

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

SANDRA REGINA PEPICELLI DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DAS VIAS AÉREAS DE CAVALOS PURO SANGUE
INGLÊS ESTABULADOS, DURANTE O PRIMEIRO ANO DE
TREINAMENTO PARA CORRIDA.**

(Evaluation of stabled Thoroughbreds' airways during the first year of race training)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

SANDRA REGINA PEPICELLI DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DAS VIAS AÉREAS DE CAVALOS PURO SANGUE
INGLÊS ESTABULADOS, DURANTE O PRIMEIRO ANO DE
TREINAMENTO PARA CORRIDA.**

(Evaluation of stabled Thoroughbreds' airways during the first year of race training)

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: Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Junior

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	viii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	xi
RESUMO GERAL	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE QUADROS	xix
LISTA DE GRÁFICOS	xx
LISTA DE FIGURAS	xxi
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 SISTEMA RESPIRATÓRIO	4
2.2 AMBIENTE	4
2.3 MUCO	6
2.4 DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS (DIVA)	7
2.5 PATOFISIOLOGIA DIVA.....	8
2.6 HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO (HPIE)	10
2.7 DIAGNÓSTICO.....	12
2.8 AVALIAÇÃO ENDOSCÓPICA DAS VIAS AÉREAS.....	14
2.9 LAVADO TRAQUEAL.....	15
2.10 FOSFATASE ALCALINA.....	16
CAPÍTULO 3	18
3. AVALIAÇÃO DAS VIAS AÉREAS DE CAVALOS PURO SANGUE INGLÊS ESTABULADOS, DURANTE O PRIMEIRO ANO DE TREINAMENTO PARA CORRIDA	18
Resumo.....	18

Abstract.....	19
3.1. INTRODUÇÃO.....	21
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.2.1 Ética	21
3.2.2 Tipo de Estudo	21
3.2.3 Animais	22
3.2.4 Delineamento do estudo	23
3.2.5 Avaliação endoscópica das vias aéreas	24
3.2.6 Avaliação Citológica do Lavado Traqueal (LT)	25
3.2.7 Fosfatase Alcalina (FA)	26
3.2.8 Análise Estatística	28
3.3 RESULTADOS	28
3.3.1 Animais	28
3.3.2 Avaliação do Ambiente	28
3.3.3 Avaliação Clínica	28
3.3.4 Avaliação endoscópica das vias aéreas	29
3.3.5 Fosfatase Alcalina	35
3.3.6 Cultura Bacteriana	37
3.4 DISCUSSÃO	37
3.5 CONCLUSÃO	41
CAPÍTULO 4.....	42
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS.....	43

AGRADECIMENTOS

Aos cavalos que me ensinaram que: "Em seu olhar firme, o cavalo resplandece uma eloquência silenciosa que fala de amor, lealdade, força e coragem. É a janela que nos revela o quanto é disposto o seu espírito, o quanto é generoso o seu coração."

Ao meu marido Alvaro Augusto W. de Almeida, que chegou e fez da minha vida uma canção. Num dia de sorte, você chegou e me ensinou que podemos fazer o que quisermos, podemos viver como escolhermos.

À minha eterna e amada avó Florinda de Santis Castilho, *in memoriam*, mulher que me ensinou a ser guerreira, enfrentar a vida de cabeça erguida, com humildade, integridade, respeito e, acima de tudo, com muito amor e educação.

Aos meus pais, Julio e Angela, pelo exemplo que vocês são e por todo o amor e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos Julio e Alexandra, cunhados e cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, pela amizade e torcida.

Aos tios Adélia e Wolnei, que estiveram presentes durante esta minha jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Jr., sobretudo pela amizade e incentivo, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis relacionados aos problemas de saúde que me acometeram neste período, e principalmente pela orientação e competência.

Aos meus colegas e amigos veterinários Anna Asineli, Daniel Carlos Coatti, Fernanda Mendes Fernanda Zetel, pelo companheirismo e apoio prestado na execução deste trabalho, permitindo a avaliação de potros.

Aos colegas médicos veterinários Daniel Lessa, Nayro Xavier Alencar, pelo apoio prestado nas avaliações citológicas.

Ao estabelecimento Haras Belmont, que me apoiou e apoia até hoje e me faz sentir parte integrante desta família. Obrigada Sr. Dante, por abrir as portas do Haras para a realização deste trabalho, pelo apoio, confiança e interesse na pesquisa. Obrigada ao treinador e gerente Fabricio Azevedo, por permitir a avaliação dos potros sob sua responsabilidade, pela deliciosa costelada e macarronada e principalmente pela amizade.

Obrigada a todos os funcionários da equipe Belmont, pela amizade, colaboração e parceria em todas as horas. Um agradecimento especial ao funcionário Marlon Alves, que foi meu braço direito nas avaliações, sempre pronto e disposto. Ajudar é seu lema.

À incansável equipe de colheitas de lavado traqueal, sempre pronta e disposta em ajudar, não importando o horário.

Ao Wladimir, funcionário da PUC-PR, pela ajuda e colaboração e disponibilidade neste projeto.

À égua Wonder Dream, parceira e terapeuta nas horas difíceis, sempre pronta a oferecer amor e carinho, sem esperar receber algo em troca. Sempre me recebia com seu olhar doce e sincero, oferecia suas lambidas carinhosas e assim mandava minha tristeza passear.

Aos meus cães, Blue, Lorde Kelvin e Gaia, pelo amor incondicional.

À direção do Curso de Medicina Veterinária da PUCPR pela oportunidade.

Obrigada à CAPES, pela bolsa e pelo apoio ao projeto.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por acreditar e investir na busca da excelência em educação e ensino-pesquisa.

*“Cavalos, elegantes e magestosos por natureza,
montaria dos reis, mas humildes e amigos de
todos, com equilíbrio e movimentos perfeitos,
beleza incomparável, e amizade sincera, eles
podem nos levar até ao céu e além ! Mais além
do que podemos imaginar”*
(Anônimo)

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por quatro capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e os objetivos da dissertação.

O capítulo 2 apresenta a revisão de literatura contextualizada.

O capítulo 3 se refere ao artigo a ser submetido para publicação em um periódico científico.

O capítulo 4 finaliza esta dissertação, juntamente com as conclusões gerais deste trabalho, com sugestões e hipóteses para continuidade dos estudos relacionados com esta dissertação em projetos futuros.

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

RESUMO GERAL

Objetivo: Avaliar as vias aéreas de um grupo de cavalos Puro Sangue Inglês (PSI) de corrida durante o primeiro ano de treinamento, por meio de exame físico, endoscopia respiratória e citologia do lavado traqueal (LT). **Hipótese:** Que cavalos PSI de corrida jovens apresentam alterações inflamatórias nas vias aéreas nos meses iniciais de treinamento. **Material e Métodos:** Foram realizadas oito avaliações (T0 a T7, julho de 2013 - julho de 2014) de 18 cavalos PSI, machos e fêmeas, de dois anos de idade, pertencentes a um mesmo proprietário e mantidos sob manejo convencional no Jockey Club do Paraná. Os animais foram avaliados por meio de exame físico, seguido de endoscopia respiratória das vias aéreas superiores [folículos linfóides (0 a 4) e movimentação das cartilagens aritenóides (1 a 4)], seguindo até a bifurcação da traqueia (muco traqueal graduado de 0 a 5). Com o endoscópio próximo à carina, coletou-se lavado traqueal (LT) instilando-se 20 mL de solução salina estéril, aspirando-se em seguida, e centrifugando a 340g O *pellet* de células foi utilizado para a avaliação citológica diferencial por meio da coloração de Romanowski (perfil celular) e Azul da Prússia (ocorrência de hemossiderófagos). O sobrenadante do LT foi congelado a -20°C para posterior avaliação da FA e da ureia. Sangue venoso foi colhido para dosagem de ureia sérica para obtenção de fator de diluição e cálculo da atividade da FA no LT. O odor das cocheiras foi avaliado como presença ou ausência de odor de urina. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA a um critério seguido de teste Tukey de múltipla comparação, e teste de Pearson para correlações, considerando significativo $p < 0,05$. **Resultados:** As avaliações de exame físico, bem como endoscópica das vias aéreas superiores, não evidenciaram alterações, e nem as diferenças nas quantidades de muco traqueal foram significativas entre os momentos. Na avaliação citológica diferencial do LT se evidenciou um aumento de células epiteliais no transcórter do experimento. Com relação à presença dos neutrófilos, em T1 (60 dias após estabulação e início do treinamento) foi quando se observou o único momento de neutrofilia ($> 20\%$) para o grupo investigado. O percentual de eosinófilos no LT esteve aumentado nas avaliações 90 e 120 dias após estabulação e início do treinamento. Hemossiderófagos foram identificados no LT no transcórter do experimento. Houve correlação positiva entre a percepção de odor de urina nas cocheiras e o aumento do percentual de neutrófilos no LT, em T1. Não se encontrou correlação entre a atividade da FA e os achados citológicos. **Conclusão:** Cavalos PSI estabulados e em treinamento para corrida, durante os meses iniciais de treinamento apresentaram inflamação neutrofílica seguida de eosinofílica, ocorrendo elevação crescente no percentual de hemossiderófagos no LT conforme a evolução dos treinamentos. A percepção de odor de urina na cocheira foi relacionada com a inflamação neutrofílica, e não houve relação da FA com os achados citológicos.

