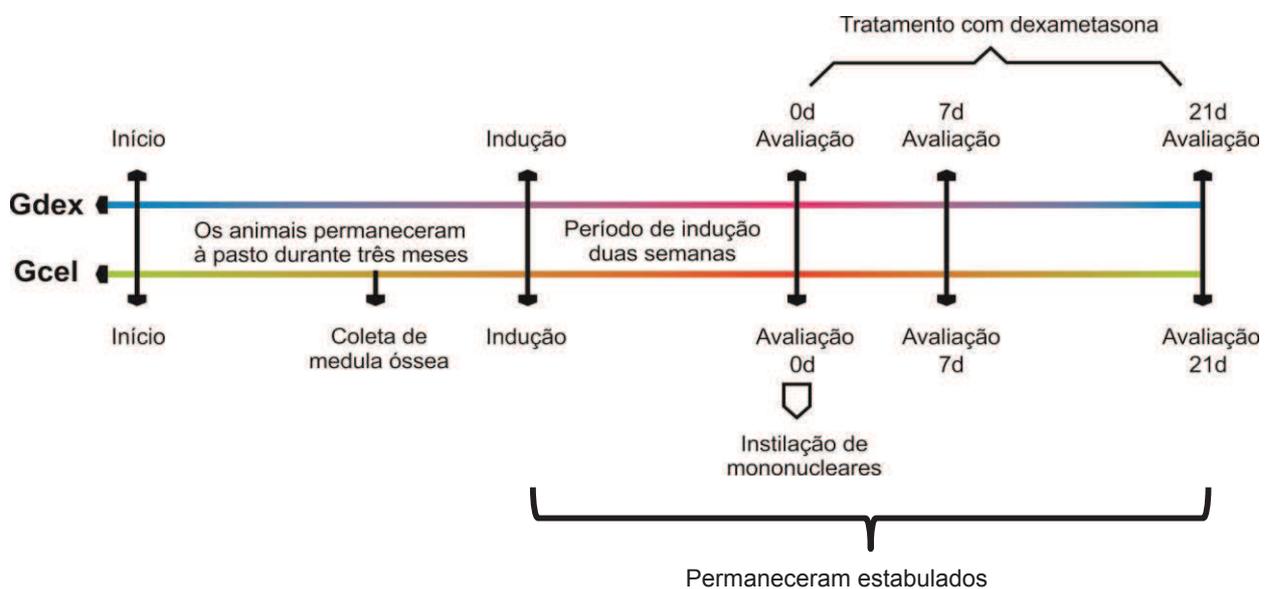
Ambos os grupos foram induzidos à crise tendo feno sacudido próximo às narinas por dois minutos ao dia (Racineet al., 2011) e suas camas eram reviradas 4 minutos por dia (Joubert et al., 2011) ambos os procedimentos foram repetidos por aproximadamente duas semanas (Figura 1). Após a indução e a obtenção do escore clínico de no mínimo 10 pontos (Tesarowskiet al.1996), todos os animais permaneceram estabulados mas tiveram como parte do tratamento a alteração ambiental, realizada com a substituição do feno por verde fresco e ração peletizada, minimizando contato com alérgenos (De Luca et al. 2008).

Foi utilizado como critério de inclusão no estudo animais com o fenótipo da ORVA observado através dos sinais clínicos manifestados pelos equinos (equinos que apresentaram expiração abdominal prolongada, tosse e presença de muco nasal, sem febre concomitante) (Kutasiet al., 2011; Erck-Westergrenet al., 2013), pontuação

acima de 10 no escore clínico conforme Tesarowskiet al. (1996) e neutrofilia $\geq 25\%$ no LBA (De Luca et al., 2008).

Durante o tratamento, os cavalos de ambos os grupos foram reavaliados em sete e 21 (Figura 1) dias (Leclere et al. 2010; Cruz et al. 2012), com a mesma metodologia usada em todo o trabalho (tópicos 3.2.4).

Figura 1: Linha temporal do estudo. Linha do tempo de ambos os grupos de cavalos com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos.



4.2.2 Obtenção e processamento da medula óssea

Os animais foram sedados com acepromazina 1% IV (0,05 mg/kg de Acepran 1% IM- Univet®), higienizados, tricotomizados e anestesiados com lidocaína 2% (Alves et al. 2012) no local da coleta, entre as quarta e sexta esternébras (Kasashima et al., 2011). Fez-se antissepsia local e posteriormente, adminitrou-se xilazina 10% (Sedomin® - Kinig®, 0,5mg / kg de peso corporal IV) (Hoffman 2008) associada a50mg de cloridrato de petidina por via intravenosa. Foram aspirados 200ml de medula óssea de cada animal, usando agulha de coleta de medula óssea Jamshidi (Angiotech®, Gainesville, Florida, USA), 11G x 10cm, em 30 seringas de 20ml previamente preparadas com 7ml de IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma-Aldrich) e 0,5% de heparina sódica 5000UI/ml (Hemofol®), sempre

preservadas em isopor com gelo, mesmo após a coleta, até a chegada ao laboratório. Sob a câmara de fluxo, as amostras foram colocadas em tubos cônicos de 50ml para centrifuga, foram retirados 300µl de seu conteúdo, filtrados em malha de 100µm (Cellstrainer - BD®), para contagem de células no contador Mindray (BC 2800). Após a verificação da contagem, as amostras foram processadas de acordo como descrito por Boyum adaptado (1968). A medula óssea foi centrifugada a 650g por 30 minutos, e a camada que se formou entre o plasma e a papa de hemácias foi retirada e colocada em um tubo cônico de 50ml com 20ml de IMDM.

Este conteúdo foi colocado sobre o gradiente de densidade Ficoll/Histopaque®-1077 (Sigma®) 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 IMDM, posteriormente centrifugado a 400g por 10 minutos, onde se obteve o pellet de células mononucleares. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em aproximadamente 20ml de IMDM, de onde 300µl foram retirados para a contagem celular pós isolamento.

Após a determinação do número de células, o material foi preparado para o congelamento. O meio de congelamento era constituído de 10% Soro Fetal Bovino, 10% dimetilsulfóxido (DMSO) e 80% células mononucleares em IMDM. Armazenado em bolsas secas de transfusão acondicionadas a -80°C por 24 horas e depois transferidas para o nitrogênio líquido a -192 °C até o momento da realização da terapia celular.

No dia da instilação das células mononucleares, estas eram descongeladas em banho-maria a 37°C, lavadas em IMDM, centrifugadas a 400g por 10 minutos, descartando o sobrenadante e ressuspensionando em 14ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em seguida estas eram filtradas em malha de 100µm (Cellstrainer - BD®), sendo 300µl destinados à contagem de células no contador Mindray (BC 2800).

Outra alíquota de células foi corada separada e destinada à citometria de fluxo para verificar a viabilidade das células (Abreu et al., 2011; Carter-Arnold et al., 2013). Finalmente, eram adicionados 5ml de soro autólogo do paciente e armazenadas no volume total de 20ml destinados à instilação.

4.2.3 Avaliação clínica, endoscópica e lavado broncoalveolar

As avaliações clínicas foram realizadas antes e após os tratamentos, sempre por dois médicos veterinários, quais não sabiam dos tratamentos realizados, e incluíram medições de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), tempo de preenchimento capilar (TPC) e temperatura retal (TR), avaliação de mucosa nasal e corrimento nasal; linfonodos submandibulares e retrofaríngeos, reflexo de tosse, ausculta e percussão pulmonar; e avaliação de esforço abdominal durante a respiração e avaliação endoscópica (McGorumeDixon, 2007; Mickovick et al., 2007). A partir do exame físico atribuiu-se um escore clínico conforme Tesarowski et al. (1996).

Todas as avaliações foram procedidas com os animais em repouso e no período matutino. Embora não tenha sido provada a influência na contagem celular do LBA de animais com ou sem exercício prévio, há uma diferença na quantidade de muco nas vias respiratórias, que costuma ser maior logo após o exercício (Hoffman 2008).

Para a coleta do LBA foi realizada sedação com detomidina (0,005 mg / kg de peso corporal IV) (Hoffman 2008; Pacheco et al., 2014) e cloridrato de petidina (50mg/ml, 1ml IV). Para a endoscopia respiratória foi utilizado um fibroscópio flexível Olympus de 170 cm de comprimento e 12 mm de diâmetro, introduzido por uma das narinas conduzindo-se o exame até a bifurcação da traqueia.

Fez-se a avaliação da quantidade, coloração e viscosidade de muco traqueal, bem como espessura da carina, também chamada de septo traqueal, conforme Gerber et al. (2004), onde o valor atribuído para o acúmulo de muco é tanto maior quanto maior for sua quantidade, variando de 0 a 5; o valor atribuído para a coloração do muco é tanto maior quanto maior for sua transparência, variando de 1 a 5; o valor atribuído para a viscosidade do muco é tanto maior quanto maior for sua aderência, variando de 1 a 5.

Para a realização do LBA, um cateter flexível de silicone marca Cook (V-PBAL-300, Cook Vet Products, Hamburg, Alemanha), de 300 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro, foi introduzido por uma narina até parar em um segmento de brônquio, onde foram instilados 500ml de solução NaCl 0,9% levemente aquecida (Hoffman 2008; Michelotto 2010), em quatro etapas de 120ml de instilação e recuperação consecutiva até completar o volume total.

O LBA foi conservado em ambiente refrigerado até chegar ao laboratório, onde foi centrifugado a 340g em 4°C por 6 minutos (Michelotto 2010). Parte do sobrenadante foi retirado e congelado a -20°C para análises futuras. O pellet foi ressuspenso em parte do sobrenadante e fez-se esfregaço em lâmina citológica, corado em método *Diff-Quick* e feita a contagem diferencial de células em aumento 1000x (Hoffman, 2008).

4.2.4 Tratamentos

O grupo Gdex foi tratado com dexametasona, recebendo inicialmente 0,165mg/kg VO 24h por sete dias, seguindo 0,083mg/kg VO 24h por sete dias e, 0,04mg/kg VO por mais sete dias, totalizando 21 dias de tratamento (De LUCA et al., 2012).

No grupo Gcel, procedeu-se à sedação com xilazina 10% (0,5mg / kg de peso corporal IV) (Hoffman, 2008) para assim realizar o transplante autólogo de células mononucleares, sendo previsto a instilação de uma suspensão contendo entre 500×10^6 e 1×10^9 células mononucleares, concentradas em 20mL de volume total, em única dose.

O procedimento foi realizado com auxílio do endoscópio, sendo posicionado próximo à bifurcação da traqueia, utilizando-se uma sonda de polietileno estéril inserida pelo canal de trabalho do endoscópio, depositando-se a suspensão de células na região da carina. Após a instilação das células, os animais foram mantidos por 10 minutos com a cabeça em posição natural, sem abaixar, até o retorno à baia.

4.2.5 Análise estatística

Para a análise dos resultados nos períodos de avaliação, em cada grupo, se utilizou a análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Tukey de múltipla comparação, e teste *t* de 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 são apresentados como média \pm desvio padrão da média (SD), e valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

4.3 RESULTADOS

Após a coleta de medula óssea procedida na região do esterno, os animais permaneceram hígidos, sem quaisquer alterações físicas ou comportamentais. A média de células obtidas foi de $22,59 \times 10^9 \pm 8,21$ células, no momento prévio ao isolamento. Após o isolamento das células, a média ficou em $2,02 \times 10^9 \pm 0,93$ CMNDMO. Após o descongelamento da suspensão, a média de células conseguidas para a realização dos tratamentos foi de $972,2 \times 10^6 \pm 313,9$ células (Tabela 2).

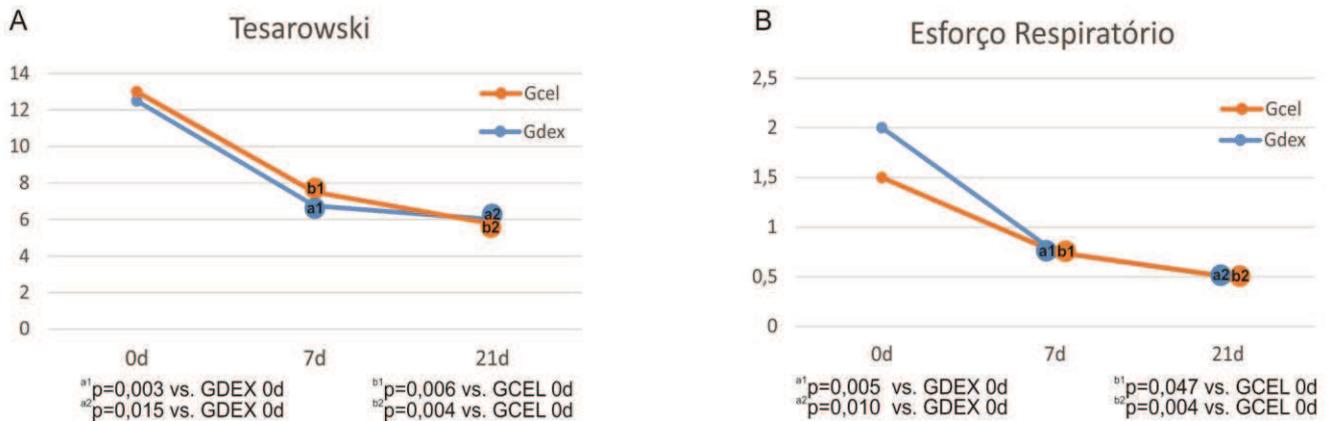
Tabela 2: Isolamento e congelamento de células mononucleares. Quantidade de células mononucleares obtidas a partir de 200 mL de medula óssea (esterno) de quatro equinos com obstrução recorrente das vias aéreas. Está demonstrado o número médio de células \pm SD, nos momentos de obtenção e após o descongelamento para o transplante.