Palavras-chave: citologia, endoscopia, equinos, hemossiderófagos, lavado traqueal, neutrófilos.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the airways of a group of English Thoroughbred (ETB) racehorses by means of physical examination, endoscopic airway as well as cytological evaluation of tracheal wash (TW) during the first year of training. **Hypothesis.** The young English Thoroughbred horse racing show inflammatory alterations in the airways during the months of training. **Material and Methods:** Eight ratings (T0 to T7, from July 2013 to July 2014) of 18 ETB horseraces were performed, male and female, two years old, belonging to the same owner at the Parana Jockey Club, kept under conventional management in stables. Animals were evaluated by means of physical examination, followed by endoscopic evaluation of the upper airways [lymphoid follicles (0 to 4) and arytenoid cartilage movement (1 to 4)], following to the tracheal bifurcation (tracheal mucus graded from 0 to 5). With the endoscope next to the carina, TW was collected, instilling up 20 ml of sterile saline solution, aspirating and centrifuging at 340g. The cells pellet was used cytological differential evaluation by means of Romanowski coloring (cellular profile) and Prussian Blue (hemosiderophages). TW supernatant was frozen up to -20°C to future alkaline phosphatase (AP) and urea evaluation. Venous blood was collected to urea dosage, used to obtainment of AP activity in TW. Stables odor was classified by the same researcher as pleasant or as urea odor. Statistical analysis was performed by means of ANOVA following a Tukey multiple comparison test, and Pearson test to correlations, considering significant $p < 0.05$. **Results:** Physical evaluations and endoscopic evaluations of the upper airways showed no changes and no differences in amounts of tracheal mucus were significant between moments. TW cytological differential evaluation evidenced an increase of epithelial cells during the experiment. Regarding the presence of neutrophils, T1 (60 days after stabling and training beginning) was the only moment of neutrophilia (> 20%) for the group investigated. Eosinophils percentage increased at T2 and T3 compared to stabling and training beginning. Hemosiderophages were identified in TW during the experiment. There was a positive correlation between the perception of urine odor in stables and increasing in the percentage of neutrophils in the TW, in T1. Correlations between raisings of the AP activity and cytological findings were not found.

Conclusion: ETB racehorses, in their first year of training, showed neutrophilic followed by eosinophilic inflammatory pictures in the first months of stabling and training. The odor of the stables was related to the neutrophilic inflammation and as the intensity of the exercises was increased, the percentage of hemosiderophages in the TW also increased. There was no relation of AP to the cytological evaluation.

Keywords: cytology, endoscopy, equine, hemosiderophages, tracheal wash, neutrophils.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variâncias
AT	Aspirado traqueal
BALT	Tecido linfoide associados aos brônquios
°C	Grau Celsius
CCE	Concurso Completo de Equitação
cm	Centímetro
DD	Diagnóstico diferencial
DIVA	Doença inflamatória das vias aéreas
ETH	Escore Total de Hemossiderófagos
FA	Fosfatase alcalina
FD	Fator de diluição
<i>g</i>	Força de rotação
HFL	Hiperplasia folicular linfoide
HPIE	Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício
IL	Interleucina
L	Litros
LT	Lavado traqueal
min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
ORVA	Obstrução recorrente das vias aéreas
PAF	Fator de ativação plaquetária
PSI	Puro Sangue Inglês
rpm	Rotação por minuto
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TPC	Tempo de preenchimento capilar
TRI	Trato respiratório inferior
TRS	Trato respiratório superior
vs.	Versus

β	Beta
%	Percentual
mmol	Milimol

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1. Graduação média de folículos linfoides faringianos e muco traqueal de potros Puro Sangue Inglês de corrida durante os meses iniciais de treinamento. A graduação da hiperplasia folicular linfoide (HFL) foi de 1 a 4 e das quantidades de muco traqueal de 0 a 5.....	29
Tabela 3.2 Avaliação citológica diferencial do lavado traqueal de cavalos Puro Sangue Inglês de corrida durante o primeiro ano de treinamento, avaliados em julho (T0), agosto (T1), setembro (T2) e novembro (T3) de 2013, fevereiro (T4), março (T5), abril (T6) e julho (T7) de 2014. Resultados apresentados em percentual médio \pm desvio padrão da média.....	31

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 2.1. Graduação da presença de folículos linfoides na faringe de equinos.....	14
Quadro 2.2. Graduação da movimentação das cartilagens aritenoides de I a IV em equinos	14

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 3.1. Variação no percentual de eosinófilos no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento, através da coloração de Romanowski.....	32
Gráfico 3.2. Variação no percentual de neutrófilos no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento, através da coloração de Romanowski. ^a p < 0,01 vs. T1 e ^b p < 0,001 vs. T0 e T2.....	33
Gráfico 3.3 Variação no percentual de hemossiderófagos no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento, por meio da coloração de Azul da Prússia. ^a p = 0,016 vs T2 e ^b p = 0,009 vs T2.....	34
Gráfico 3.4 Variação no percentual de FA no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Graduação de muco traqueal equino via exame endoscópico, 0: limpo; nenhum muco; 1: pouco; múltiplas e pequenas gotas de muco; 2: moderado; grandes gotas de muco; 3: marcado, formação de filete; 4: formação de grandes coleções de muco; 5: grande quantidade de muco. Fonte:Gerber <i>et al.</i> ,(2004).....	15
Figura 3.1. Esquematização do local de coleta de amostras de LT (setas). A parte cranial da traqueia torácica é horizontal e, portanto, local de acumulação das secreções respiratórias e do líquido estilado. Adaptado de Barakzai, 2007.....	25

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Nos equinos atletas, a doença respiratória é a segunda causa mais importante da diminuição do rendimento desportivo, interrupção no treinamento e retirada prematura das competições, sendo unicamente superada pelas alterações musculoesqueléticas (Kusano *et al.*, 2008).

Afecções respiratórias são comuns em equinos devido às condições a que estes animais estão expostos, como ambiente pró-alergênico e o treinamento intenso. Como consequência, ocorre diminuição do desempenho atlético, demonstrado em cavalos de corrida (Holcombe *et al.*, 2006) além de interferir no bem-estar desses animais (Thacker, 2006).

A rotina de treinamento, com a qual o cavalo de corrida tem que conviver, causa um estresse adicional prejudicial à resposta imunológica pulmonar desses animais (Couëtil, 2002). O exercício está associado à inflamação das vias aéreas inferiores de cavalos atletas (McKane *et al.*, 1993; Coëutil e Denicola, 1999; Sanchez *et al.*, 2005) e, apontado como causa da DIVA (Christley e Rush, 2007). Desta forma, o reconhecimento precoce das alterações, e o diagnóstico preciso, são importantes para o adequado tratamento.

Clinicamente, cavalos com DIVA podem apresentar corrimento nasal, tosse, rendimento desportivo reduzido, e aumento de muco traqueal observado na avaliação endoscópica (Couëtil *et al.*, 2007).

O lavado traqueal (LT) é uma técnica de avaliação amplamente difundida, e um instrumento eficaz na obtenção do conteúdo das secreções das vias aéreas periféricas. Foi primeiramente utilizado em seres humanos, por Pecora (1959), e posteriormente adaptado para equinos por Mansmann e Knight (1972), que verificaram sua importância no diagnóstico das afecções do trato respiratório dos cavalos. O LT é uma técnica de investigação citológica de grande importância para a avaliação respiratória, pois pode ser utilizado na identificação do tipo de resposta inflamatória local das vias aéreas em equinos com problemas respiratórios (Beech, 1975). Além disso, é uma técnica realizada

com facilidade, pois é pouco estressante, realizada durante a avaliação endoscópica e com contenção mínima, sendo um exame de baixo custo (Whitwell e Greet, 1984; Beech, 1991; Sanches, 1998; Michelotto *et al.*, 2007).

Nos cavalos de corrida, a DIVA resulta em redução na capacidade de desempenho desportivo, conforme demonstrado por Holcombe *et al.*, (2006) em cavalos com quantidades aumentadas de muco na traqueia, e pode ter relação com outra condição comum interferindo na capacidade desportiva que é a hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) (Hinchcliff *et al.*, 2005a; Michelotto *et al.*, 2011). Estudar os cavalos de corrida jovens, em fase inicial do treinamento, possibilita entender as alterações decorrentes da mudança ambiental, de manejo, e as causadas pelo treinamento. Em estudo anterior, cavalos de corrida jovens durante treinamento para corrida, ainda sem terem corrido, apresentaram alterações no fluido do lavado broncoalveolar (LBA) relacionadas a estresse oxidativo, aumento de células inflamatórias, e redução da capacidade de resposta do macrófago alveolar (Michelotto *et al.*, 2010), e eventos esses relacionados à ocorrência de HPIE (Michelotto *et al.*, 2011). Contudo, é importante se entender as alterações respiratórias que ocorrem em diversos momentos, desde a estabulação para o início dos treinamentos e durante a evolução deste até a corrida.

Portanto, a hipótese levantada no presente estudo é que a manifestação inicial do processo inflamatório em vias aéreas de cavalos Puro Sangue Inglês (PSI) jovens em treinamento para corrida, pode ser detectada e acompanhada através de avaliações sequencias das vias aéreas através de exame físico, exame endoscópico das vias aéreas e citológico do LT.

Objetivo Geral

Descrever as alterações das vias aéreas de cavalos PSI durante o primeiro ano de treinamento para corrida.