Contagem pré- isolamento $\times 10^9$	Contagem pós- isolamento $\times 10^9$	Recuperação no isolamento %	Contagem pós- descongelamento $\times 10^6$	Recuperação no descongelamento %	Viabilidade %
$22,6 \pm 8,2$	$2,0 \pm 0,9$	$9,0 \pm 2,0$	$972,2 \pm 313,9$	$54,0 \pm 14,0$	$93,2 \pm 3,8$

Dois dos treze animais apresentaram desconforto abdominal durante o período de indução à doença. Estes foram examinados e, como não houve evolução do quadro, permaneceram no processo de indução até que se obtivesse o quadro clínico da ORVA e o escore de Tesarowski et al. (1996) desejado. Permaneceram no estudo apenas oito equinos, os demais animais não alcançaram o escore clínico desejado e foram excluídos do estudo.

No presente estudo, todos os animais apresentavam esforço abdominal expiratório, percebido pela hipertrofia da musculatura abdominal oblíqua, formando o que se denomina linha de *heaves*. Após ambos os tratamentos, houve diminuição do esforço respiratório, constatado diminuição da percepção da linha de *heaves* e diminuição do escore clínico (Tesarowski et al.; 1996) para os dois grupos, sem qualquer diferença significativa entre os tratamentos, observado nos gráficos (Figuras 2A e 2B).

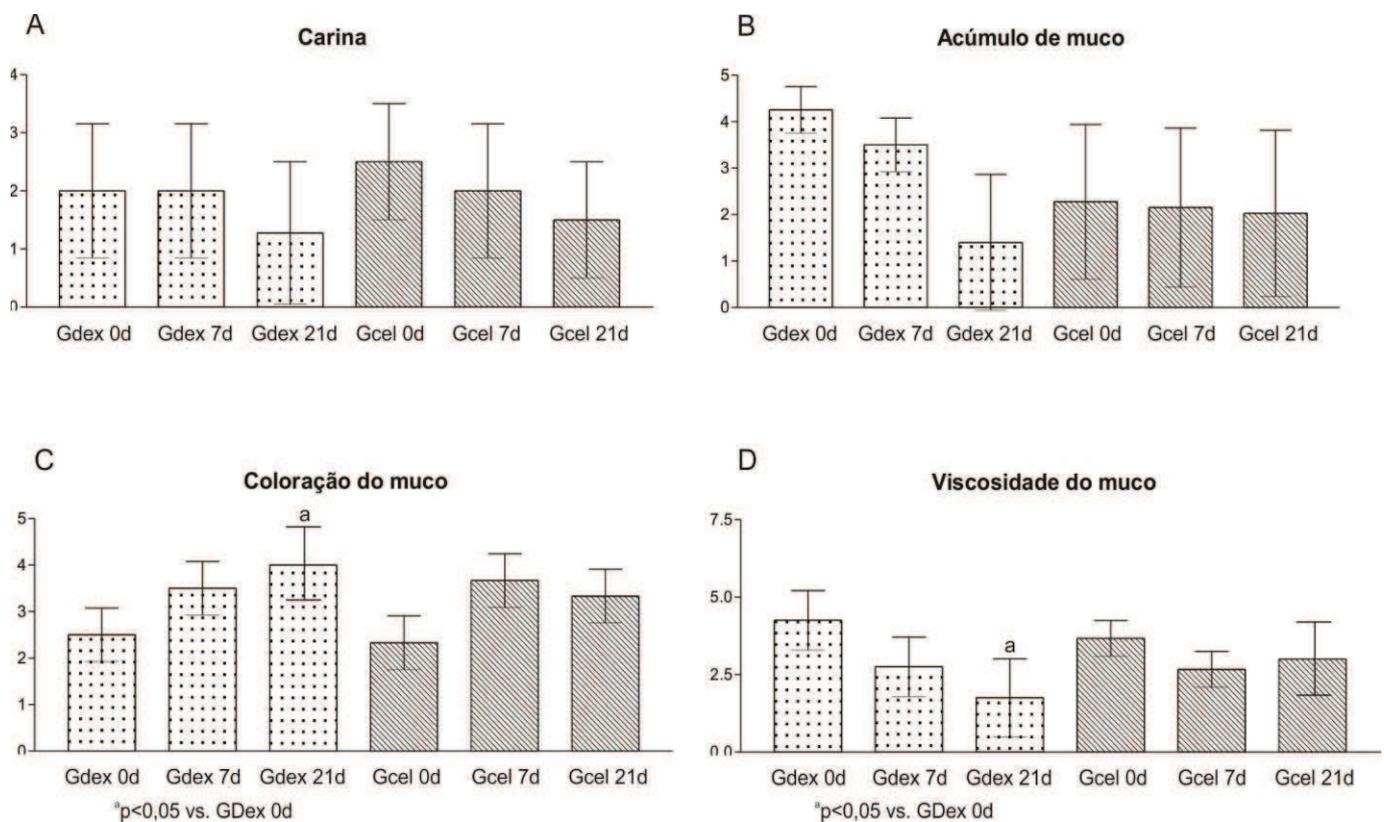
Figura 2: Resultados de esforço respiratório - (A) escore clínico segundo Tesarowski et al. (1996) e (B) presença de esforço respiratório. Ambos de cavalos com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos. Valores apresentados como média \pm SD, evidenciando diferença significativa entre o período inicial e os demais em ambos os grupos.



Embora alguns animais tenham apresentado diferença na espessura da carina, isso não foi significativo em nenhum dos grupos durante todas as avaliações (Figura 3A). As quantidades de muco traqueal observadas no exame endoscópico não diferiram entre os grupos e momentos de avaliação (Figura 3B).

A coloração do muco não apresentou alterações no grupo Gcel nos momentos de avaliação, porém no grupo Gdex apresentou diferença entre os dias 0 e 21 com $p < 0,05$, indicando que o muco tendeu ao incolor (Figura 3C). A viscosidade do muco também regrediu no mesmo período de avaliações no grupo Gdex ($p < 0,05$) indicando que o muco aparentemente adquiriu maior fluidez (Figura 3D).

Figura 3: Avaliação endoscópica e graduação de muco – (A) Avaliação do septo traqueal ou carina por endoscopia respiratória de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos; (B) Avaliação do acúmulo de muco conforme Gerber et al. (2004) de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos; (C) Avaliação da coloração do muco conforme Gerber et al. (2004) de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos; (D) Avaliação da viscosidade do muco conforme Gerber et al. (2004) de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos;



A quantidade de LBA recuperado não diferiu entre os grupos e momentos de avaliação, assim como não houve diferença significativa na contagem de células totais do LBA (Tabela 3 e Figuras 4A e 4B).

No presente estudo, o número percentual médio de neutrófilos foi menor na avaliação do dia sete bem como no dia 21, tanto no Gdex quanto no Gcel, em relação à avaliação inicial (Tabela 3 e Figura 5A). Não houve diferença na comparação entre os grupos nos momentos de avaliação.

Evidenciou-se aumento no número de macrófagos, que foi significativo nos dias 7 e 21 de ambos os grupos em relação à avaliação inicial (Tabela 3 e Figura 5B). Não houve diferença na comparação entre os grupos nos momentos de avaliação.

Tabela 3: Volume recuperado no LBA e perfil citológico. Avaliação do percentual de lavado broncoalveolar recuperado, do número total de células e da contagem diferencial destas células em animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos.

	LBA recuperado %	total de células cel/ μ l	Neutrófilos %	Macrófagos %	Linfócitos %
Gdex 0d	48,1 \pm 8,8	76,5 \pm 32,3	63,0 \pm 13,8	24,2 \pm 11,6	10,5 \pm 4,5
Gdex 7d	60,2 \pm 6,9	125,7 \pm 67,5	15,75 \pm 7,4 *	61,2 \pm 7,9 *	17,2 \pm 3,8
Gdex 21d	49,3 \pm 12,0	82,2 \pm 20,2	15,0 \pm 10,7 *	60,0 \pm 21,8 *	17,5 \pm 11,9
Gcel 0d	49,2 \pm 14,4	145,5 \pm 180,6	53,0 \pm 21,4	26,0 \pm 6,1	18,5 \pm 17,2
Gcel 7d	53,6 \pm 15,4	76,6 \pm 24,8	19,0 \pm 21,6 *	52,2 \pm 18,8 *	25,5 \pm 18,3
Gcel21d	51,6 \pm 12,5	80,4 \pm 25,1	21,7 \pm 30,3 *	54,7 \pm 23,3 *	19,5 \pm 15,4

*Diferente significativamente da avaliação do dia 0 do mesmo grupo ($p < 0,05$)

No Gdex a maior média do percentual de linfócitos 17,5 \pm 8,0 foi no dia 21 e no Gcel no mesmo período foi de 22,5 \pm 13,2. Porém não houve diferença estatística significativa no número de linfócitos (Figuras 5E e 5F) entre os valores dos dias, bem como entre os tratamentos. Isso coloca os tratamentos equiparados, ou seja, a terapia

celular obteve resultados similares ao tratamento já difundido a base de dexametasona.

Figura 4: Avaliação do volume de LBA recuperado e células totais - (A) Avaliação do percentual de recuperação do LBA de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos;(B) Avaliação do número de células totais do LBA de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos.

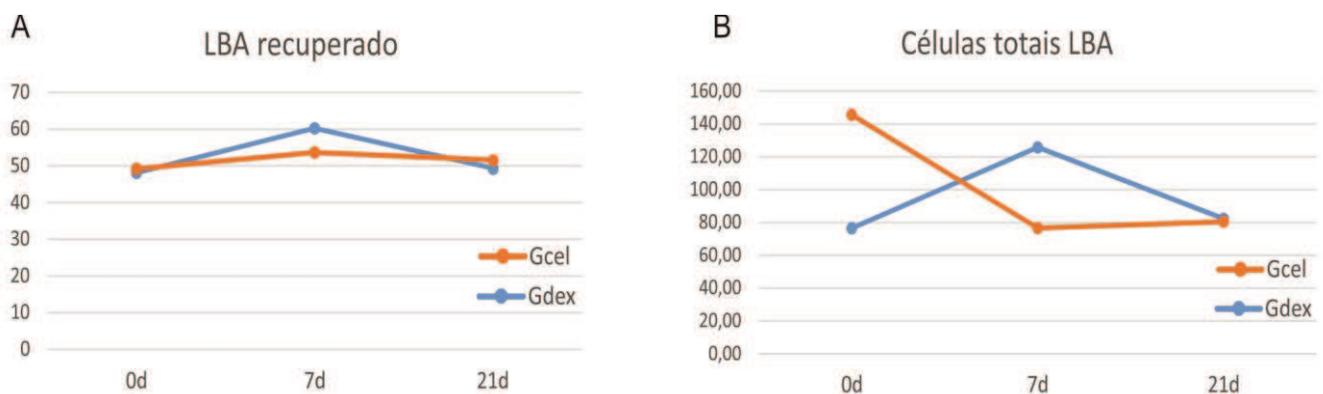
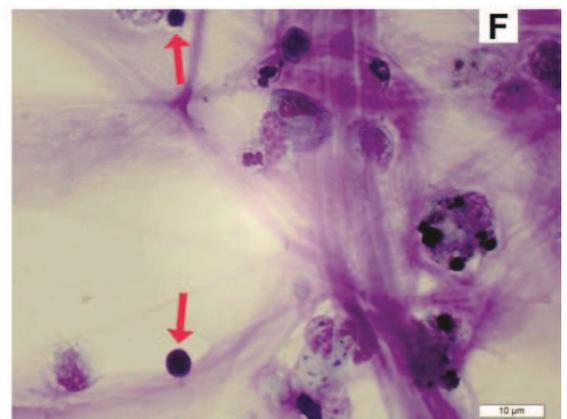
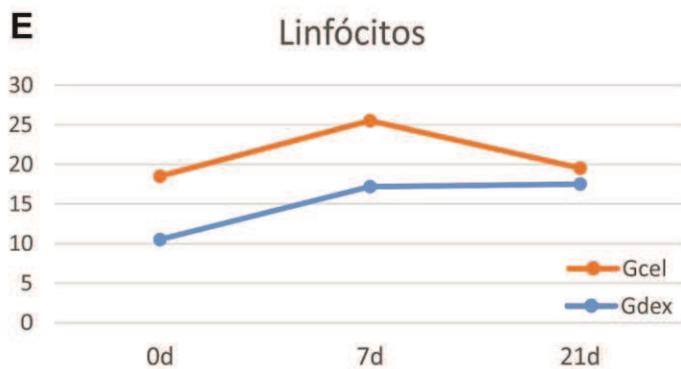
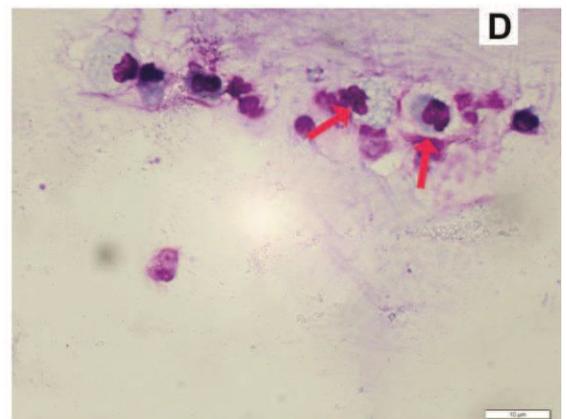
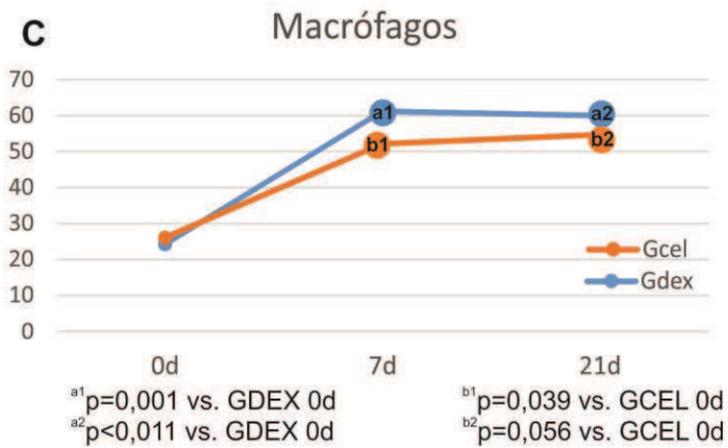
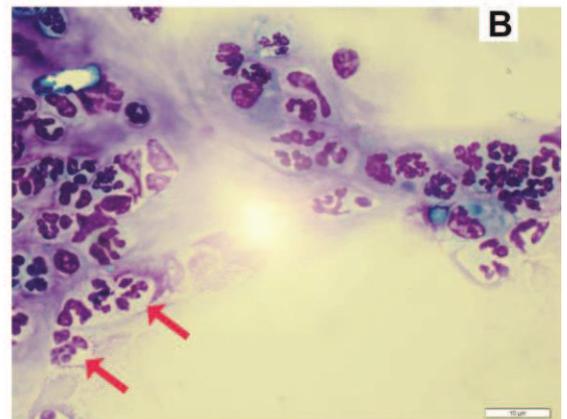
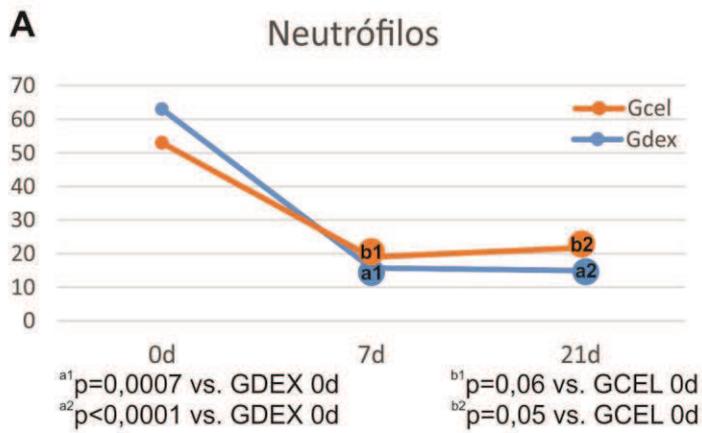


Figura 5: Avaliação do perfil citológico do lavado broncoalveolar (LBA) - (A) Avaliação do percentual de neutrófilos no LBA de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos;(B) Imagem de um esfregaço de LBA de um cavalo com obstrução recorrente das vias aéreas com neutrofilia na avaliação inicial ou dia 0, destacando neutrófilos; (C) Avaliação do percentual de macrófagos no LBA de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral (Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos; (D) Imagem de um esfregaço de LBA destacando macrófagos alveolares de um cavalo com obstrução recorrente das vias aéreas; (E) Avaliação do percentual de linfócitos no LBA de animais com obstrução recorrente das vias aéreas tratados com instilação traqueal de células mononucleares derivadas da medula óssea (Gcel) e dexametasona oral

(Gdex), avaliados sete e 21 dias após o início dos tratamentos; (F) Imagem de um esfregaço de LBA destacando linfócitos de um cavalo com obstrução recorrente das vias aéreas;



4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, testou-se a hipótese de que células mononucleares derivadas da medula óssea podem, a exemplo do observado em modelo de camundongos asmáticos (Abreu et al., 2011; Cruz et al., 2012; Abreu et al., 2013), apresentar efeito benéfico em quadro inflamatório pulmonar em cavalos com ORVA (asma dos cavalos), o que não se tem conhecimento de ter sido reportado anteriormente. A fonte de medula óssea escolhida foi o esterno pela facilidade e qualidade de obtenção, pois embora a crista ilíaca seja uma fonte confiável de CMNDMO de equinos, em cavalos de meia-idade é mais recomendado a aspiração no esterno (Delling et al., 2012), podendo ser procedida em múltiplas punções da mesma esternébra, sendo o mais indicado aspirar entre 4º e 6º esternébra (Kasashima et al., 2011).

A quantidade de células mononucleares instilada foi estipulada entre 500 milhões e 1 bilhão de células, e foi estabelecida baseada em parâmetros de terapia celular em tendões de equinos, que usa uma dose a partir de 10 e 20 milhões (Godwin et al., 2012; Schnabel et al., 2013) e na terapia celular humana, que para tratar casos graves de isquemia em membros, usa cerca de 1,7 bilhões de células (Murphy et al., 2011). Como não se tem referência em terapia celular em vias aéreas de equinos, é possível que a quantidade de células, bem como o número de aplicações sofra variações com o avanço científico e a obtenção de maiores esclarecimentos a respeito.

A quantidade desejada de medula óssea para se conseguir o número estabelecido de células foi 200 mL, obtida sem dificuldade, o que possibilitou utilizar uma grande quantidade de células em um processo rápido que dispensou o cultivo celular, resultando em tratamento economicamente mais acessível em relação ao uso de células-tronco. Houve, porém, uma grande redução do número de células mononucleares no isolamento, restando apenas 9% \pm 2% do valor inicial de células viáveis, onde outros autores encontraram uma média de recuperação de células mononucleares derivadas da medula óssea de 44,0% \pm 30,0% tendo o esterno como fonte e 43,0% \pm 29,0% tendo a crista ilíaca (Adams et al., 2013). Provavelmente isso ocorreu por diferenças de protocolos, possivelmente pela falta da filtragem da medula óssea logo após a coleta, etapa que não foi procedida no presente estudo, e/ou baixa dose de anticoagulantes empregada, já que os equinos possuem alta taxa de

agregação celular, aderindo às mononucleares e reduzindo sua taxa de isolamento (Alves et al., 2009).

Após o descongelamento, o percentual de recuperação das células foi de 54% \pm 14% de células biologicamente ativas, os outros 46% ficam retidos na malha de filtragem ou morrem durante o processo. Não se tem definidos parâmetros de recuperação após o descongelamento, em equinos. Em humanos, o percentual de recuperação após o descongelamento é de aproximadamente 75,4% \pm 13,0% (Rowley et al., 1994). Entretanto, a viabilidade das células foi de 93,24% \pm 3,84, o que foi superior aos valores encontrados em outros trabalhos com cerca de 86% de viabilidade celular após o descongelamento (Alves et al., 2009; Ribeiro et al., 2012). Embora tenha havido algumas quebras no processamento das células mononucleares, o número de células viáveis obtidas no final de todo o processo e destinadas ao transplante permitiu executar a terapia celular na dose estipulada inicialmente.

Os animais em ambos os grupos apresentaram o fenótipo de ORVA com manifestação clínica da doença, e embora testes de avaliação da função pulmonar, ou de nível de O² e CO², não tenham sido executados, demonstrou-se anteriormente que animais com escore elevado de ruídos respiratórios anormais e tosse, tiveram redução acentuada da PaO² (Rettmer et al., 2014), sugerindo que a indução da manifestação clínica da ORVA, pelo aumento no escore clínico estabelecido, resultou em comprometimento da troca gasosa nos animais investigados, no momento prévio ao início dos tratamentos. Portanto, procurou-se a avaliação criteriosa dos animais, realizada por dois profissionais experientes, através do escore clínico descrito por Tesarowski et al. (1996). Os animais do presente estudo, foram aleatoriamente distribuídos para um dos grupos de tratamento quando chegaram no escore clínico desejado mínimo de 10.

A confirmação do diagnóstico de ORVA deu-se pela avaliação endoscópica, observando a graduação de muco traqueal (Gerber et al., 2004) e a quantidade percentual de neutrófilos. Com relação à quantidade de muco traqueal, observou-se alterações importantes no aspecto das vias aéreas inferiores, como a presença de muco e sua localização e coloração durante o quadro inflamatório da ORVA. O esforço respiratório, a tosse e a dilatação das narinas também estiveram presentes nos animais induzidos que desenvolveram o quadro da doença e foram fortemente associados com a inflamação das vias aéreas em outros cavalos com ORVA. Dessa

maneira os sinais clínicos e os achados endoscópicos foram conjugados ao histórico dos animais, bem como o percentual de neutrófilos >25% no LBA. (Leclere et al.,2011).

A sedação com xilazina durante a terapia celular foi uma opção utilizada para proporcionar conforto aos animais, já que esta confere relaxamento da musculatura lisa e broncodilatação, conferindo uma maior capacidade de ventilação pulmonar (Watney e Hall, 1988), ao mesmo tempo que manteve os cavalos cooperativos e sem tosse durante o tratamento, assegurando que toda a dose instilada permanecesse nas vias aéreas inferiores.

O LBA, procedido após a avaliação endoscópica, foi mensurado e comparado em todos os tempos e tratamentos, demonstrando que não houve diferença no volume recuperado assim como não houve diferença significativa na contagem diferencial de células assim como encontrado por outros autores (Michelottoet al. 2010), contrariando outros estudos, onde quanto mais grave a enfermidade inflamatória pulmonar, menor o volume de LBA recuperado (Miskovic et al., 2007; Hoffman 2008 Koblinger et al., 2011).

O macrófago alveolar tem um importante papel no desenvolvimento do fenótipo da ORVA, e sua ativação ao entrar em contato com o alérgenos éo que desencadeia a resposta inflamatória (Laan et al., 2006), promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias que entre outras atividades atrai os neutrófilos (Joubert et al., 2011; Laan et al., 2006). Muito embora o número de macrófagos tenha aumentado, isso não significa que o grau de atividade fagocitária também tenha aumentado, sendo possível que apesar do maior número de macrófagos, os mesmos não estivessem ativados (Laan et al., 2006; Aharonson-Raz, 2012). O que se sabe é que houve um retorno do perfil celular ao que é considerado normal de um animal com o ambiente pulmonar saudável, evidenciado em ambas as terapias investigadas, de forma bastante equiparada, sugerido que este ambiente estivesse sofrendo um processo de remissão da doença, já que os macrófagos são as células mais abundantes no pulmão saudável (Lessa et al., 2007; Michelottoet al. 2010).

A neutrofilia $\geq 25\%$ (De Luca et al., 2008) nas avaliações dos dias 0 chegaram ao percentual de $53,2 \pm 14,2$ no Gdex e de $63,0 \pm 10,0$ no Gcel,o que além do quadro inflamatório, denota um quadro grave da doença. Esse perfil celular foi modificando ao longo do experimento denotando um quadro leve de inflamação pulmonar, onde o

número de neutrófilos ficou entre 5 e 25% (Koblinger et al. 2011; Kutasi et al., 2011; Fernandez et al., 2013).

O percentual de linfócitos considerado normal em fluidos broncoalveolares pode variar muito nos cavalos, sendo considerado normal até 35% (Robinson 2001), como em ambos os grupos, não havendo diferenças significativas entre os dias ou os tratamentos.

Embora na maioria dos cavalos acometidos por ORVA, a remissão clínica possa ser alcançada mantendo os cavalos no pasto para reduzir a sua exposição a alérgenos, isso muitas vezes não é possível devido a atividade desportiva, ou nem sempre é significativa (Jackson et al., 2000). Portanto, os animais de ambos os grupos foram mantidos estabulados, tendo o manejo alterado de forma a reduzir o contato com alérgenos retirando-se os alimentos que possuem maior quantidade de poeira, o que pode ter aumentado o resultado benéfico dos tratamentos (Laan et al., 2006).

Além do diagnóstico precoce da ORVA, um tratamento adequado é fundamental. Muito embora haja uma melhora significativa com a terapia sistêmica com dexametasona oral, sabe-se que os efeitos adversos dos corticoides podem colocar o paciente em risco (Dauvillier et al., 2011; De Luca et al., 2008). Portanto, o aprimoramento de outras terapias é fundamental como alternativa aos corticoides, tanto para os cavalos, como para as pessoas com asma. A terapia celular tem seus efeitos benéficos estudados em modelos de doença respiratória alérgica, mas não havia sido demonstrada em cavalos. Desta forma, os efeitos deletérios apresentados pelos corticoides podem ser evitados, ou minimizados no caso do uso conjunto de ambas, o que não foi investigado no presente estudo.

4.5 CONCLUSÃO

Como o proposto por este estudo, a terapia com células mononucleares a partir da medula óssea foi benéfica, atenuando o quadro inflamatório em cavalos com obstrução recorrente das vias aéreas, comparando-se aos efeitos da dexametasona. Abre-se um novo caminho terapêutico, através da terapia celular, para as doenças crônicas das vias aéreas de equinos, necessitando-se de mais estudos a fim de se entender melhor e identificar seus mecanismos.

CAPÍTULO 5

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) é uma enfermidade respiratória crônica dos equinos e causadora de limitações à prática esportiva, bem como depreciadora da qualidade de vida do paciente. Em muito se conseguiu evoluir nos moldes tradicionais de tratamento, nenhum deles no entanto, foi capaz de proporcionar melhora contínua e/ou regressão dos danos causados pela enfermidade, principalmente no que se refere ao remodelamento pulmonar.

Estamos apenas iniciando um trabalho, que concomitantemente vem sendo feito em outros modelos como camundongos e ratos. O cavalo porém é um portador natural da doença, e, assim como os seres humanos manifesta sinais da asma, o que pode ser acompanhado pelas avaliações clínicas, fazendo com que resultados obtidos de seus estudos possam ser utilizados como testes pré-clínicos.

Embora testes de função pulmonar não tenham sido realizados neste estudo, alguns autores citam que um histórico detalhado do animal, assim como os exames clínicos bem realizados, possibilitam chegar ao diagnóstico de ORVA com coerência, permitindo destinar um tratamento adequado à doença e possibilitando uma interrupção do processo inflamatório, sem que este se perpetue e cause danos irreversíveis.

Como nem sempre os exames complementares são possíveis de serem realizados, antes que haja um agravamento do quadro com comprometimento do epitélio pulmonar, sendo possível indicar um tratamento baseado nos sinais e nos critérios de gravidade clínica (Leclere al., 2011)

Abrem-se algumas alternativas terapêuticas que são pouco exploradas ainda, como a terapia celular com células mononucleares derivadas de medula óssea, que no caso deste projeto, dispensou o cultivo, reduzindo os custos e tornando-a mais acessível. A terapia celular vem sendo difundida em muitas frentes, e aqui em especial, tínhamos a perspectiva de melhora do quadro clínico com a modulação da resposta inflamatória no ambiente em que se instala.