Objetivos Específicos

- Estudar os parâmetros clínicos e endoscópicos das vias aéreas de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento.
- Avaliar as alterações citológicas do LT em cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento.
- Avaliar a atividade da fosfatase alcalina no LT como marcador de doença das vias aéreas.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMA RESPIRATÓRIO

O sistema respiratório é constituído anatomicamente pelas narinas, coanas, seios paranasais, laringe, faringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos (Getty, 1986). É dividido em trato respiratório superior (TRS) e trato respiratório inferior (TRI), sendo que o trato respiratório superior é constituído pelas estruturas responsáveis pela entrada, circulação, filtração e aquecimento do ar, enquanto o trato respiratório inferior é responsável pela circulação do ar e trocas gasosas (Feitosa, 2004).

Os pulmões dos equinos não têm a mesma divisão que as outras espécies. Seu lobo direito é constituído somente do lobo intermediário e o lobo esquerdo pode ser considerado como um todo, como o corpo do pulmão (Dyce, 2004).

A principal função pulmonar é efetivar as trocas gasosas, realizar a oxigenação e a liberação do gás carbônico pelos alvéolos pulmonares (Feitosa, 2004). A eficiência deste sistema depende da sua capacidade de realizar bem as trocas gasosas (Radostits *et al.*, 2002).

No exercício ocorre uma ampliação na taxa respiratória, e por consequência qualquer disfunção neste sistema pode causar um desequilíbrio, resultando em queda na capacidade atlética do cavalo desportista (Bailey *et al.*, 1999; Rossdale *et al.*, 1985).

2.2 AMBIENTE

As afecções respiratórias são comuns em equinos e, o ambiente é implicado como fator de risco importante na ocorrência dos processos inflamatórios em vias aéreas. O espaço da cocheira impõe aos cavalos um risco importante especialmente para a DIVA (Burrell *et al.*, 1996; Holcombe *et al.*, 2001; Clements e Pirie, 2007), pois o ambiente de cocheira tem oito vezes mais concentração de endotoxinas bacterianas, por exemplo, em relação ao ambiente dos piquetes (Berndt *et al.*, 2008). Somando-se a isso, o trato

respiratório constitui-se na maior superfície do organismo exposta ao material presente no ar, que além das endotoxinas apresenta partículas inorgânicas e esporos de fungos, todos agressores potenciais.

As baias geralmente apresentam pouca ventilação, além das altas concentrações de poeiras, contendo mais de 50 espécies de fungos (Hoffmann *et al.*, 2002). A respiração expõe as vias aéreas dos cavalos aos efeitos adversos da mistura destes agentes poluentes e gases tais como a amônia (Art *et al.*, 2005). Os alérgenos presentes na poeira ambiental podem entrar no aparelho respiratório e ganhar acesso aos pulmões. Isto está relacionado com a dimensão das partículas, pois partículas com diâmetro menor que 5µm representam um maior risco de atingirem as regiões mais periféricas das vias aéreas e desencadear um processo inflamatório (Clements e Pirie, 2007).

As fontes de maior contaminação para estes animais são a cama e o feno ofertado na alimentação. Mesmo feno em boas condições e de boa qualidade pode conter fungos capazes de suscitar sinais clínicos respiratórios em animais mais suscetíveis. Fardos de palha, que geralmente são mantidos por um período maior no campo e expostos às condições climáticas, também são apontados como desencadeadores dos mesmos sinais clínicos. Fardos que não foram secos adequadamente podem ter um pico de humidade de 30 a 50%, que irá favorecer o crescimento de fungos (Couëtil e Hawkins, 2013).

O período de 30 dias de estabulação sem treinamento, com manejo convencional e alimentação a base de ração concentrada e feno de alfafa e cama de serragem, não resultou em inflamação pulmonar nos potros PSI de corrida quando avaliados através do lavado broncoalveolar (LBA) (Michelotto Jr., 2010). Contudo, Holcombe *et al.* (2001) avaliaram 14 potros da raça árabe, durante o período de transição da pastagem para cocheiras com camas de palhas, examinando-os depois de 90 dias de estabulação e evidenciando um acréscimo no número percentual de neutrófilos no LBA, demonstrando os efeitos da estabulação sobre a condição respiratória (Holcombe *et al.*, 2001).

Com relação aos diferentes tipos de camas, demonstrou-se que cavalos alojados na cama de palha eram duas vezes mais propensos a sofrer de doença das vias aéreas inferiores, em relação àqueles mantidos em papel picado (Burrell *et al.*, 1996).

Especificamente com relação à alimentação composta por feno, esta também é rica em poeiras contendo alérgenos capazes de causar danos às vias aéreas. Para Thacker (2006) é importante estar ciente dos mecanismos da resposta inflamatória das vias aéreas a fim de compor estratégias para restringir o impacto e os danos causados, visando assim o bem-estar dos animais. De fato, Clements e Pirie (2007), demonstraram uma redução da concentração de poeira no ambiente do cavalo após o feno ser molhado antes da administração, e também pela troca do feno por silagem.

Não somente os animais sofrem com a exposição a este tipo de ambiente, os trabalhadores envolvidos com o cotidiano do manejo dos cavalos também são afetados (Elfman *et al.*, 2009). Neste estudo, sugeriu-se a identificação de biomarcadores adequados para controlar o ambiente do cavalo, a fim de se conseguir melhora para os trabalhadores que estão diariamente manejando estes animais nas cocheiras, procurando-se benefício para a saúde de ambos.

Como consequência, o manejo de estabulação imposto aos cavalos de corridas influencia na diminuição do rendimento atlético destes animais, visto que foi relacionado com o aumento das quantidades de muco traqueal à diminuição da capacidade de corrida (Holcombe *et al.*, 2006).

2.3 MUCO

O muco possui funções essenciais nas vias aéreas. Em conjunto com as células epiteliais, forma o sistema mucociliar, que quando associado à tosse é primordial para a desobstrução das vias aéreas (Adler, 2005).

Quando o cavalo inala qualquer tipo de partícula que atinge as vias aéreas inferiores, um processo inflamatório pode ser deflagrado. Em consequência, ocorre um influxo de células inflamatórias e o aumento na produção de muco para a remoção de agentes invasores. Entretanto, algumas vezes esta produção de muco é maior do que a capacidade de limpeza deste material pelas vias aéreas, e neste caso ocorrerá acúmulo de secreção, o que agrava a obstrução das vias aéreas (Gerber, 2001).

MacNamara *et al.* (1990) demonstraram que cavalos de corrida com acúmulo de muco traqueal foram mais propensos a terminar em último ou penúltimo lugar. Este estudo, no entanto, não controlou variáveis tais como idade, sexo e treinamento.

Quando a quantidade de muco traqueal está aumentada ocorre comprometimento da função pulmonar, resultando em prejuízos ao rendimento atlético, levando à redução no rendimento no último terço da corrida, além da manifestação de pouca resistência nos treinos e tempo de recuperação mais prolongado após um período de exercício intenso. Assim, o acúmulo de muco traqueal é um fator de risco para o mau desempenho de corrida em cavalos PSI, já que aqueles com quantidades ≥ 2 apresentaram rendimento reduzido (Holcombe *et al.*, 2006). Em cavalos de equitação, por sua vez, quantidades de muco traqueal ≥ 3 representaram um limitador para o bom desempenho (Widmer *et al.*, 2009).

Cavalos PSI de corrida encaminhados à avaliação endoscópica das vias aéreas por apresentarem tosse, evidenciaram quantidades de muco traqueal grau 2 em 11,9% deles, grau 3 em 23,0%, 19,1% evidenciaram grau 4 e 27,8% grau 5. Desse modo, 81,7% dos cavalos avaliados apresentaram secreção traqueal graus 2 a 5, configurando-se uma quantidade de muco capaz de comprometer a função pulmonar (Silva *et al.*, 2011).

2.4 DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS (DIVA)

As afecções respiratórias são comuns em equinos e, como consequência, causam diminuição do desempenho atlético em cavalos de corrida (Holcombe *et al.*, 2006) além de interferir no bem-estar desses animais (Thacker, 2006).

A diminuição do rendimento atlético (Moore *et al.*, 1995) ou intolerância ao exercício (Mazan, 2010) e, recuperação respiratória prolongada após um treinamento (Hare e Viel, 1998) são complicações que podem advir do quadro inflamatório pulmonar. Assim, a DIVA é uma síndrome caracterizada por inflamação do aparelho respiratório de etiologia multifatorial, considerada como uma condição inflamatória não infecciosa afetando o trato respiratório inferior especialmente de cavalos desportistas (Dixon *et al.*, 2003; Rush, 2003).

Foi definida no *Workshop* Internacional relativo à Doença Inflamatória das Vias Aéreas, caracterizando-a conforme a presença de um ou mais dos seguintes sinais clínicos: tosse, presença de secreção traqueal, evidências citológicas de inflamação respiratória, corrimento nasal, má performance desportiva, tempo de recuperação

prolongado após o exercício, ausência de alterações do padrão respiratório no repouso, ausência de sinais de envolvimento sistêmico (febre, depressão, inapetência) e a ausência de alterações no hemograma e bioquímica sérica (Couëtil *et al.*, 2007).

Em um estudo de Derksen *et al.* (1989), avaliaram 50 cavalos com histórico de problemas respiratórios, e os sinais clínicos observados na avaliação foi que 29 animais apresentaram tosse, 23 intolerâncias ao exercício, 16 deles apresentaram algum tipo de secreção nasal e, 7 tinham dispneia.