Como resultados tanto a terapia com dexametasona quanto a terapia celular demonstraram decréscimo do esforço respiratório que se manteve entre sete e 21 dias,

e decréscimo no escore de Tesarowski e autores (1996), que foi progressivo ao longo dos períodos, equiparando ambas as terapêuticas nestes quesitos.

Fatores relacionados ao aspecto do muco como localização, coloração e viscosidade mudaram da avaliação inicial à final, porém isso não foi significativo no grupo que recebeu a terapia celular. Houve porém uma redução acentuada da neutrofilia no LBA, obtida com êxito. O restabelecimento do número de macrófagos alveolares também foi um passo importante, fazendo com que esse tipo celular voltasse a ser predominante no LBA.

As terapias tiveram efeitos semelhantes na maioria dos aspectos avaliados, estabelecendo um novo caminho para pesquisas em terapia celular nas vias aéreas de equinos e humanos.

Ainda não compreendemos o quão duradouro será o efeito da terapia com células mononucleares, assim como nos é insuficiente o conhecimento da sua efetividade na involução da doença e na regeneração do trato respiratório inferior. Portanto, deixamos um vasto caminho a ser explorado pela nossa equipe de trabalho e por todos os demais que queiram imergir neste tema.

REFERÊNCIAS

Abreu SC, Antunes MA, Pelosi P, Morales MM, Rocco PRM. Mechanisms of cellular therapy in respiratory diseases. *Respiratory physiology & neurobiology* 2011;37:1421-1431.

Abreu SC, Antunes MA, de Castro JC, de Oliveira MV, Bandeira E, Ornellas DS, Rocco PR. Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma. *Respiratory physiology & neurobiology*, 2013;187:190-198.

Abreu SC, Antunes MA, Pelosi P, Morales MM, Rocco PRM. Mechanisms of cellular therapy in respiratory diseases. *Intensive Care Medicine* 2011;37:1421-1431.

Adams MK, Goodrich LR, Rao S, Olea-Popelka F, Phillips N, Kisiday JD, McIlwraith CW. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences? *Equine Veterinary Journal*. 2013;45:372-375.

Aharonson-Raz K, Lohman KL, Townsend HG, Marques F, Singh B. Pulmonary intravascular macrophages as proinflammatory cells in heaves, an asthma-like equine disease. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012;303:189-198.

Alves RDSA, Vianna FDAF, de Castro Pereira CA. Fenótipos clínicos de asma grave. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2009;34:646-653.

Alves ALG, Vieira, EM, Barreira APB, da Mota, LS, Saito ME, Kohayagawa A, de Oliveira PG. Protocolo De Isolamento De Células Mononucleares De Medula Óssea De Equinos. *Veterinária e Zootecnia*, 2012;16:650-655.

Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield Chabaud MA, Le Blanc CHorohov DW. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002;87:385–389.

Bunting MM, Shadie AM, Flesher RP, Nikiforova V, Garthwaite L, Tedla N, Kumar R K. Interleukin-33 drives activation of alveolar macrophages and airway inflammation in a mouse model of acute exacerbation of chronic asthma *BioMed research international*. 2013;2013.

Canning BJ, Woo A, Mazzone SB. Review Article. Neuronal Modulation of Airway and Vascular Tone and Their Influence on Nonspecific Airways Responsiveness in Asthma. *Journal of Allergy*. 2012;2012.

Carter-Arnold JL, Neilsen NL, Amelse LL, Odoi A, Dhar MS. In vitro analysis of equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates differences within age-and gender-matched horses. *Equine Veterinary Journal*. 2014.

Carvalho VO, Souza GEC. O estetoscópio e os sons pulmonares: uma revisão da literatura. *Revista de Medicina*. 2007; 86:224-31.

Couëtil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JLN, Lavoie JP. Inflammatory airway disease of horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007;21:356–361

Cruz FF, Antunes MA, Abreu SC, Cruz FF, Antunes MA, Abreu SC, Fujisaki LC, Silva JD, Xisto DG, 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

Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem cells translational medicine*. 2012;1:403-408.

Dauvillier J., Felipe MJB, Lunn DP, Lavoie-Lamoureux A, Leclère M, Beauchamp G. and Lavoie J. P. Effect of Long-term Fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011;25:549–557.

DeLuca L, Erb HN; Young JC, Perkins GA, Ainsworth DM. The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stable horses affected with recurrent airway obstruction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008;22:427-435.

Deaton CM, Deaton L, Jose-Cunilleras E, Vincent TL, Baird AW, Dacre K, Marlin DJ. Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse. *Journal of Applied Physiology*. 2007;102:1071-1077.

Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2005;105:25-31.

Delling U, Lindner K, Ribitsch I, Jülke H, Brehm W. Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2012;76:52.

Durando MM, Zarucco L, Schaer TP, Ross M, Reef VB. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Veterinary Education*. 2006;18:75-79.

Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunningham FM. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clinical Experimental Allergy*. 1993;23:821-828.

Fernandez NJ, Hecker KG, Gilroy CV, Warren AL, Léguillette R. Reliability of 400-cell and 5-field leukocyte differential counts for equine bronchoalveolar lavage fluid. *Veterinary Clinical Pathology*. 2013;42:92-98.

Firinci F, Karaman M, Baran Y, Bagriyanik A, Ayyildiz ZA, Kiray M, Karaman O. Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma. *International immunopharmacology*. 2011;11:1120-1126.

Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, Imhof A, Tahon L; Robinson NE. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal*. 2004;36:576-582.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*. 2008;103:1204-1219.

Grainge CL, Davies DE. Epithelial Injury and Repair in Airways Diseases Epithelial Injury and Repair in Airways Diseases. *CHEST Journal*. 2013;144:1906-1912.

Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RKW. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*. 2012;44:25-32.

Gupta N, Su X, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary administration of mesenchymal stem cells reduces LPS induced acute lung injury and mortality. *The Journal of Immunology*. 2007;179:1855-1863.

Herszberg B, Ramos-Barbón D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;118:382-388.

Hodgson DR, Davis RE, McConaghy FF. Thermoregulation in the horse in response to exercise. *British Veterinary Journal*. 1994;50:219-235.

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

Hoshino H, Laan M, Sjöstrand M, Lötvall J, Skoogh BE, Lindén A. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;105:143-149.

Jackson CA, Berney C, Jefcoat AM, Robinson NE. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine veterinary journal*. 2000;32:432-438.

Jackson KA, Stott JL, Horohov DW, Waston JL. IL-4 induced CD23 (FcεRII) up-regulation in equine peripheral blood mononuclear cells and pulmonary alveolar macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004;101:243-250.

Joubert P, Cordeau M E, Lavoie J P. Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages varies with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011;142:236-242.

Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RKW. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine veterinary journal*. 2011;43:288-294.

Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology Therapy*. 2006;111:476-494.

Kirschvink N, Moffarts B, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*. 2008;177:178-191.

Koblinger K, Nicol J, McDonald K, Wasko A, Logie N, Weiss M, Léguillette R. Endoscopic assessment of airway inflammation in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011;25:1118-1126.

Koblinger K., Hecker K, Nicol J, Wasko A, Fernandez N, Léguillette R. Bronchial collapse during bronchoalveolar lavage in horses is an indicator of lung inflammation. *Equine veterinary journal*. 2014;46:50-55.

Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. (2011). Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Engineering Part A*. 2011;17:2199-2212.

Kutasi O, Balogh N, et al. Diagnostic Approaches for the Assessment of Equine Chronic Pulmonary Disorders. *Journal of Veterinary Science*. 2011;31:400-410.

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

Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Quessy S, Martin JG, Lavoie JP. Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2012;146:35-45.

Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid Q. A Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164:1410-1413.

Leclere M, Lefebvre-Lavoie G, Beauchamp G, Lavoie J. P. Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Veterinary Journal*.2010;42:316-321.

Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*. 2011;16:1027–1046.

Léguillette R. Recurrent Airway Obstruction – heaves. *Veterinary Clinics of North America*.Equine. 2003;19:63-86.

Lessa DAB, Mori E, Viana EB, Santos OJD, Moreira JFE, Fernandes WR. Lavado broncoalveolar em eqüinos: revisão de literatura parte 2: achados citológicos; Bronchoalveolar lavage in horses: review of the literature: part 2: cytological findings; Lavado broncoalveolar en equinos: revisión de literatura: Parte 2: hallazgos citológicos. *Arquivo ciência veterinária e zoologia*. UNIPAR. 2007;10:31-38.

Marinkovic D, Kovacevic SA, Plamenac P. Cellular basis of chronic obstructive pulmonary disease in horses. *International Review of Cytology*. 2007;257:213-247.

Marr KA, Foster AP, Lees P, Cunningham FM, Page CP. Effect of antigen challenge on the activation of peripheral blood neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Research in Veterinary Science*. 1997;62:253-260.

Michelotto Junior PV, Lessa DAB, da Silva KM, Gawlowski KRS, Fernandes WR. The airway fluid analysis—methods and interpretation for the athletic horse. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 2013;20.

Michelotto PV, Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EWR, Fernandes LC, 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;24:414–419.

Michelotto Júnior PV. Alterações no aspirado/lavado traqueal e no lavado broncoalveolar decorrentes da prática desportiva. Palestra: IX Conferência Anual da ABRAVEQ. São Paulo, 2008.

Millerick-May ML, Karmaus W, Derksen FJ, Berthold B, Holcombe SJ, Robinson NE. Horse–environment interaction: the relationship between environmental particulate matter and airway inflammation in thoroughbred racehorses. Proceedings of the 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. 2008;54.

Miskovic M, Couetil LL, Thompson CA. Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway obstruction maintained in low-dust environments. Journal of veterinary internal medicine. 2007;21:1060-1066.

Molet S, Hamid Q, Davoineb F, Nutku E, Tahaa R, Pagé N, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2001;108:430-438.

Morrison T, McAuley DF, O'Kane C, Matthay MA. S39 Human mesenchymal stem cells modulate alveolar macrophage polarisation In vivo and in vitro. Thorax. 2013;68:A22-A22.

Muehlmann LA, Michelotto Junior PV, Nunes EA, Grando FCC, SilvaFT, Nishiyama A. PAF increases phagocytic capacity and superoxide anion production in equine alveolar macrophages and blood neutrophils. Research in Veterinary Science. 2012;93:393-397.

Mullane K. Asthma translational medicine: Report card. Biochemical Pharmacology. 2011;82:567-585.

Murphy MP, Lawson JH, Rapp BM, Dalsing MC, Klein J, Wilson MG, Hutchins GD, March KL. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy is safe and promotes amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. Journal of Vascular Surgery. 2011;53:1565-1574.

Muschler GF, Boehm C, Easley K. (1997). Aspiration to Obtain Osteoblast Progenitor Cells from Human Bone Marrow: The Influence of Aspiration Volume. J Bone Joint Surg Am 1997; 79(11): 1699-1709.

Nemeth K, Keane-Myersc A, Brownc JM, Metcalfec DD, Gorhamd JD, Bundoccc VG, Hodgesc MG, Jelinekel S, Madalac S, Karpatib S, Mezeya E. Bone marrow stromal cell sure TGF- β to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed induced asthma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107:5652-5657.

Niedzwiedz A, Jaworski Z, Tykalowski B, Smialek M. Neutrophil and macrophage apoptosis in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with recurrent airway obstruction (RAO). *BMC veterinary research*, v. 10, n. 1, p. 29, 2014.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:8407-8411.

Pacheco AP, Paradis MR, Hoffman AM, Hermida P, Sanchez A, Nadeau JA, Mazan MR. Age effects on blood gas, spirometry, airway reactivity, and bronchoalveolar lavage fluid cytology in clinically healthy horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2014;28:603-608.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*. 1981;46:211-226.

Pirie RS. Recurrent airway obstruction: A review. *Equine Veterinary Journal*. 2014;46:276-288.

Racine J, Gerber V, Feutz MM, Riley CP, Adamec J, Swinburne JE, Couetil LL. Comparison of genomic and proteomic data in Recurrent Airway Obstruction affected horses using Ingenuity Pathway Analysis. *BMC Veterinary Research*. 2011;7:48.

Rettmer H, Hoffman AM, Lanz S, Oertly M, Gerber V. Owner-reported coughing and nasal discharge are associated with clinical findings, arterial oxygen tension, mucus score and bronchoprovocation in horses with recurrent airway obstruction in a field setting. *Equine Veterinary Journal*. 2014.

Robinson N. E. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University. *Equine Veterinary Journal*. 2001;33:5-19.

Rowley SD, Bensinger W I, Gooley TA, Buckner CD. (1994). Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood*. 1994;83:2731-2736.

Schuijs MJ, Willart MA, Hammad H, Lambrecht BN. Cytokine targets in airway inflammation. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13:351-361.

Schnabel LV, Fortier LA, Wayne McIlwraith C, Nobert KM. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when?. *The Veterinary Journal*. 2013;197:570-577.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma – 2012. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2012;38:S1-S46.

Souza LCG, Carvalho, KATD, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, Miyague N, Francisco JC, Olandos M, Woitowicz V, Simeoni R, Faria-Neto JR, Brofman P. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2005;20:270-8.

Spiteri MA, Knight RA, Jeremy JY, Barnes PJ, Chung KF. Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by in vitro allergen exposure in bronchial asthma. *European Respiratory Journal*. 1994;7:1431–1438.

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

Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Ferraro GL, Galuppo LD, Leach JK, Owens SD, Yellowley CE. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *American Journal of Veterinary Research*. 2010;71:1237-1245.

Venugopal C, Mariappan N, Holmes E, Kearney M, Beadle R. Effect of potential therapeutic agents in reducing oxidative stress in pulmonary tissues of recurrent airway obstruction-affected and clinically healthy horses. *Equine Veterinary Journal*. 2013;45:80–84.

Watney GCG, Hall LW. Effects of xylazine and acepromazine on bronchomotor tone of anaesthetized ponies. *Equine Veterinary Journal*. 1988;20:185-188.

Erck-Westergren EV, Franklin SH, Bayly AM. Respiratory diseases and their effects on respiratory function and exercise capacity. *Equine Veterinary Journal*. 2013;45:376-387

Alberts B, Johnson A, et al. *Biologia molecular da Célula*. 5ª ed. Porto Alegre, Artmed; 2010.

Carlton WW and McGavin MD. Patologia veterinária especial de Thomson, 2nded. Porto Alegre: Artmed; 1998.

Gonçalves RC, *in* Feitosa FLF. Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico. 3ed. São Paulo; Roca; 2012.

McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J. Equine Respiratory Medicine and Surgery, 1st ed. Holanda; Saunders Elsevier; 2007.

Reece WO. Dukes fisiologia dos animais domésticos. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; Roca; 1996.

GINA publications reviewed 2012. Disponível em: www.ginasthma.org

Fortes Júnior WFF. Citologia Pulmonar De Eqüinos (*Equus caballus*) em situação de manejo estrito a campo e estabulados. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná: 2005.

Michelotto Junior, PV. Efeitos do desafio ambiental e do exercício na funcionalidade dos macrófagos do lavado broncoalveolar de cavalo puro sangue inglês de corrida. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná: 2010.

Pinto RMC. Caracterização clínica e inflamatória de pacientes portadores de asma grave controlada e não controlada e resposta ao acompanhamento sistemático e tratamento padronizado. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo: 2010.

APÊNDICE A

FICHA CLÍNICA EXAME RESPIRATÓRIO

Proprietário:			
Nome do animal:			
Data e hora:			
EXAME GERAL			
Comportamento: () normal () deprimido ()		Grau de escore corporal: () -5/1	
Posição: () estação () decúbito esternal intermitente/ constante () decúbito abdominal intermitente/ constante			
Ingestão de alimentos: () normal () inapetência () anorexia			
FC:	FR:	Temperatura corporal:	TPC
Pele: () Urticária () Lesões de Alopecia () Descamação		Local da lesão:	
OPG:			
AVALIAÇÃO AMBIENTE			
Tamanho cocheira: largura x profundidade x altura			
Cama: () serragem () sepilho () feno			
Cheiro cocheira () agradável () odor de urina () odor muito forte de urina			
Poeira e sujeira cocheira () limpa () pouca poeira () muita poeira () muito suja			
ALIMENTAÇÃO			
Aveia: () sim () não () achatada () molhada			
Ração Peletizada: () sim () não		Feno de Gramínea: () sim () não	
Alfafa fenada: () sim () não		Capim frescom: () sim () não	
EXAME ESPECIAL DO TRATO RESPIRATÓRIO			
Características da Respiração			
Amplitude: () normal () superficial () profunda	Tipo: () costal () abdominal	Modo: () eupnéia () dispnéia () inspiratória () expiratória () mista	OBS:
Postura: () normal () ortopnéica () cabeça/pescoço distendidos () respiração bucal () intermitente () constante		Secreção nasal: () não () sim () Grau: () -β) (1) () direita () esquerda serosa () () mucosa () () purulenta () ()	
Tosse espontânea () não () sim () superficial () seca () profunda () úmida		Reflexo de Tosse () não () sim () superficial () seca () profunda () úmida	
Ar expirado: () direita temperatura: () normal () aumentada fluxo: () normal () diminuído odor: () normal () alterado		e esquerda () normal () aumentada () normal () diminuído () normal () alterado.....	
Mucosa nasal: () direita () esquerda () normal () normal () hiperemia- grau () (13) () hiperemia grau () (13)		Muflo: () normal () ressecado () fissuras	
Estridor LaringeTraqueal: () ausente () presente () inspiração () expiração () tipo	Laringe/Traqueia	Palpação () normal () sensível (3) () frêmito traqueal (-3) () Crepitação (-3)	Auscultação RLT () normal () aumentado (3) () diminuído(-3)
	RTB ²	() normal () aumentado (3) () diminuído (-3)	() direito  () esquerdo 
	RBB ³	() normal () aumentado (3) () diminuído (-3)	() direito  () esquerdo 

FICHA CLÍNICA EXAME RESPIRATÓRIO

AUSCULTAÇÃO	CREPITAÇÃO GROSSA	<input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente (#)		<input type="checkbox"/> direito	<input type="checkbox"/> esquerdo
	CREPITAÇÃO FINA	<input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente (#)		<input type="checkbox"/> direito	<input type="checkbox"/> esquerdo
	SIBILO	<input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente (#)		<input type="checkbox"/> direito	<input type="checkbox"/> esquerdo
	RONCO	<input type="checkbox"/> ausente	<input type="checkbox"/> presente (#)		
	PROPAGAÇÃO CARDÍACA	<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> aumentada (13)		<input type="checkbox"/> direito	<input type="checkbox"/> esquerdo
PERCUSSÃO	<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> Timpânico <input type="checkbox"/> Submaciço <input type="checkbox"/> Macicez horizontal		<input type="checkbox"/> direito	<input type="checkbox"/> esquerdo	

TRATADO PELA ÚLTIMA VEZ EM:

ENDOSCOPIA

Narinas: _____

Faringe:: _____

Hiperplasia Folicular Linfóide: () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5

Laringe: _____

Tamanho da Epiglote () normal () hipoplásico

Forma da Epiglote () normal () desvio axial

Aritenóides (neurolaringopatia): () 1 () 2 () 3 () 4

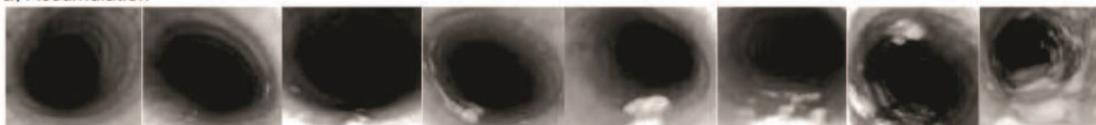
Traquéia: _____

Sangue : () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5

Espessura carina: () 0 () 1 () 3

OBS:

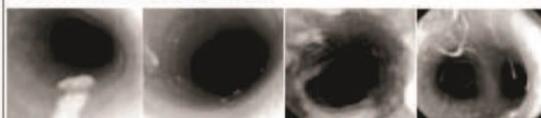
a) Accumulation



0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 3 1 2 3 4 5 6 7 8 9 4 1 2 3 4 5 6 7 8 9 5

None Little Moderate Marked Large Extreme
 Clean, singular Multiple small blobs Larger blobs Confluent Stream-forming Pool-forming Profuse amounts

b) Localisation and stickiness



1 2 4 6 8 2 2 4 6 8 3 2 4 6 8 4 2 4 6 8 5

Ventral Lateral Dorsal Threading

c) Apparent viscosity

1 2 4 6 8 2 2 4 6 8 3 2 4 6 8 4 2 4 6 8 5
 V. fluid Fluid Intermediate Viscous V. viscous

d) Colour

1 2 4 6 8 2 2 4 6 8 3 2 4 6 8 4 2 4 6 8 5
 Yellow White Colourless

APÈNDICE B

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 (tubular sound)	0																		
	audible ventral and dorsal sounds	2																		
Crackles	none	0																		
	present	2																		
Wheezes	none	0																		
	present	2																		
Cough	none	0																		
	intermittent	1																		
	paroxysmal	3																		
Thoracic resonance	normal lung field	0																		
	expanded dorsl and ventral lung fields	2																		
TOTAL	25																		

Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume

V. GERBER*†‡, R. STRAUB‡, E. MARTI‡, J. HAUPTMAN#, C. HERHOLZ‡, M. KING‡, A. IMHOF‡, L. TAHON‡ and N. E. ROBINSON†

†Pulmonary Laboratory, Department of Large Animal Clinical Sciences and #Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Michigan State University, E. Lansing, USA; ‡Equine Clinic and Division of Clinical Immunology, Department of Clinical Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland; and §Pulmonary Research Group, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

Keywords: horse; endoscopy; scoring; mucus; RAO; COPD; IAD

Summary

Reasons for performing study: Endoscopic scoring of airway mucus quantity and quality has not been critically assessed.

Objectives: To evaluate mucus scores for 1) observer- and horse-related variance and 2) association with inflammation, mucus viscoelasticity and measured volume.

Methods: Variance of scoring within and between observers and over time within horses were determined for airway mucus accumulation, apparent viscosity, localisation and colour, and correlations of mucus accumulation scores with neutrophil ratios in secretions. The relationship of accumulation score to measured volumes of 'artificial mucus' was investigated. Correlations of mucus accumulation, apparent viscosity and colour scores with measured viscoelasticity were tested. Viscoelasticity was compared between tracheal secretion samples collected ventrally and dorsally.

Results: Mucus accumulation scoring showed excellent interobserver agreement and moderate horse-related variance, was related to measured volumes of 'artificial mucus', and correlated well with neutrophilic airway inflammation. Scores of mucus viscosity, colour and localisation showed high observer-related variance. Mucus accumulation, apparent viscosity and colour scores did not correlate with measured tracheal mucus viscoelasticity, but dorsally-localised mucus showed 2-fold higher measured viscoelasticity than ventrally-localised samples.

Conclusions: Mucus accumulation scores are a reproducible measure of mucus volumes in the trachea.

Potential relevance: Endoscopic scoring of mucus accumulation is a reliable clinical and research tool. In contrast, apparent viscosity, localisation and colour scores should be interpreted with caution.

Introduction

Endoscopy is an important tool for both clinical work-up and scientific investigation of equine lower airway disease. Endoscopic

scoring systems have been used for subjective, semiquantitative assessment of accumulation (Dieckman 1987; Dixon *et al.* 1995; Gerber *et al.* 2003b, 2004) and appearance (Dieckman 1987; Herholz *et al.* 2002; Gerber *et al.* 2003b) of airway secretions.

However, both the observer and the subject may be important sources of variance in such scoring systems. For example, 'a few' vs. 'many' mucous blobs may not mean the same to different observers, or a horse may cough before an endoscopic examination and thereby momentarily clear mucus from its trachea. Moreover, relationships between subjective endoscopic scoring variables (e.g. accumulation and apparent viscosity scores) and corresponding measured variables (e.g. mucus volume and viscoelasticity) are unknown. The lack of validation of endoscopic mucus scores makes interpretation of results, comparison between studies and communication between clinicians difficult and uncertain.

The goal of the present study was to evaluate the validity of endoscopic scores used to assess mucus accumulation and character. Specifically, we asked the following questions:

1. Does intra- and interobserver variance limit the usefulness of endoscopic scores?
2. How much do endoscopic scores vary within a horse over the course of a day?
3. Does mucus accumulation score correlate with neutrophilic airway inflammation?
4. Does mucus accumulation score correlate with measured mucus volumes?
5. Do accumulation, apparent viscosity and colour scores correlate with measured viscoelasticity?
6. Is the viscoelasticity of tracheal mucus related to its localisation?

Materials and methods

Definitions

In this paper, the terms '(mucus) accumulation' and '(airway or tracheal bronchial) secretions' are used interchangeably to

*Author to whom correspondence should be addressed.

[Paper received for publication 05.08.03; Accepted 22.12.03]

describe the gel-like mucous secretions with all their components. The horses with recurrent airway obstruction (RAO) that were used in this study consistently developed respiratory distress (increased breathing effort and rate) and cough when stabled and exposed to hay, in accordance with workshop consensus definitions (Anon 2001). Inflammatory airway disease (IAD) in this paper does not refer to the condition in young racehorses but to older 'chronic coughers', in accordance with an expanded definition proposed at the International Workshop on IAD (Anon 2003). When stabled and exposed to hay, the IAD-affected horses coughed but did not develop clinically manifest respiratory distress, while the healthy control horses showed no clinical signs. All horses in the study showed no clinical signs when at pasture and/or in low-dust indoor environment (peat moss bedding and haylage feeding). Experimental studies were approved by respective university committees for animal use of the University of Berne and Michigan State University.

Overview of experimental protocols

Questions 1–3 (see *Introduction*) were addressed in the first experimental protocol, Question 4 in the second, Question 5 in the third, and Question 6 in Protocol 4.

Protocol 1:

observer and horse variation and association with airway inflammation: Endoscopic examinations (Olympus CF-0140L) ¹ were performed in 9 horses (2 without clinical signs, 4 with IAD and 3 with RAO; age 9–24 years) in the morning (0 h), afternoon (6 h), evening (12 h) and on the following morning (24 h). One day before and during the experiment, horses were not exercised, kept indoors bedded on shavings and fed concentrate and/or good-quality hay. Each endoscopic examination was recorded on videotape (Sony DVCAM DRS-20MDP) ² and video clips were digitised (DVgate Motion [aquired in .avi] version 2.2.00, DVgate Assemble [converted to .mpeg] version 2.2.00 ²).

Tracheobronchial secretion (TBS) collection was performed at 0, 6, 12 and 24 h by introducing a Teflon-coated PVC catheter through the working channel of the endoscope, instilling 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS) through the catheter in the lower part of the trachea and immediately re-aspirating the PBS mixed with secretions. From the recovered fluid, 100 and 200 µl aliquots were centrifuged for cytospin preparations. At the end of the experiments (24 h), bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected through the working channel of the endoscope, which was wedged in a peripheral bronchus (Derksen *et al.* 1985). Six 50 ml aliquots of PBS were infused into the tube and recovered by suction. The lavaged fluids were pooled and 100 and 200 µl aliquots centrifuged for cytospin preparations. Total cell counts in BALF were performed manually using a hamacytometer. After staining with May-Grünwald-Giemsa, differential cell counts were obtained from TBS and BALF cytospin preparations. Differential cell counts were expressed as percent of total cells by counting 200 cells using standard morphological criteria under a light microscope. Absolute numbers of BALF cells were calculated from total cell counts and the proportion of each cell type.