A DIVA ocorre com maior frequência em animais jovens mantidos em regime de estabulação em ambientes com elevada densidade de poeiras, má ventilação, elevada concentração de endotoxinas, ácaros, bolores, entre outros alérgenos capazes de induzir a inflamação das vias respiratórias (Holcombe *et al.*, 2001; McGorum e Dixon, 2007). A incidência desta doença diminui com a idade, o que sugere a aquisição de tolerância contra os alérgenos ambientais que são considerados os fatores de risco à DIVA (Chapman *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2005).

Entretanto no estudo de Lessa *et al.* (2005) encontraram cavalos de 10 a 20 anos diagnosticados com DIVA, o que evidencia que animais de qualquer idade podem ser acometidos.

A ocorrência da DIVA é de 11 a 50 % em cavalos de corrida em fase de treinamento, sendo que a incidência pode chegar a 80% em animais de corrida de dois anos de idade (Christley e Rush, 2007). Até 41% destes animais podem vir a apresentar inflamação das vias aéreas nas duas primeiras semanas de treinamento (Malikides, 2003).

Os cavalos sujeitos a um regime de treinamento com finalidade desportiva apresentam uma maior predisposição para a DIVA, devido à maior deposição de partículas no trato respiratório inferior, alteração da função dos macrófagos alveolares e/ou episódios de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPiE) o que contribui para o processo inflamatório (Christley e Rush, 2007; Michelotto Jr. *et al.*, 2011).

2.5 PATOFISIOLOGIA DA DIVA

O ambiente em que o cavalo vive possui partículas que são capazes de ultrapassar o sistema de filtragem das vias aéreas, filtro que tem sua origem nas narinas. As

partículas ultrapassam as passagens nasais e se alojam em diversos segmentos das vias aéreas, deflagrando uma resposta imunológica não específica, e certos tipos de células são recrutados, como neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Mckenzie, 2011). Inicia-se um processo de fagocitose das partículas estranhas, realizadas por macrófagos, as quais agem na atração e ativação de neutrófilos, além da produção de interleucinas pró inflamatórias (Thacker, 2006). Há uma migração acelerada de células inflamatórias com a entrada de neutrófilos nos pulmões, pois a expressão dos receptores aumenta, permitindo a resposta celular às interleucinas (Zhang *et al.*, 2001). Um processo fagocitário realizado por neutrófilos tem início por volta de oito horas após a migração celular, ocorre assim a fagocitose dos patógenos presentes nos pulmões e por consequência liberação de grânulos (Thacker, 2006).

Hughes *et al.* (2011) encontraram um aumento das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-23 em cavalos com DIVA no LBA e neste estudo sugeriram que o aumento do número de neutrófilos e contagem de mastócitos podem estar associados ao recrutamento de células ativadas e ao processo inflamatório nas vias aéreas inferiores. Os mediadores e citocinas são produzidos por todos os tipos de células e contribuem para a regulação da resposta imunológica tanto de células vizinhas quanto distantes. Com isso, estão envolvidos na iniciação, manutenção e resolução da inflamação (Lavoie *et al.*, 2011). A resposta inflamatória aguda é deflagrada pelo fator de necrose tumoral α (TNF- α) e as interleucinas IL-1 (α e β) e IL-6. Baixos níveis de TNF- α são adequados para ativar os macrófagos a fagocitar os patógenos, porém, à medida que a quantidade desta interleucina aumenta ocorrem danos no parênquima pulmonar (Thacker, 2006; Lavoie *et al.*, 2011). Tais autores também encontraram TNF- α associado à inflamação de vias aéreas inferiores e relacionaram a IL-1 β à neutrofilia pulmonar em cavalos com DIVA.

O sistema respiratório transporta oxigênio ao sangue e elimina o gás carbônico, quando um processo inflamatório se instala essas trocas gasosas serão prejudicadas (Couëtil, 2003). Em um estudo de Sánchez *et al.* (2005), em cavalos com DIVA, demonstrou a diminuição de PaO₂ quando estes animais foram exercitados em esteira. Evidenciando assim a atenuação da capacidade de troca gasosa em função da doença pulmonar inflamatória. As vias aéreas maiores são a região onde ocorre a menor

resistência à passagem do ar, por isso, quando há obstrução em vias inferiores (bronquíolos e alvéolos), como na DIVA, o animal só expressará sinais quando a obstrução for vasta, ou quando em recrutamento mais intenso dessas vias, como no exercício. Sendo assim, essa obstrução em vias aéreas menores prejudica a ventilação nas regiões das trocas gasosas, dificultando o transporte de oxigênio e minimizando o desempenho atlético do cavalo (Robinson *et al.*, 2003). Segundo Nyman (2003), além da distribuição de oxigênio estar limitada, ocorrem hipoventilação e hipoperfusão alveolares.

2.6 HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO (HPIE)

A hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) tem maior prevalência em cavalos de corrida, por serem submetidos a exercício intenso, ocorrendo aumento na pressão arterial pulmonar e colapso da barreira alvéolo-capilar (Birks *et al.*, 1997). Afeta várias raças de cavalos submetidos a exercício físico de alta velocidade ou intensidade, incluindo corrida, obstáculos, concurso completo de equitação (CCE), polo, baliza, três tambores, laço em dupla, entre outras (Erickson e Poole, 2007).

A inflamação pulmonar pode influenciar a ocorrência da HPIE. A inflamação pulmonar e a ocorrência de estresse oxidativo associados aumentou a atividade do fator de ativação plaquetária (PAF) no LBA, as estiveram associados ao achado de HPIE em potros PSI jovens durante o treinamento para corrida. Este cenário ainda resultou em redução na atividade de macrófagos alveolares nos cavalos com HPIE investigados (Michelotto *et al.*, 2010).

Contudo, a ocorrência da HPIE é observada em cavalos realizando outras especialidades esportivas menos intensas (Epp *et al.*, 2006).

Vicino *et al.* (2007) demonstrou a ocorrência de HPIE em cavalos de salto, sendo que cavalos que participaram de provas na altura entre 1,30 m – 1,50 m. Apresentaram maior incidência que aqueles que saltaram provas entre 1,00 m – 1,20 m.

Silva *et al.* (2011) avaliou a HPIE em cavalos de hipismo de 1,00m a 1,20m. Foram avaliados sete cavalos, sendo 3 fêmeas e 4 machos, com idades entre 6 e 14 anos de idade, da equipe de hipismo da Polícia Militar do Estado do Paraná (PMPR), o trabalho demonstrou que cavalos que realizam exercícios submáximos estão sujeitos a HPIE e que a inflamação pulmonar está associada.

A prevalência da HPIE varia conforme a frequência de avaliações e com o método de diagnóstico adotado, sendo que os cavalos sempre exibem algum grau de HPIE quando submetidos a exames endoscópicos repetidos. Na avaliação endoscópica de 554 cavalos após as corridas, quando apenas um exame endoscópico foi realizado após uma corrida, 75% dos cavalos apresentaram sangue na traqueia. Quando foram submetidos a dois exames endoscópicos pós corridas, 95% da amostra exibiram sangue na traqueia em pelo menos em um dos exames. Finalmente, quando foram realizados 3 exames endoscópicos pós corridas 100% dos cavalos apresentaram sangue na traqueia em pelo menos um dos exames endoscópicos (Birks *et al.*, 2002).

Hinchcliff *et al.* (2005a) foi pioneiro em demonstrar o comprometimento do rendimento desportivo, quando demonstrou que cavalos de corrida com HPIE grau 1 apresentaram 4 vezes mais possibilidades de vencer, em relação a graduações mais elevadas de hemorragia.

O aumento dos episódios de HPIE está relacionado ao aumento da intensidade do exercício, história de episódios anteriores de hemorragia, tempo de treino prolongado, idade mais comum em cavalos adultos, inflamação respiratória pré-existente, arritmias cardíacas e obstrução respiratória moderada a severa (Durando, 2012).

A HPIE é confirmada pela presença de sangue livre advinda dos pulmões, na árvore traqueobrônquica, ou sinais de sangue após exercícios extenuantes, que podem ser verificados na avaliação endoscópica após 30 a 60 minutos da finalização da atividade (Costa *et al.*, 2004; Newton *et al.*, 2005) e presença de hemossiderófagos no LBA (Doucet e Viel, 2002).

Há uma ruptura dos capilares alveolares, passagem do sangue para o espaço intersticial e alveolar e, posteriormente para os brônquios e traqueia na HPIE. Quando o animal está em repouso a pressão arterial pulmonar média é de 20 a 25 mmHg e durante o exercício intenso este valor é superior a 90 mmHg (Hinchcliff, 2007). Assim, o aumento da pressão arterial pulmonar associada ao aumento da pressão atrial esquerda durante o exercício resulta em última análise no aumento da pressão capilar pulmonar. Associado a este fato ocorre a diminuição marcada da pressão pleural e, deste modo da pressão alveolar. Assim, o aumento da pressão capilar pulmonar e a diminuição da pressão

pleural contribuem para a maior predisposição para ruptura dos capilares pulmonares na HPIE (Langsetmo *et al.*, 2000).