The digitised video clips of the endoscopic examinations were viewed on personal computer screens and scored for mucus accumulation, apparent viscosity, localisation and colour according to the continuous scales scoring system illustrated in Figures 1a–d. Scoring was performed in randomised order independently by 3 blinded observers, and repeated by each observer at least 3 weeks after the first scoring series.

Protocol 2:

mucus accumulation scores and measured volumes of 'artificial mucus': In order to relate endoscopically scored mucus accumulation to measured volumes of mucus, 'artificial mucus' made from Jell-O ³ (a kind of gelatine) was deposited with a syringe and attached catheter into a full-length excised horse trachea and rinsed before each procedure. The endoscope was introduced into the cranial end of the excised trachea. Increasing volumes of 'artificial mucus' were deposited during

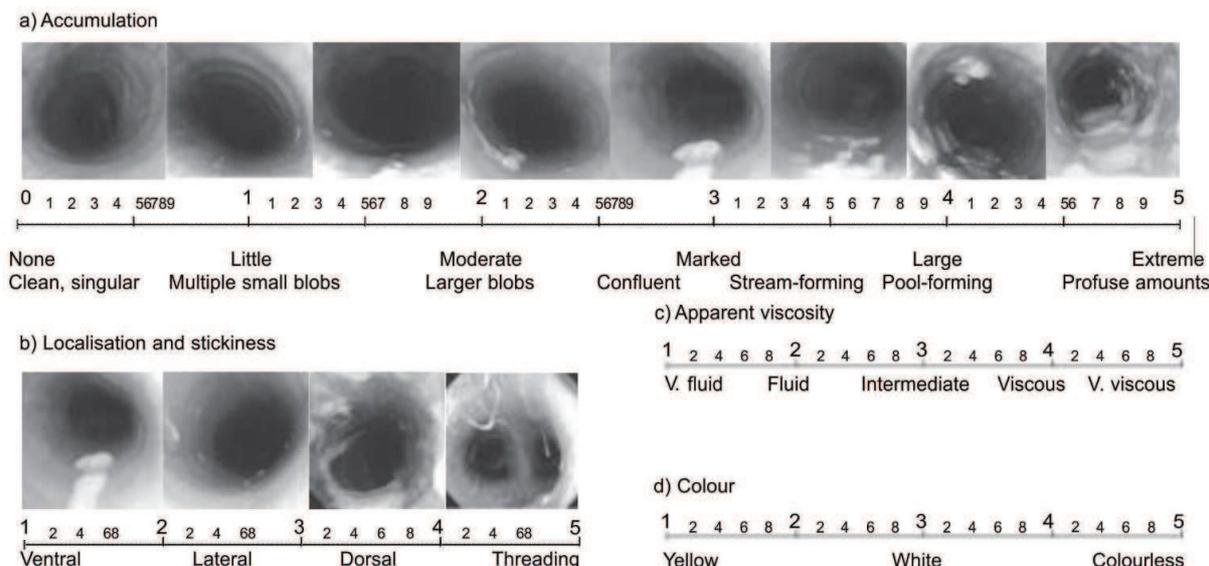


Fig 1: Scoring system for tracheal mucus a) accumulation, b) localisation, c) apparent viscosity and d) colour.

continuous endoscopic observation of the trachea's full length. Deposited volumes (ml) of 'artificial mucus' were recorded when the endoscopically observed accumulation corresponded to scores 0, 0.1, 1, 2, 3, 4 and 5 assessed during the endoscopic procedure by Observer 1 according to Figure 1a. A score of 0.1 was one single small, but endoscopically visible, blob of 'artificial mucus'. The procedure was performed 3 times.

Protocol 3: mucus accumulation, apparent viscosity and colour scores and measured viscoelasticity: Fifty-six endoscopic scores of mucus accumulation, viscosity and colour were correlated to corresponding measurements of mucus viscoelasticity in

clinically healthy and RAO-affected horses in an environmental challenge protocol. Briefly, 7 RAO-affected (age 9–26 years) and 7 healthy control (age 7–26 years) horses were kept at pasture and their diet was supplemented with pellets until they all had no clinical signs of airway obstruction. Endoscopic mucus accumulation, apparent viscosity and colour scores and samples of mucus were obtained at baseline (0 h) and 6, 24 and 48 h after environmental challenge by stabling in stalls with straw bedding and feeding hay. Mucus was obtained from the ventral part of the trachea by means of a cytology brush passed via an endoscope. After sampling, the brush was retracted 2–3 cm into the working channel and the endoscope withdrawn

TABLE 1: Variance attributable to observers (σ^2_O), repetitions (σ^2_R), Time (σ^2_T) and horse (σ^2_H) for mucus accumulation, localisation, apparent viscosity and colour scores

Response variable	Mean	Variance (s.d. ² = σ^2)				Percent of total variance			
		σ^2_O	σ^2_R	σ^2_T	σ^2_H	σ^2_O	σ^2_R	σ^2_T	σ^2_H
Accumulation	2.4	0.12	0.20	0.30	1.28	6	10	16	68
Localisation	2.03	0.10	0.26	0.15	0.32	12	32	17	39
Apparent viscosity	2.66	0.32	0.24	0.07	0.08	45	34	10	11
Colour	3.34	0.38	0.32	0.23	0.16	35	29	21	15

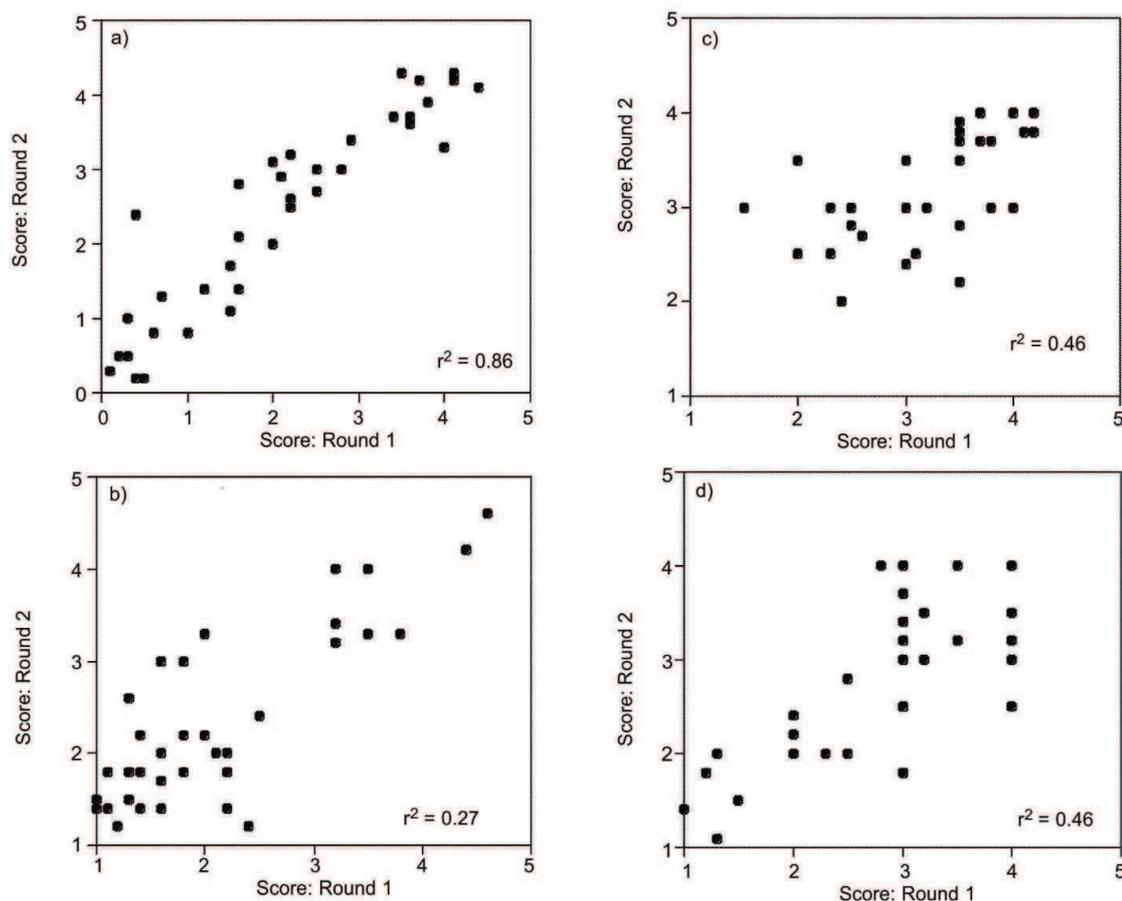


Fig 2: Intra-observer correlations for tracheal mucus a) accumulation, b) localisation, c) apparent viscosity and d) colour scores. Round 1 was the first time that Observer 1 (VG) scored the endoscopic recordings; Round 2 was the repeated scoring 3 weeks after the first round. r^2 = strength of Spearman rank order correlation.

from the animal. The brush was again protruded and mucus removed from the brush to be stored immediately under light mineral oil at -80°C . The magnetic microrheometer technique was used to measure the bulk viscosity and elasticity as described by King and Macklem (1977) and King (1988). Mucus accumulation, apparent viscosity and colour were scored during the endoscopic procedure by Observer 1 (VG) according to Figures 1a, c and d, respectively. Tracheobronchial mucus viscoelasticity data of RAO horses during environmental challenge was presented by Gerber *et al.* (2000). The associations of mucus accumulation, viscosity and colour scores with measured viscoelasticity have not been reported previously.

Protocol 4: mucus viscoelasticity of samples from the ventral and the dorsal trachea: The relationship of the localisation of mucus to its viscoelasticity was investigated by comparing viscoelasticity of samples collected ventrally to samples concurrently collected dorsally in the tracheae of 6 IAD-affected horses (age 5–16 years). A dorsal and a ventral sample each were collected separately in randomised order, stored and analysed as previously described in detail (King and Macklem 1977; King 1988; Gerber *et al.* 2000). We report viscoelasticity ($G^* = \text{vector sum of viscosity and elasticity}$) as $\log G^*$ at 10 radian/sec; dyn/cm^2 .

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using 2 commercial software packages: SigmaStat for Windows, version 2.03S statistical software⁴ and NCSS 6.0.22 statistical analysis and data analysis software⁵. After accepting normal distribution of scored data (Martinez-Iglewicz test for normality), data from Protocol 1 were analysed by means of a 4-way ANOVA according to the model:

$$Y = \mu + H + O + HO + T + HT + OT + \text{Error}$$

where Y was the response variable (e.g. accumulation score), μ was the overall mean, H was the random effect of Horse, O was the random effect of Observer, T was the random effect of Time, HO, HT and OT were interactions of those random factors, and Error was the error due to repetition (within-observer). Variance ($s^2 = \text{standard deviation}^2 = \sigma^2$) was calculated by setting the estimated mean square equal to the mean square calculated by ANOVA, and solving for σ^2 . Because there was no significant effect of time when it was considered a fixed factor, it was considered a random factor for the purpose of calculating σ^2 .

TABLE 2: Spearman rank order correlation coefficients within and between observers

	1	2	3
Accumulation scores (0–5)			
1	0.86; 36	0.85; 36	0.77; 36
2	–	0.88; 36	0.90; 36
3	–	–	0.71; 36
Localisation scores (1–5)			
1	0.27; 36	0.20; 35	0.44; 36
2	–	0.59; 35	0.34; 36
3	–	–	0.58; 36
Apparent viscosity scores (1–5)			
1	0.46; 36	0.08; 36 (NS)	0.42; 36
2	–	0.35; 35	0.03; 36 (NS)
3	–	–	0.44; 36
Colour scores (1–5)			
1	0.59; 36	0.45; 35	0.52; 36
2	–	0.53; 35	0.56; 35
3	–	–	0.62; 36

Correlations are based on means of the 2 repetitions for each observer. Observer 1 = VG; 2 = ER; 3 = AI. Each cell shows Spearman rank order r^2 and number of valid observations. All correlations are significant, except those marked NS (not significant).

Between-observer variance (σ^2_{O}) is reported as the sum of the variances due to observer, horse*observer, and time*observer. Within-observer variance (repetition, σ^2_{R}) is reported as σ^2_{error} . Within-horse variance over time (σ^2_{T}) is reported as the sum of the variances due to time and time*horse. Between-horse (σ^2_{H}) variance is reported as the variance due to horse.

Coefficients of variance ($[\text{s.d./mean}] \times 100$; %) were calculated for each of the 3 repeated volume measurements at mucus accumulation scores 0, 0.1, 1, 2, 3, 4, 5 in Protocol 2. We report the overall mean of the coefficients of variance.

Within- and between-observer correlations for all scores (Protocol 1), correlations of mucus accumulation, viscosity and colour scores with mucus viscoelasticity (overall and separate by time point; Protocol 3) and of mucus accumulation scores with TBS and BALF neutrophil percentages and numbers (Protocol 1) were tested with Spearman rank order tests. Mucus accumulation scores were correlated with TBS (sampled at 6, 12 and 24 h) and BALF (sampled only at 24 h) airway neutrophils in the 9 horses of Protocol 1. Probably due to local trauma from the repeated procedures, TBS neutrophil percentages significantly increased at 6, 12 and 24 h compared to 0 h (results not shown). Therefore, mucus accumulation scores were correlated with BALF neutrophil percentages and absolute numbers (at 24 h, only time point

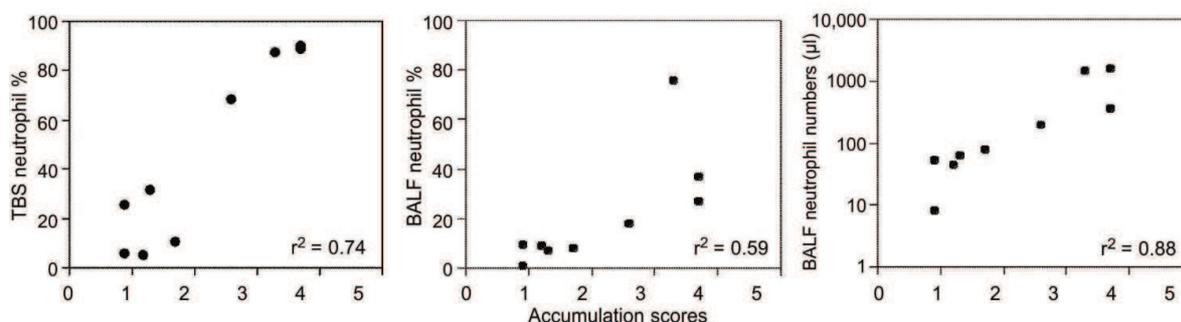


Fig 3: Associations of tracheal mucus accumulation scores with a) tracheobronchial secretion (TBS) neutrophil percentages at 0 h, and with b) bronchoalveolar lavage fluid (BALF) neutrophil percentages and c) BALF neutrophil absolute numbers at 24 h.