Biava *et al* (2007) avaliou a HPIE em cavalos da raça Quarto de Milha com o uso do Escore Total de Hemossiderófagos (ETH), que avalia a quantidade de hemossiderina em macrófagos alveolares. Avaliou 20 animais sem prévio histórico clínico de HPIE, em rotinas de treinamentos e competições, provenientes de Curitiba e região metropolitana, o trabalho demonstrou que a classificação de hemossiderófagos em escore ETH proposto por Doucet e Viel (2002), é eficaz e de grande valia para a avaliação da Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício. Que este método permite uma avaliação cuidadosa dos macrófagos alveolares com hemossiderina posterior ou tardia, quando comparada com a endoscopia e com boa especificidade e sensibilidade.

2.7 DIAGNÓSTICO

A precocidade de um diagnóstico é fundamental para o estabelecimento de um plano terapêutico eficaz, e para minimizar as alterações de um processo inflamatório respiratório, por conseguinte reduzindo perdas econômicas decorrentes da retirada destes animais de suas atividades (Ainsworth e Cheetham, 2010).

É importante conhecer o ambiente em que o cavalo habita, na medida em que este exerce um efeito direto através da exposição a potenciais alérgenos, bactérias e fungos (Wilkins, 2009). Então, vistoriar o ambiente em que o cavalo vive é primordial, assim como aferir a qualidade do feno, do material da cama e da ventilação do estábulo. Além disso, o proprietário deve ser arguido sobre medicamentos utilizados, doenças prévias e seus concernentes tratamentos, histórico de vacinação, além da descrição e duração dos sinais clínicos (Viel, 2009).

A anamnese completa e o exame físico são instrumentos fundamentais para o processo de diagnóstico, a coleta das informações são subsídios para a identificação dos problemas, definição de um rol de diagnósticos diferenciais (DD) e a eleição dos exames complementares mais adequados a suspeita clínica (Roy e Lavoie, 2003).

Os exames complementares mais frequentes na avaliação do aparelho respiratório são a endoscopia, radiografia, ecografia, análise dos gases sanguíneos,

citologia e cultura bacteriana de secreções respiratórias, entre outros (Radostitis *et al.*, 2009).

O exame físico deve conter a avaliação do estado geral do cavalo e não apenas o exame do aparelho respiratório (Viel, 2009). É primordial avaliar o estado mental e corporal do animal (Roy e Lavoie, 2003). Importante obter informações sobre o apetite, e a ingestão de água. Avaliar mucosas, determinação do tempo de preenchimento capilar (TPC), palpação dos linfonodos submandibulares e retrofaringeanos, determinação do estado de hidratação, auscultação cardíaca, auscultação do aparelho respiratório (Mayhew, 2000).

A suposição de uma doença respiratória implica em uma avaliação minuciosa do aparelho respiratório com a intenção de localizar a origem do problema e, posteriormente identificar o agente etiológico envolvido (Rush e Mair, 2004). Para um melhor resultado o exame do aparelho respiratório deve ser sistemático, iniciado pela inspeção do animal à distância com o objetivo de avaliar o tipo, ritmo, frequência e padrão respiratórios (McGorum e Dixon, 2007). No cavalo saudável, a respiração é do tipo costoabdominal, regular e sempre com a mesma profundidade (Gonçalves, 2004).

A frequência pode ser aferida pela auscultação torácica ou pela observação dos movimentos costoabdominais num ambiente calmo durante a fase de repouso para que se possa fazer uma avaliação mais precisa sem que haja excitação ou medo induzidos pela contenção do paciente (McGorum e Dixon, 2007).

O exame que mais dados fornece para a avaliação do aparelho respiratório é a auscultação (Gonçalves, 2004), pois permite avaliar os sons respiratórios fisiológicos, identificar a presença e caracterizar os sons respiratórios patológicos ou adventícios (Taylor *et al.*, 2010). Deve ser conduzida durante a fase eupneica com o dispêndio de um período de auscultação análogo para ambos os lados da cavidade torácica e para a porção distal da traqueia (Taylor *et al.*, 2010).

2.8 AVALIAÇÃO ENDOSCÓPICA DAS VIAS AÉREAS

A endoscopia é um exame complementar fundamental para muitas doenças respiratórias em equinos, pois permite a visualização da maior parte do aparelho respiratório destes animais (Roy e Lavoie, 2003). Presença de tosse, corrimento nasal, epistaxe, alterações de sons respiratórios, dispneia durante o repouso e após o exercício e queda no desempenho desportivo são indicativos para solicitação de um exame endoscópico (Brazil, 2010). Com este instrumento a disposição é possível a vistoria do aparelho respiratório, colheita de amostras de tecido ou de secreções respiratórias; a definição da origem dos ruídos respiratórios; a identificação de defeitos congênitos; a determinação da origem da hemorragia ou corrimento nasal, bem como a extração de corpos estranhos presentes na árvore traqueobrônquica (Ainsworth e Cheetham, 2010).

Na avaliação da faringe, o desenvolvimento dos folículos linfóides pode ser graduado conforme Raker e Bowles (1978) (Quadro 2.1), enquanto a avaliação dos movimentos das cartilagens aritenoides é observada conforme Ainsworth (2000) (Quadro 2.2).

Quadro 2.1: Graduação da presença de folículos linfóides na faringe de equinos.

GRADUAÇÃO	SIGNIFICADO
Grau I	Folículos pequenos, esbranquiçados na parede dorsal
Grau II	Folículos pequenos, esbranquiçados e em grande número, acompanhado de hiperemia, nas regiões dorsais e laterais da faringe
Grau III	Grande número de folículos hiperêmicos, próximos um dos outros em toda a região dorsal e lateral da faringe.
Grau IV	Folículos edemaciados e hiperêmicos em toda a região faríngea.

Fonte: Raker e Bowles (1978).

Quadro 2.2: Graduação da movimentação das cartilagens aritenoides de I a IV em equinos.

GRADUAÇÃO	SIGNIFICADO
Grau I	Abdução e adução total e sincrônica das cartilagens aritenóides esquerda e direita.
Grau II	Movimento assincrônico com hesitação, vibração parestia do adutor da aritenóide esquerda durante inspiração ou expiração, ou ambas, mas abdução completa induzida por deglutição ou oclusão nasal.
Grau III	Movimento assincrônico da aritenóide esquerda durante inspiração ou expiração, ou ambas, mas abdução completa não induzida e mantida por deglutição ou oclusão nasal.
Grau IV (Hemiplegia Laringeana)	Assimetria acentuada da laringe em repouso e ausência de movimento substancial da aritenóide esquerda.

Fonte: Ainsworth (2000).

A presença de muco no lúmen traqueal e sua quantificação foi graduada conforme a escala de Gerber *et al.* (2004), mostrada na Figura 2.1.



Figura 2.1 – Graduação de muco traqueal equino via exame endoscópico, 0: limpo; nenhum muco; 1: pouco; múltiplas e pequenas gotas de muco; 2: moderado; grandes gotas de muco; 3: marcado, formação de filete; 4: formação de grandes coleções de muco; 5: grande quantidade de muco. Fonte: Gerber *et al.*, (2004).

Entretanto, esse método não especifica a natureza nem a origem da inflamação. Sendo assim, são necessárias avaliações citológicas das secreções, obtidas especialmente através de LT e LBA (Mazan, 2010).

2.9 LAVADO TRAQUEAL

O LT é uma técnica simples, comumente empregada no diagnóstico da doença respiratória (Ainsworth e Cheetham, 2010). Técnica utilizada para obtenção de amostras de muco acumulado na traqueia de equinos com dificuldades respiratórias (Sweeney, 1999). Existem dois métodos que podem ser adotados para obter tais amostras que poderão ser realizadas por punção percutânea (transtraqueal) ou via canal de trabalho do endoscópio (Schaer e Orsini, 2007). A crescente disponibilidade do uso do endoscópio vem substituindo gradualmente a aspiração transtraqueal por ser um método menos invasivo e por provocar menos complicações (Taylor *et al.*, 2010). Esta técnica permite avaliar qualitativamente a microbiota traqueal, não sendo indicada para quantificar microorganismos nos lavados, pois a injeção de líquidos no lúmen traqueal pode diluir o muco e mascarar a real concentração de bactérias existentes na traqueia (Hewson e Viel, 2002).

A análise do fluido dos lavados em cavalos hígidos, revela presença de macrófagos, hemossideróforos, células gigantes, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (Christley *et al.*, 1999). Com predominância celular, em cavalos adultos, de macrófagos e linfócitos (cerca de 60% e 30%, respectivamente), já em potros, a situação é distinta, pois aproximadamente 80 a 90% das células recuperadas inicialmente são macrófagos alveolares (Speirs, 1999).

Os valores citológicos de LT em cavalos normais são <10% de linfócitos, <1% de eosinófilos e < 20% de neutrófilos (Robinson, 2003; Hodgson e Hodgson, 2007).

2.10 FOSFATASE ALCALINA

A enzimologia clínica surge como meio de fornecer informações clínicas com o mínimo de invasibilidade, auxiliando no diagnóstico de doenças, no prognóstico de quadros clínicos e na avaliação nutricional de pacientes (Scheffer e Gonzales, 2003). Na

medicina veterinária o seu uso ganhou importância a partir da década de 80, e continua a crescer até os dias de hoje (Scheffer e Gonzales, 2003).