TABLE 3: Ranges of all time points and all observers and repetitions for mucus accumulation, localisation, apparent viscosity and colour scores separated for each horse of the 3 groups, horses without clinical signs (WCS), with inflammatory airway disease (IAD) and with recurrent airway obstruction (RAO)

Horse	Group	Accumulation (0–5)	Localisation (1–5)	Apparent viscosity (1–5)	Colour (1–5)
1	WCS	0.4–1.6	1.9–3.7	1.9–3.3	3.6–4.0
2	WCS	0.6–1.4	1.5–1.8	2.4–2.5	3.7–4.2
3	IAD	0.3–2.5	1.4–1.9	2.4–3.1	1.6–4.3
4	IAD	0.5–2.2	1.7–2.3	2.9–3.4	2.4–2.6
5	IAD	2.6–4.0	3.2–3.4	2.1–2.2	3.3–3.5
6	IAD	1.4–2.1	1.1–1.9	1.9–2.6	3.2–3.8
7	RAO	2.3–2.8	1.4–1.9	2.6–3.1	2.6–3.6
8	RAO	3.5–3.9	1.5–2.0	2.3–2.9	3.3–4.2
9	RAO	3.4–4.1	1.9–3.5	2.8–3.8	2.2–2.5

sampled) and with TBS neutrophil percentages at 0 h (since the values at the later time points may have been influenced by iatrogenic inflammation). Viscoelasticity of dorsal vs. ventral paired mucus samples (Protocol 4) was compared by Wilcoxon signed ranks test. Significance limit for all tests was set at $P < 0.05$.

Results

Contributions of observer (between-observer variance; σ^2_O), repetition (within-observer variance; σ^2_R), time (within-individual horse variance; σ^2_T) and horse (between-horse variance; σ^2_H) to the total variance for mucus accumulation, viscosity, localisation and colour scores are presented as % of total variance (Table 1). Accumulation scores showed the lowest observer-related variance (combined σ^2_O and σ^2_R) and, correspondingly, correlated best within and between observers (Table 2; Fig 2) of all the tested scores. In contrast, observer-

related variance was highest for apparent viscosity scores (combined σ^2_O and $\sigma^2_R = 80\%$ of total; Table 1), with complete disagreement between Observer 2 and the other observers (Table 2). Mucus colour and localisation scores showed intermediate observer-related variance (Table 1) and correlations (Table 2; Fig 2). Within-horse variance over time was moderate for all scores (Tables 1 and 3). The range was less than 1 score unit in most horses for apparent viscosity, localisation and colour scores, and only 2 of 9 horses showed a range of more than 1.7 score units for accumulation scores (Table 3). Interestingly, these 2 horses belonged to the IAD group.

In the 9 horses, there were significant correlations between mucus accumulation score (mean of all time points, observers and repetitions) and TBS neutrophil percentage ($r^2 = 0.74$; Fig 3a), and BALF neutrophil percentage ($r^2 = 0.59$; Fig 3b) and absolute numbers ($r^2 = 0.88$; Fig 3c). As described above, BALF was collected at only one time-point (24 h).

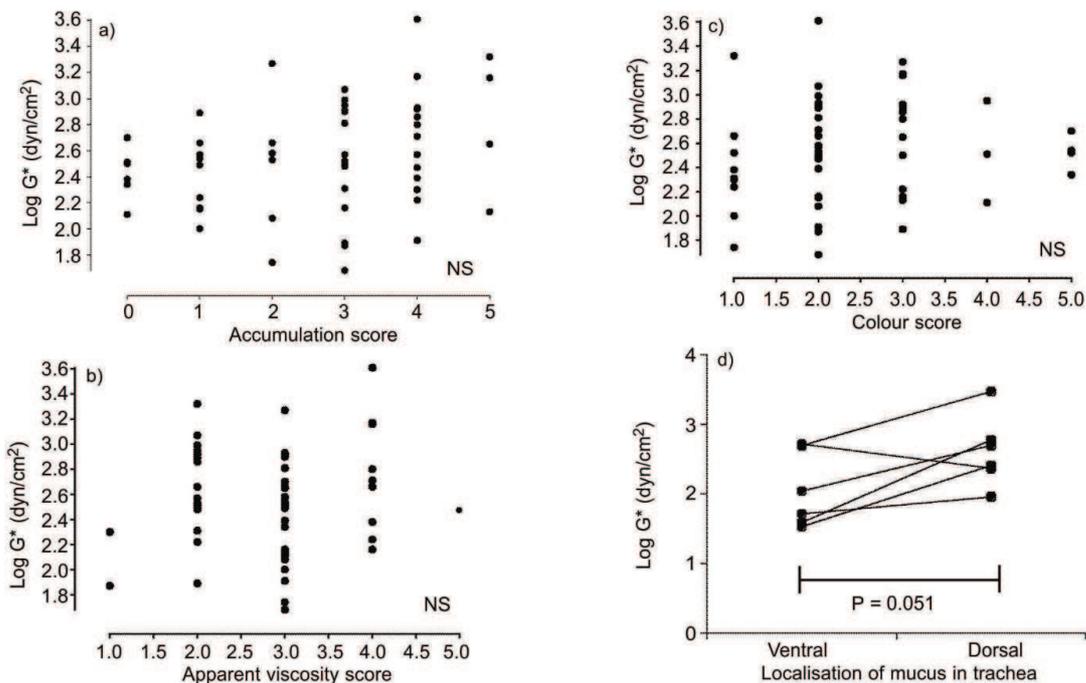


Fig 4: Relationships between tracheal mucus a) accumulation, b) apparent viscosity and c) colour scores and measured viscoelasticity ($\log G$ at 10 radian/sec; dyn/cm^2) and trend ($P = 0.051$) towards a significant difference between d) viscoelasticity of mucus samples collected ventrally vs. dorsally in the trachea at the same time. NS = not significant.

The experiment with artificial mucus demonstrated that increasing mucus accumulation score was associated with increasing volumes of mucus within the trachea. The 3 repetitions showed 0, 0, 0 (mean 0) ml; 0.4, 0.1, 0.2 (mean 0.23) ml; 2.8, 1.8, 1.4 (mean 2.0) ml; 14, 4.4, 6.3 (mean 8.3) ml; 21, 13.5, 18 (mean 17.5) ml; 36, 24.5, 28.7 (mean 29.7) ml; and 40, 49, 45.5 (mean 44.8) ml of 'artificial mucus', for grades 0, 0.1, 1, 2, 3, 4 and 5, respectively. The repeatability of this experiment was good, with a mean coefficient of variance of 31% of the 3 repetitions of 7 measurements at mucus accumulation scores 0, 0.1, 1, 2, 3, 4 and 5.

Endoscopic scores of mucus accumulation, apparent viscosity and colour ($n = 56$; Figs 4a–c) were not significantly correlated with the corresponding measurements of mucus viscoelasticity in clinically healthy and RAO-affected horses. Conversely, a strong trend ($P = 0.051$) towards a significant difference was observed between viscoelasticity ($\log G^*$ at 10 radian/sec; dyn/cm^2) of mucus samples collected ventrally (2.0 ± 0.9) and dorsally (2.4 ± 1.1) in the trachea ($n = 6$ paired samples; Fig 4d). This difference ($0.4 \times \log$ units) corresponds to a 2.5-fold difference in viscoelasticity on a linear scale.

Discussion

Mucus accumulation scores were the most reliable and informative of the evaluated scores, being highly reproducible within and between observers (Tables 1 and 2; Fig 2), with moderate variance over time within horses (Tables 1 and 3), and related to measured volumes of mucus. The use of the illustrated scoring scale (Fig 1a) and endoscopic video clips, which could be watched repeatedly and in a quiet environment, probably optimised agreement within and between observers. Furthermore, correlation coefficients can overestimate the degree of association if the study population provides a more variable sample than that expected in a clinical population (Bland and Altman 2003). In Protocol 1 we indeed purposely used a very variable sample population of horses in order to test endoscopic scoring across a 'maximal clinical range'. Also, correlation reflects the degree of association, not agreement; it is thus blind to the possibility of 'bias' (Bland and Altman 2003). We found, however, that the tendency for some observers vs. the others to give higher or lower scores was quite small, i.e. less than 1 grade unit (data not shown). The use of the complex ANOVA approach (as described by Gill [1978] and Milliken [1992]) was used because the percentages of the total variation (Table 1) provide an easily comprehensible measure of the variance attributed to the respective factors. A newer approach to this kind of question would be to use multilevel modelling, as described by Snijders and Bosker (1999).

The present results support the validity of previous findings of mucus accumulation scoring (Dieckman 1987; Dixon *et al.* 1995; Gerber *et al.* 2003b, 2004). The available data (Dieckmann 1987; Dixon *et al.* 1995; Gerber *et al.* 2003b, 2004) indicate that 'no mucus or multiple small blobs' (accumulation score <2; Fig 1a) can be regarded as normal. Increased mucus accumulation, in contrast, is associated with coughing (Dixon *et al.* 1995; Christley *et al.* 2001; Robinson *et al.* 2003) and with poor racing performance (McNamara *et al.* 1990). Mucus accumulation scores increase when RAO-affected horses are stabled and fed hay (Robinson *et al.* 2003; Gerber *et al.* 2004). It is important to note, however, that increased accumulation

scores are not specific for RAO. They can be observed in various lower airway diseases (Dixon *et al.* 1995) and even in clinically healthy sport horses that perform well in dressage and showjumping (Gerber *et al.* 2003b). It is also interesting that, in clinically healthy horses, we found no increase of accumulation scores with stabling and no correlation with airway inflammation (Holcomb *et al.* 2001; Gerber *et al.* 2003b, 2004).

The combination of our present results and previous findings allows for an estimate of the mucus volumes transported along the trachea in healthy and RAO-affected horses. Based on the relationship between accumulation scores and measured volumes, previous mucus accumulation score data (Gerber *et al.* 2003b, 2004) and mucociliary clearance rates (Turgut and Sasse 1989; Gerber *et al.* 1997), we estimate that 2–8 ml/h of endoscopically visible mucus is transported along the trachea in clinically healthy horses. In RAO-affected animals the volumes can be extrapolated to 6–14 ml/h at pasture and 15–30 ml/h when stabled. These estimates only account for mucus volumes cleared by mucociliary action, not those by coughing. Two–8 ml/h (mean 5) corresponds to 120 ml/day for normal horses, while 15–30 ml/h (mean 22.5) corresponds to 540 ml/day for the stabled RAO-affected animals. Given the size of a horse, the 120 ml/day normal value would be consistent with an estimate of about 10–15 ml/day in healthy adult humans (Zayas-Zamora 1991), while the 540 ml/day is proportionally less than the estimated 200–300 ml/day in humans with exacerbation of chronic bronchitis (Clarke and King 2002).

In contrast to our previous results in clinically healthy horses (Gerber *et al.* 2003b), mucus accumulation scores correlated well with TBS neutrophil percentages and BALF neutrophil numbers in the 9 horses of Protocol 1 that evenly represented the severity spectrum of noninfectious equine lower airway disease. Neutrophilic inflammation may cause mucus accumulation in horse airways through increased production and secretion of mucins (Fischer and Voynow 2000; Takeyama *et al.* 2000; Gerber *et al.* 2003a) and/or by unfavourably altering physical properties and clearability of the secretions (Armstrong and White 1950; Gerber *et al.* 2000; Pietra *et al.* 2000).

Unfortunately, measurements of viscoelasticity and other physical properties that influence clearability are technically demanding and often unavailable. Therefore, reliable endoscopic scoring systems that correlate with mucus physical properties could be useful tools for clinical and research purposes. Scores of apparent viscosity are reported to correlate with measurements of lung function (Herholz *et al.* 2002), and were found to decrease with oral N-acetylcysteine treatment in horses with RAO in a blinded study (Keller *et al.* 2001).

In the present study, within-horse variance over time of mucus viscosity, localisation and colour scores was moderate (Table 1) and the range was less than 1 score unit in most horses (Table 3). However, contrary to previously mentioned preliminary data (Gerber *et al.* 2003b), mucus viscosity scores did not correlate with measured viscoelasticity (Fig 4b) and the combined within- and between-observer variance was 80% of the total (Table 1), with complete disagreement between Observer 2 and the other observers (Table 2). Similarly, mucus colour did not correlate with measured viscoelasticity (Fig 4c) and, possibly due to different monitors used by the observers for scoring, showed quite high observer-related variance (Tables 1 and 2). It is important to note here that other physical properties such as spinnability and adhesiveness of mucus that are also important determinants of

clearability (King and Rubin 1994) were not measured or correlated with endoscopic scores in this study. Also, it may still be possible to subjectively differentiate the extremes recorded in some of the scores (Fig 2) despite relatively high observer-related variance. Regardless, localisation scores were associated with measured mucus viscoelasticity in this study: Dorsally located mucus showed a 2-fold higher viscoelasticity than ventrally located mucus (Fig 4d), and these extremes of localisation can be differentiated endoscopically (Tables 1 and 2; Fig 2b).