A FA é uma enzima encontrada em diversos órgãos e tecidos como os ossos, o fígado e intestinos. É uma glicoproteína dimérica e dependente de zinco, que cliva a ligação fosfato de ésteres monofosfatos (Cathala *et al.*, 1975). Tem função hidrolítica, responsável pela remoção de grupamentos fosfato de vários tipos de moléculas (Kaneko, 1989). Desde a década de 20 a atividade sérica desta enzima tem sido utilizada para indicar lesões hepáticas (Kalina *et al.*, 1990). Além de apontar alterações fisiológicas ou patológica deste órgão, alterações da atividade da FA no soro e em outros fluidos corpóreos podem refletir alterações de outras origens (Fernandez e Kidney, 2007).

Estudos indicam alta atividade da FA nos pneumócitos do tipo II de secções de tecido pulmonar, bem como em cultivos desse tipo celular. Essa atividade parece estar relacionada com a síntese de compostos fosfolipídicos e proteicos da substância surfactante pulmonar (Kalina *et al.*, 1990). Estudiosos já demonstraram o quão importante é na clínica a utilização da determinação da atividade desta enzima no trato respiratório posterior como ferramenta diagnóstica em várias espécies (Henderson *et al.*, 1995; Capelli *et al.*, 1997; Cobben *et al.*, 1999; Maden *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DAS VIAS AÉREAS DE CAVALOS PURO SANGUE INGLÊS ESTABULADOS, DURANTE O PRIMEIRO ANO DE TREINAMENTO PARA CORRIDA.

(Evaluation of stabled Thoroughbreds' airways during the first year of race training)

Resumo

Objetivo: Avaliar as vias aéreas de um grupo de cavalos Puro Sangue Inglês (PSI) de corrida durante o primeiro ano de treinamento, por meio de exame físico, endoscopia respiratória e citologia do lavado traqueal (LT). **Hipótese:** Que cavalos PSI de corrida jovens apresentam alterações inflamatórias nas vias aéreas nos meses iniciais de treinamento. **Material e Métodos:** Foram realizadas oito avaliações (T0 a T7, julho de 2013 - julho de 2014) de 18 cavalos PSI, machos e fêmeas, de dois anos de idade, pertencentes a um mesmo proprietário e mantidos sob manejo convencional no Jockey Club do Paraná. Os animais foram avaliados por meio de exame físico, seguido de endoscopia respiratória das vias aéreas superiores [folículos linfóides (0 a 4) e movimentação das cartilagens aritenóides (1 a 4)], seguindo até a bifurcação da traqueia (muco traqueal graduado de 0 a 5). Com o endoscópio próximo à carina, coletou-se lavado traqueal (LT) instilando-se 20 mL de solução salina estéril, aspirando-se em seguida, e centrifugando a 340g O *pellet* de células foi utilizado para a avaliação citológica diferencial por meio da coloração de Romanowski (perfil celular) e Azul da Prússia (ocorrência de hemossiderófagos). O sobrenadante do LT foi congelado a -20°C para posterior avaliação da FA e da ureia. Sangue venoso foi colhido para dosagem de ureia sérica para obtenção de fator de diluição e cálculo da atividade da FA no LT. O odor das cocheiras foi avaliado como presença ou ausência de odor de urina. A análise estatística

foi realizada por meio de ANOVA a um critério seguido de teste Tukey de múltipla comparação, e teste de Pearson para correlações, considerando significativo $p < 0,05$. **Resultados:** As avaliações de exame físico, bem como endoscópica das vias aéreas superiores, não evidenciaram alterações, e nem as diferenças nas quantidades de muco traqueal foram significativas entre os momentos. Na avaliação citológica diferencial do LT se evidenciou um aumento de células epiteliais no transcorrer do experimento. Com relação à presença dos neutrófilos, em T1 (60 dias após estabulação e início do treinamento) foi quando se observou o único momento de neutrofilia ($> 20\%$) para o grupo investigado. A percentagem de eosinófilos no LT esteve aumentada nas avaliações 90 e 120 dias após estabulação e início do treinamento. Hemossiderófagos foram identificados no LT no transcorrer do experimento. Houve correlação positiva entre a percepção de odor de urina nas cocheiras e o aumento do percentual de neutrófilos no LT, em T1. Não se encontrou correlação entre a atividade da FA e os achados citológicos. **Conclusão:** Cavalos PSI estabulados e em treinamento para corrida, durante os meses iniciais de treinamento apresentaram inflamação neutrofílica seguida de eosinofílica, ocorrendo elevação crescente no percentual de hemossiderófagos no LT conforme a evolução dos treinamentos. A percepção de odor de urina na cocheira foi relacionada com a inflamação neutrofílica, e não houve relação da FA com os achados citológicos.

Palavras-chave: citologia, endoscopia, equinos, hemossiderófagos, lavado traqueal, neutrófilos.

Abstract

Objective: To evaluate the airways of a group of English Thoroughbred (ETB) racehorses by means of physical examination, endoscopic airway as well as cytological evaluation of tracheal wash (TW) during the first year of training. **Hypothesis.** The young English Thoroughbred horse racing show inflammatory alterations in the airways during the months of training. **Material and Methods:** Eight ratings (T0 to T7, from July 2013 to July 2014) of 18 ETB horseraces were performed, male and female, two years old, belonging to the same owner at the Parana Jockey Club, kept under conventional management in stables. Animals were evaluated by means of physical examination, followed by

endoscopic evaluation of the upper airways [lymphoid follicles (0 to 4) and arytenoid cartilage movement (1 to 4)], following to the tracheal bifurcation (tracheal mucus graded from 0 to 5). With the endoscope next to the carina, TW was collected, instilling up 20 ml of sterile saline solution, aspirating and centrifuging at 340g. The cells pellet was used cytological differential evaluation by means of Romanowski coloring (cellular profile) and Prussian Blue (hemosiderophages). TW supernatant was frozen up to -20°C to future alkaline phosphatase (AP) and urea evaluation. Venous blood was collected to urea dosage, used to obtainment of AP activity in TW. Stables odor was classified by the same researcher as pleasant or as urea odor. Statistical analysis was performed by means of ANOVA following a Tukey multiple comparison test, and Pearson test to correlations, considering significant $p < 0.05$. **Results:** Physical evaluations and endoscopic evaluations of the upper airways showed no changes and no differences in amounts of tracheal mucus were significant between moments. TW cytological differential evaluation evidenced an increase of epithelial cells during the experiment. Regarding the presence of neutrophils, T1 (60 days after stabling and training beginning) was the only moment of neutrophilia (> 20%) for the group investigated. Eosinophils percentage increased at T2 and T3 compared to stabling and training beginning. Hemosiderophages were identified in TW during the experiment. There was a positive correlation between the perception of urine odor in stables and increasing in the percentage of neutrophils in the TW, in T1. Correlations between raisings of the AP activity and cytological findings were not found. **Conclusion:** ETB racehorses, in their first year of training, showed neutrophilic followed by eosinophilic inflammatory pictures in the first months of stabling and training. The odor of the stables was related to the neutrophilic inflammation and as the intensity of the exercises was increased, the percentage of hemosiderophages in the TW also increased. There was no relation of AP to the cytological evaluation.

Keywords: cytology, endoscopy, equine, hemosiderophages, tracheal wash, neutrophils.

3.1. INTRODUÇÃO

Doenças respiratórias constituem a segunda maior causa de atendimento veterinário em cavalos de corrida, sendo que a doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) é a mais comum entre elas (Ivester *et al.*, 2014), podendo acometer até 80% dos cavalos de corrida de dois anos de idade (Malikides *et al.*, 2003).

A DIVA é caracterizada por tosse, redução no rendimento desportivo e aumento da produção de muco traqueal, sendo este último de ocorrência variável e de difícil diferenciação para as doenças infecciosas. O muco traqueal igual ou superior a grau 2 (0-5) interfere na capacidade desportiva de cavalos PSI de corrida (Holcombe *et al.*, 2006).

Adicionalmente, os cavalos com DIVA não apresentam febre nem dificuldade respiratória evidente durante o repouso (Couëtil *et al.*, 2007), podendo acometer cavalos praticantes de qualquer atividade desportiva, sendo mais frequente nos cavalos Puro Sangue Inglês (PSI) de corrida.

Considera-se a avaliação citológica do fluido do LBA para o diagnóstico, com aumento de células inflamatórias, podendo variar entre proporções aumentadas de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos ou mista. Apesar da utilização do LT para o diagnóstico da DIVA ainda ser controverso, é amplamente utilizado para a investigação de inflamação nas vias aéreas, devido à facilidade de execução durante o exame endoscópico, com mínima necessidade de contenção, e pela obtenção de amostras citológicas representativas de vias aéreas mais distais (Hodgson e Hodgson, 2003).

A patogênese da DIVA permanece desconhecida, entretanto o ambiente onde o cavalo vive possui papel importante, pois expõe as vias aéreas à ação de gás amônia, endotoxinas e bolores. Após 90 dias da estabulação observou-se aumento no percentual de neutrófilos no LBA de cavalos da raça Árabe (Holcombe *et al.*, 2001), enquanto 77% dos cavalos PSI de corrida jovens apresentaram perfil citológico do LBA compatível com DIVA após estarem estabulados por 28 dias (Ivester *et al.*, 2014). Michelotto Jr *et al.* (2010) demonstraram que cavalos PSI de corrida jovens apresentam aumento na atividade de macrófagos alveolares após estabulados por 30 dias, sem aumento no número de células inflamatórias no fluido do LBA como no LT, mas após 5 meses de

treinamento esses animais apresentaram alterações inflamatórias pulmonares relacionadas à DIVA.