In conclusion, this study showed that endoscopic scoring of mucus accumulation is a reliable clinical and research tool. Furthermore, extremes of mucus localisation (dorsal vs. ventral) may reflect differences in mucus viscoelasticity. Due to high observer-related variance, however, endoscopic scores of mucus viscosity, localisation and colour should be interpreted with caution.

Manufacturers' addresses

¹Olympus Optical (Schweiz), Schwerzenbach, Switzerland.

²Sony Corp., Sony Europe Headquarters, Berlin, Germany.

³Kraft Foods, Inc., Rye Brook, New York, USA.

⁴SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA.

⁵NCSS Statistical Software, Kaysville, Utah, USA.

Acknowledgements

We thank the Swiss National Equine Centre for permission to examine the horses and support during the study; E. Curat, D. Aebischer, B. Feller, M. Ricklin and F. Uehlinger for kind help with the examination of horses; G. Bleuer and U. Du Pasquier for excellent technical assistance; V. Hoelzer-Maddox for kind help with the manuscript; and B. McGorum for his encouragement to perform this study. This work was supported by grants from 3M, USA, USDA Animal Health and Well-Being #99-35204-8366, the Matilda Wilson Endowment and Novartis, Switzerland.

References

- Anon (2001) International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University, June 2000. *Equine vet. J.* **33**, 5-19.
- Anon (2003) International Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome. Boston, October 2002. *Equine vet. Educ.* **15**, 61-63.
- Armstrong, J. and White, J. (1950) Liquefaction of viscous purulent exudates by deoxyribonuclease. *Lancet* **2**, 739-742.
- Bland, J.M. and Altman, D.G. (2003) Applying the right statistics: analysis of measurement studies. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **22**, 85-93.
- Christley, R.M., Hodgson, D.R., Rose, R.J., Hodgson, J.L., Wood, J.L. and Reid, S.W. (2001) Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Vet. Rec* **148**, 99-104.
- Clarke, S.W. and King, M. (2002) Respiratory defences: physical defences. In: *Respiratory Medicine* 3rd edn., Eds: C.J. Gibson, J. Gibson, D. Geddes, U. Costabel, P. Sterk and B. Corrin. W.B. Saunders Co., London. pp 181-193.
- Derksen, F.J., Scott, J.S., Miller, D.C., Slocombe, R.F. and Robinson, N.E. (1985) Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 1066-1070.
- Dieckmann, M.P. (1987) *Zur Wirksamkeit von Ambroxolhydrochlorid (Mukovent) bei Lungenkranken Pferden - Klinische, funktionelle und Zytologische Untersuchungen [Efficacy of Ambroxolhydrochloride (Mukovent) in Horses with Lung Disease - Clinical, Functional and Cytological Investigations]*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.
- Dixon, P.M., Railton, D.I. and McGorum, B.C. (1995) Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary diagnostic findings. *Equine vet. J.* **27**, 428-435.
- Fischer, B. and Vbnow, J. (2000) Neutrophil elastase induces MUC5AC messenger RNA expression by an oxidant-dependent mechanism. *Chest* **117**, Suppl.1, 317S-320S.
- Gerber, V., King, M., Schneider, D.A. and Robinson, N.E. (2000) Mucus viscoelasticity and clearability during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. *Equine vet. J.* **32**, 411-417.
- Gerber, V., Lindberg, A., Berney, C. and Robinson, N.E. (2004) Airway mucus in RAO - short-term response to environmental challenge. *J. vet. Int. Med.* **18**, 92-97.
- Gerber, V., Robinson, N.E., Jefcoat, A.M. and Hotchkiss, J.A. (2003a) Steady-state levels of equine MUC2 and MUC5AC mRNA levels in the airways of RAO-affected and control horses. *Equine vet. J.* **35**, 252-257.
- Gerber, V., Robinson, N.E., Luethi, S., Marti, E., Wampfler, B. and Straub, R. (2003b) Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine vet. J.* **35**, 491-495.
- Gerber, V., Gehr, P., Straub, R., Frenz, M., King, M. and Im Hof, V. (1997) Mucus quality on horse tracheal epithelium: microscopic grading based on transparency. *Respir. Physiol.* **107**, 67-74.
- Gill, J.L. (1978) *Design and Analysis of Experiments in the Animal and Medical Sciences*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Herholz, C., Gerber, V., Moens, Y. and Straub, R. (2002) Relationship between clinical signs and pulmonary function estimated by the SBD-CO2 in horses with COPD. *Vet. J.* **163**, 187-195.
- Holcombe, S.J., Jackson, C., Gerber, V., Jefcoat, A., Berney, C., Eberhardt, S. and Robinson, N.E. (2001) Stabling is associated with airway inflammation in young horses. *Equine vet. J.* **33**, 244-249.
- Keller, H., Faulstich, M., Elker, M., Grell, M., Wuschko, S. and Rehders, J.H. (2001) Klinische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von N-Acetylcystein bei der Behandlung der COB/COPD des Pferdes [Efficacy and tolerance study of acetylcysteine in the COB/COPD therapy in horses]. *Prakt. Tierarzt.* **82**, 108-117.
- King, M. (1988) Magnetic microrheometer. In: *Methods in Bronchial Mucology*, Eds: P.C. Braga and L. Allegra, Raven Press Ltd., New York. pp 73-83.
- King, M. and Macklem, P.T. (1977) Rheological properties of microliter quantities of normal mucus. *J. appl. Physiol.* **42**, 797-802.
- King, M. and Rubin, B.K. (1994) Rheology of airway mucus: relationship with clearance function. In: *Airway Secretion: Physiological Bases for the Control of Mucus Hypersecretion*, Eds: T. Takishima and S. Shimura, Marcel Dekker, New York. pp 283-314.
- MacNamara, B., Bauer, S. and Iafe, J. (1990) Endoscopic evaluation of exercised-induced pulmonary hemorrhage and chronic obstructive pulmonary disease in association with poor performance in racing standardbreds. *J. Am. vet. med. Ass.* **196**, 443-445.
- Milliken, G.A. (1992) *Analysis of Messy Data*, Vol. I, Chapman & Hall, Washington DC.
- Pietra, M., Guglielmini, C., Forni, M. and Cinotti, S. (2000) *In vitro* mucolytic activity of recombinant human deoxyribonuclease on equine tracheobronchial mucus. *Vet. Rec.* **147**, 627-629.
- Robinson, N.E., Berney, C., Defejter-Rupp, H., Jefcoat, A.M., Cornelisse, C., Gerber, V. and Derksen, F. (2003) Cough, mucus, airway obstruction and inflammation in heaves-affected and control horses. *Am. J. vet. Res.* **64**, 550-557.
- Snijders, T.A.B. and Bosker, R.J. (1999) *Multilevel Analysis: An Introduction to Basic and Advanced Multilevel Modelling*. Sage, London.
- Takeyama, K., Dabbagh, K., Jeong Shim, J., Dao-Pick, T., Ueki, I.F. and Nadel, J.A. (2000) Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J. Immunol.* **164**, 1546-52.
- Turgut, K. and Sasse, H.H. (1989) Influence of clenbuterol on mucociliary transport in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Rec.* **125**, 526-530.
- Zayas-Zamora, J.G. (1991) *Tracheobronchial Mucus Rheology in Lung Cancer*. MSc Thesis, University of Alberta, Edmonton, Canada. pp 24-25.

ANEXO B

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 (ΔP_{plmax}) and functional residual capacity; and decreases in multi-breath nitrogen clearance rates, dynamic compliance (C_{dyn}), and arterial O₂ tension values.^{7-10a} 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 ΔP_{plmax} 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 Firan 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.^{1,3,8,10} 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.⁸

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.¹² (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 ($< 10 \mu\text{m}$), using a particle counter.¹¹ 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 pneumotachograph¹⁵ was used to measure air flow, and volume was derived by the electronic integration of the flow signal.⁶ Transpulmonary pressure was

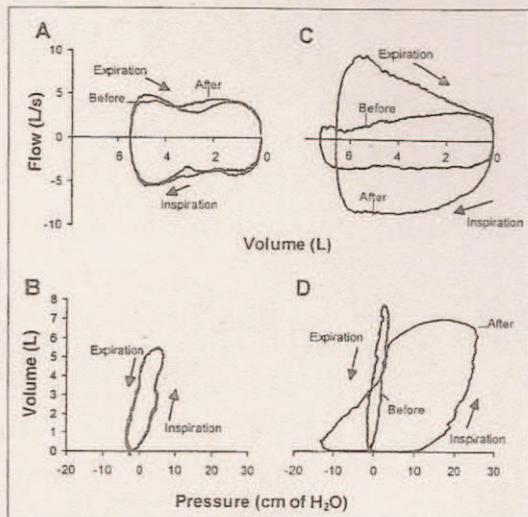


Figure 1—Typical pre- and postchallenge flow- and pressure-volume loops obtained from a control horse and a horse with heaves before and after exposure to moldy hay. A—Flow-volume loops in a control horse. B—Pressure-volume loops in a control horse. C—Flow-volume loops in a horse with heaves. D—Pressure-volume 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 syringe¹⁶ 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.¹⁷ 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 cats¹³ and horses,¹¹ and values for RF, tidal volume (VT), peak inspiratory and expiratory flow rates (PIF and PEF), and PEF at 88% of the VT (EF₈₈) were recorded. Pressure-volume loops were analyzed from the same selected breaths, with the following variables recorded: RI (averaged over the whole loop), ΔP_{plmax} , C_{dyn} , and W_{b} , corrected for VT. 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	0.39	0.39
Vr	0.22	0.40	0.51	0.35
PIF	0.52	0.66	0.92	0.33
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
RL	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	0.69

Pr > F = probability of the value obtained during general linear modeling is greater than the F statistic; f = respiratory frequency (breaths/mini); 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; RL = 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).

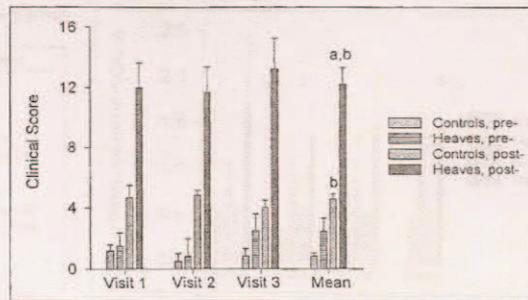


Figure 2—Effect of environmental challenge on clinical scores in horses. Challenge with moldy hay resulted in high scores in horses with heaves and control horses. ^aSignificantly different from the same time-point control values; ^bsignificantly different from pre-environmental challenge values. Mean \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 RL ($P = 0.016$; Fig 3) and W_b ($P = 0.025$). After environmental challenge, these differences were greater ($P = 0.001$ for RL 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 ^a	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 ₉₈	3.63 ± 0.24	3.61 ± 0.46	3.45 ± 0.35	3.56 ± 0.19
PEF/EF ₉₈	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 ₉₈	3.59 ± 0.44	3.04 ± 0.46	3.22 ± 0.25	3.26 ± 0.22
PEF/EF ₉₈	1.53 ± 0.29	1.53 ± 0.29	1.54 ± 0.21	1.59 ± 0.14 ^b
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	7.05 ± 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 ₉₈	2.82 ± 0.26	3.25 ± 0.23	3.04 ± 0.22	3.04 ± 0.14 ^a
PEF/EF ₉₈	2.09 ± 0.39	1.66 ± 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 ± 0.39 ^{a,b}
PEF	7.46 ± 0.90	6.36 ± 0.54	7.04 ± 0.43	6.94 ± 0.39 ^{a,b}
EF ₉₈	2.73 ± 0.39	2.73 ± 0.31	2.67 ± 0.21	2.71 ± 0.18 ^b
PEF/EF ₉₈	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 $C_{d,n}$ 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.

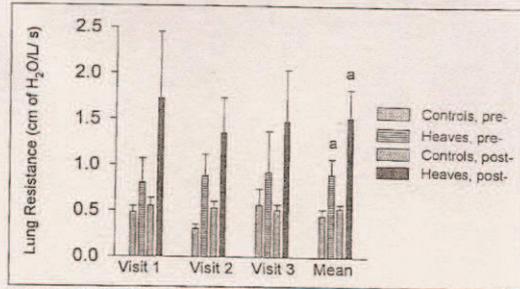


Figure 3—Effect of environmental challenge on lung resistance in horses. Challenge with moldy hay resulted in increased resistance in horses with heaves. See Figure 2 for key.

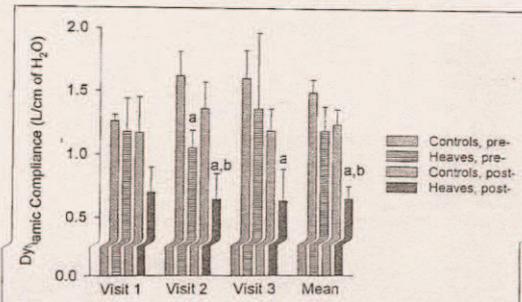


Figure 4—Effect of environmental challenge on dynamic compliance in horses. Challenge with moldy hay resulted in decreased compliance in horses with heaves. See Figure 2 for key.

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 RL, 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 nonrebreathing 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	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

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

^bModel PDM-3, Hoskin Scientific, Burlington, Ontario, Canada.

^cModel ABL3/30, Radiometer Inc, Copenhagen, Denmark.

^dGould Electronics, Bilthoven, The Netherlands.

^ePulmonary mechanics analyzer model 6, Buxco Electronics Inc, Sharon, Conn.

^fDigital delay line, Buxco Electronics Inc, Sharon, Conn.

^gModel OV6-7966, Houston Atlas Inc, Houston, Tex.

^hRespiratory loop analysis, Buxco Electronics Inc, Sharon, Conn.

ⁱPC SAS, SAS Institute, Cary, NC.

^jStatistix, Analytical Software, St Paul, Minn.

References

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