A participação bacteriana na DIVA não é bem definida. O isolamento do *Streptococcus zooepidemicus* e sua associação com o aumento de muco foi demonstrado (Cardwell *et al.*, 2013), assim como se evidenciou aumento de bactérias associada à quantidade aumentada de neutrófilos na secreção traqueal de cavalos de corrida com tosse (Christley *et al.*, 2001). Portanto, apesar da participação bacteriana na inflamação de vias aéreas inferiores de cavalos de corrida ser descrita, seu papel na etiopatogênese da DIVA ainda precisa ser melhor entendido (Hughes *et al.*, 2013).

Assim, é pertinente o estudo das alterações nas vias aéreas dos cavalos PSI jovens iniciando treinamento, procurando-se melhor entendimento sobre as ocorrências advindas da estabulação e do treinamento. A hipótese do presente estudo é a de que cavalos PSI de corrida jovens apresentam alterações inflamatórias nas vias aéreas nos meses iniciais de treinamento, que poderão ser detectadas através do acompanhamento por exame físico, endoscópico e citológico do LT durante o primeiro ano de treinamento.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob registro 782.

3.2.2 Tipo de Estudo

Foi realizada uma pesquisa transversal descritiva para avaliar as ocorrências em vias aéreas em cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento.

3.2.3 Animais

Foram avaliados 18 cavalos PSI de corrida, machos e fêmeas, com idade entre 18 e 20 meses no início do estudo, pertencentes a um mesmo proprietário. Os cavalos foram acompanhados durante 12 meses no local de treinamento no Jockey Clube do Paraná. Os animais foram devidamente desverminados e vacinados para influenza e herpesvirus 1 e 4, conforme programa estabelecido pelo Médico Veterinário responsável, e foram alojados em baias de alvenaria de 3,0m x 3,5m x 4,0m, com cama de serragem. A alimentação constituiu de ração granulada, aveia laminada, sal mineral e feno de gramínea e/ou alfafa. Os animais foram estabulados em junho. Nesse período foi iniciada a doma desses animais e início do treinamento. Os animais eram levados cinco vezes por semana para a raia para realizar exercícios constituídos de caminhar e trotar distâncias que iniciaram com 1.200m e chegando a 2.000m. Após, teve início a fase do galope, em média de 2.000m. Entre novembro e janeiro deu-se início aos exercícios mais intensos envolvendo velocidade, evoluindo até a estreia dos animais.

3.2.4 Delineamento do estudo

As avaliações foram divididas em tempos (T), onde T0 (tempo zero, julho de 2013), T1 (tempo 1, em agosto de 2013), T2 (tempo 2, em setembro de 2013), T3 (tempo 3, em novembro de 2013), T4 (tempo 4, em fevereiro de 2014), T5 (tempo 5, em março de 2014), T6 (tempo 6, em abril de 2014) e T7 (tempo 7, em julho de 2014). Em cada uma das avaliações foi realizado exame clínico, exame endoscópico das vias aéreas, avaliação citológica do LT e colheita de sangue para mensuração da atividade da FA.

A observação do ambiente foi realizada em todos os tempos conjuntamente com as avaliações clínicas e coleta de sangue. A observação do ambiente foi realizada por meio de vistoria olfativa das cocheiras, feita por uma única pessoa durante toda a pesquisa, classificando-os subjetivamente como 'com odor de urina' ou 'sem odor de urina'.

A avaliação clínica de cada animal baseou-se na anamnese e no exame físico. A anamnese foi direcionada a informações relativas à saúde do sistema respiratório. O exame físico incluiu a observação da presença de secreção nasal, estímulo de tosse

através da pressão dos primeiros anéis traqueais, palpação de linfonodos submandibulares e retrofaringeanos, auscultação cardíaca, traqueal e pulmonar (McGorum e Dixon, 2007) (Anexo 1). Neste momento, também foi coletado sangue venoso para a avaliação da ureia destinada à obtenção de um fator de diluição para a análise da atividade da fosfatase alcalina (FA) no LT (tópico 2.5).

Em cada tempo de avaliação, o exame clínico foi realizado no período da tarde, com os animais em repouso, e contidos pelo cabresto. Os animais foram examinados por uma única pessoa durante todo o experimento para manter a consistência de avaliação. O sangue foi coletado por venopunção da jugular, utilizando-se tubos a vácuo (Vacutainer®) e agulhas hipodérmicas 0,80x25mm (21G), em frascos sem anticoagulante, e mantidos à temperatura ambiente até coagular. Em seguida, os tubos foram centrifugados para separação do soro sanguíneo, que foi estocado em micro tubos a -20°C até o momento da avaliação.

3.2.5 Avaliação endoscópica das vias aéreas

A avaliação endoscópica das vias aéreas foi realizada após a avaliação clínica, com os animais preferencialmente não sedados, sob contenção mecânica. Para isso utilizou-se um fibroscópio flexível (Olympus®) de 170 cm de comprimento e 12,0 mm de diâmetro, para a avaliação das vias aéreas superiores e inferiores até a bifurcação da traqueia. Os animais que eventualmente necessitaram de sedação, receberam cloridrato de xilazina 10% (0.4 mg/kg, IV, sedomin, Laboratório König, Santana da Parnaíba, SP).

Para a avaliação do grau de desenvolvimento de folículos linfóides faríngeos ou hiperplasia folicular linfóide, foi utilizado escore de 0 a 4 segundo Raker e Bowles (1978).

O muco no lúmen traqueal foi graduado por meio de escore de 0 a 5 conforme Gerber *et al.* (2004). Com o endoscópio posicionado próximo à bifurcação da traqueia, foi procedido o LT, para posterior avaliação citológica.

3.2.6 Avaliação Citológica do Lavado Traqueal (LT)

O procedimento LT foi realizado no momento da avaliação endoscópica, e seguiu o protocolo de Mansmann e Knight (1972). Próximo à bifurcação da traqueia (Figura 3.1), com auxílio de uma sonda de polietileno introduzida pelo canal de trabalho do endoscópio, foram instilados 20 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9%, aspirando-se em seguida e acondicionando o volume recuperado em tubo estéril para centrífuga.

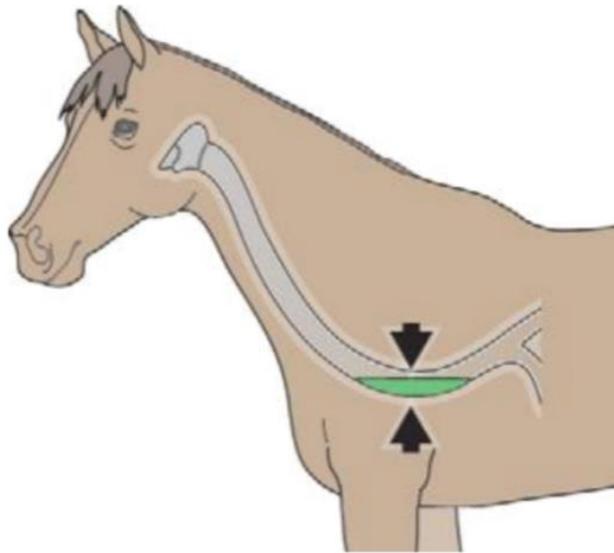


Figura 3.1 – Esquemática do local de coleta de amostras de LT (setas). A parte cranial da traqueia torácica é horizontal e, portanto, local de acumulação das secreções respiratórias e do líquido estilado. Adaptado de Barakzai, 2007.

O processamento ocorreu em menos de 1 h, centrifugando a 340g por seis min (Centrífuga Quimis, São Paulo, Brasil), e o *pellet* de células formado foi utilizado para confecção das lâminas para a avaliação citológica. As lâminas foram fixadas no laboratório próprio da cocheira do haras do Jockey Club do Paraná, depois de fixadas foram enviadas para a Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense em Niterói, para a equipe do professor Nayro Xavier Alencar, onde foram coradas pela técnica de Romanowski (Panótico, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) e avaliadas às cegas. Foram contadas 300 células em aumento de 1.000X (Michelotto Jr. *et al.*, 2010).

Foi considerado achado citológico normal o LT contendo <10% de linfócitos, <1% de eosinófilos e <20% de neutrófilos (Robinson, 2003; Hodgson e Hodgson, 2007).

A avaliação da presença de hemossiderófagos no LT foi realizada por meio da coloração de Azul da Prússia (Doucet e Viel, 2002), e os resultados descritos como percentual de hemossiderófagos que apresentaram hemossiderina no citoplasma.

Para cavalos com secreção mucopurulenta durante a avaliação, ou que apresentavam essa alteração persistente em relação à observação anterior, fez-se colheita de material para cultura, utilizando cateter estéril duplo BD CAT 2.4 m por 6 mm, introduzido através do canal de trabalho do endoscópio, fazendo-se a aspersão de 20 mL de solução salina estéril e recuperando-se o material e encaminhando para o laboratório particular (Laboratório Lanac, Curitiba, Brasil). No laboratório, com o material coletado do LT fez-se uma diluição de 1:2, 1 mL da amostra do LT mais 1 ml do agente mucolítico. Após a diluição, a amostra foi homogeneizada e permaneceu por 15 min em descanso a temperatura ambiente. Após os 15 min. retirou-se 100µl e foi inserido em um tubo com 9,9 ml de salina e para homogeneização. Essa diluição foi semeada por esgotamento com a alça de 10µl em placas de sangue/ *MacConkey* e chocolate. As placas de Agar sangue/*MacConkey* foi incubada a 35°C por 24 e 48 horas e a de Agar chocolate a 35°C em tensão de CO₂ por 24 a 48 horas. Após as 24 horas foi observado se houve crescimento, quando não observado o crescimento foi reincubado e observado no dia seguinte, com 48 horas de incubação. Quando ocorreu o crescimento foi procedida a identificação e a antibiograma, e quando não ocorreu o crescimento o liberou-se o resultado como negativo.

3.2.7 Fosfatase Alcalina (FA)

As amostras de sangue venoso foram coletadas por venopunção da jugular, utilizando-se tubos a vácuo (Vacutainer®) e agulhas hipodérmicas 0,80x25mm (21G). O sangue coletado em tubos a vácuo sem anticoagulante foram mantidos à temperatura ambiente até coagular. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 340 g por 6 min para separação do soro sanguíneo, que foi armazenado em micro tubos a -20°C até o momento da avaliação.

A concentração da ureia, necessária para a determinação da atividade da FA, foi determinada por meio de espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático

Bioplus 2000®, São Paulo, SP), utilizando-se kits Ureia UV (Analisa®, Belo Horizonte, MG).

A atividade da FA e a concentração da ureia foram realizadas a partir de alíquotas do sobrenadante do LT, centrifugadas a 800 g por cinco min (centrífuga FANEM® modelo 206R) e, em seguida, acondicionadas em micro tubos a -20°C. Todas as amostras foram analisadas por espectrofotometria (analisador bioquímico semiautomático Bioplus 2000®, São Paulo, SP), utilizando-se kits Fosfatase Alcalina (Analisa®) e Ureia UV (Analisa®), respectivamente.

As determinações da concentração da ureia no soro sanguíneo e no sobrenadante do LT foram necessárias para corrigir a diluição causada pelo LT e estimar a atividade da FA no LT. Para se calcular a atividade da FA no LT foi utilizada a seguinte fórmula, conforme descrito por Porto *et al.* (2010).

Atividade da FA no LT = FA no LT x Fator de correção da diluição (FD), onde FD = Ureia no soro sanguíneo/ Ureia no sobrenadante do LT, sendo apresentada em UI/L = $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$.

3.2.8 Análise Estatística

A avaliação da normalidade dos dados foi realizada com teste de D'Agostino e Pearson. A variação no desenvolvimento de folículos linfóides faringianos, bem como nos graus de muco traqueal, entre os momentos T0 e T7, foi analisada utilizando teste de Mann Whitney. Os dados de citologia diferencial foram analisados utilizando teste de Análise de Variância (ANOVA) a um fator, seguido de teste de Tukey de múltipla comparação para a análise dos resultados obtidos entre os momentos de avaliações. O teste de correlação de *Spearman* foi empregado para a avaliação da correlação entre achados citológicos e avaliação do ambiente de cocheira. Para todas as análises se utilizou o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para *Windows* (*GraphPad Prism*, San Diego, CA, USA), considerando significativo valores de $p < 0,05$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média.

3.3.RESULTADOS

3.3.1 Animais

Dentre os 18 cavalos que iniciaram o estudo, alguns foram retirados ao longo do estudo, devido a óbito (um caso), problema locomotor (7 casos), e venda (um caso). Assim, o estudo chegou ao seu final com um número total de 9 cavalos (1 fêmea e 8 machos). Todos os cavalos foram avaliados enquanto estavam disponíveis.

Durante o estudo, alguns animais apresentaram ocorrências respiratórias que necessitaram de tratamento, envolvendo aumento de linfonodos, tosse, e evidência de secreção mucopurulenta na avaliação endoscópica. Esses receberam penicilina IM ou oxitetracilina IV em solução salina, por sete dias. Durante o período do estudo, onze cavalos dentre os investigados correram um total de 20 corridas.

3.3.2 Avaliação do Ambiente

A percepção de odor de urina nas cocheiras correlacionou de forma positiva com os achados de neutrofilia no LT, na avaliação realizada em T1 ($p = 0,001$, $r=0,6094$).

3.3.3 Avaliação Clínica

Os parâmetros de exame físico (Figura 3.2) investigados permaneceram dentro dos valores de normalidade durante todo o período do estudo, não havendo diferenças entre os tempos.

Todos os animais apresentaram secreção serosa nas narinas em todos os tempos de avaliação.

A amplitude respiratória foi normal em todos os tempos da avaliação. O tipo de respiração observada em todos os cavalos foi a costoabdominal e o modo de respiração foi eupneica, conforme se espera de cavalos normais.

3.3.4 Avaliação endoscópica das vias aéreas

Durante a avaliação endoscópica das vias aéreas (Figura 3.2) a maioria dos cavalos permitiu a realização do exame com contenção mecânica. Ao longo do estudo

foram necessárias oito sedações em um total de 109 avaliações, ou seja, 7,3% das avaliações foram feitas sob sedação.

Os graus observados para o desenvolvimento dos folículos linfóides foram reduzindo gradativamente do início ao final do estudo, sendo que foi menor em T7 em relação a T0 ($1,6 \pm 0,9$ vs. $2,4 \pm 0,7$, $p = 0,015$) (Tabela 3.1).

Todos os animais apresentaram movimentação normal das cartilagens aritenoideas (graus 1 e 2), o que se seguiu durante todo o estudo.

Com relação à observação de muco traqueal, também reduziu ao longo do estudo, mas sem diferença entre os tempos investigados. A observação da presença de muco traqueal ≥ 2 durou em média 9,8 semanas. A Tabela 3.1 mostra os achados para a graduação média para as observações de folículos linfóides faringianos e muco traqueal, bem como a quantidade de animais com graduação de muco igual ou maior que 2, a cada avaliação realizada.

Tabela 3.1 – Graduação média de folículos linfóides faringianos e muco traqueal de potros Puro Sangue Inglês de corrida durante os meses iniciais de treinamento. A graduação da hiperplasia folicular linfóide (HFL) foi de 1 a 4 e das quantidades de muco traqueal de 0 a 5.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
HFL	2,4 \pm 0,7	2,2 \pm 0,8	2,5 \pm 0,6	2,0 \pm 0,4	1,6 \pm 0,8	1,7 \pm 0,6	1,6 \pm 0,5	1,6 \pm 0,8
Muco	2,2 \pm 1,5	1,7 \pm 1,2	2,1 \pm 1,6	1,4 \pm 1,4	1,5 \pm 1,3	2,3 \pm 1,2	1,6 \pm 1,6	1,3 \pm 1,3
Cavalos muco ≥ 2	9/18	9/18	10/18	8/17	3/13	3/13	6/11	4/9
Cavalos/Total (%)	(47,4)	(50,0)	(55,6)	(47,1)	(23,1)	(23,1)	(63,6)	(44,4)

A avaliação citológica diferencial do LT (Figura 3.4), mostrou que a quantidade de células epiteliais foi maior em T3 ($p = 0,0003$), T4 ($p = 0,0002$) e T7 ($p = 0,006$) em relação a T0, conforme mostra a Tabela 3.2. Houve uma correlação negativa entre a quantidade de células epiteliais em relação à de macrófagos ($p = 0,007$, $r = -0,8810$) e neutrófilos ($p = 0,037$, $r = -0,7619$).

Tabela 3.2 – Avaliação citológica diferencial do lavado traqueal de cavalos Puro Sangue Inglês de corrida durante o primeiro ano de treinamento, avaliados em julho (T0), agosto (T1), setembro (T2) e novembro (T3) de 2013, fevereiro (T4), março (T5), abril (T6) e julho (T7) de 2014. Resultados apresentados em percentual médio \pm desvio padrão da média.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Células Epiteliais %	14,5 ± 14,7	15,6 ± 15,6	14,0 ± 22,9	58,5 ± 27,8 ^π	63,6 ± 27,3 ^π	33,6 ± 24,7	56,9 ± 22,3	70,6 ± 37,8 ^π
Eosinófilos %	0,2 ± 0,4	0,5 ± 1,2	5,1 ± 13,6	4,1 ± 9,1 ^π	0,9 ± 1,5	0,8 ± 1,3	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,4
Neutrófilos %	17,9 ± 19,4	27,2 ± 20,3	16,9 ± 13,5	10,9 ± 21,2 ^π	3,9 ± 4,9 ^π	12,0 ± 17,4	1,0 ± 1,2 ^{π,§}	1,6 ± 2,6 ^{π,§}
Linfócitos %	7,2 ± 4,3	8,8 ± 5,4	10,6 ± 4,5	3,9 ± 2,7	5,8 ± 6,7	5,2 ± 1,8	7,4 ± 3,7	2,7 ± 2,2
Macrófagos %	58,1 ± 20,7	47,8 ± 19,6	54,9 ± 20,3	22,6 ± 21,2	25,5 ± 18,2	48,0 ± 15,9	34,8 ± 21,3	25,0 ± 35,7
Macrófagos Multinucleados %	0,0	0,3 ± 0,8	0,5 ± 0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Os símbolos de diferença estatística estão relacionados a outros tempos de avaliação para o mesmo tipo celular.

O percentual médio de eosinófilos na citologia do LT foi maior em T3 em relação a T0 ($p = 0,004$), T6 ($p = 0,019$) e T7 ($p = 0,030$). Em T1, dois animais apresentaram aumento no número percentual de eosinófilos (3,0% e 3,5%), três animais em T2 (3,5%, 41,0% e 41,0%), e sete em T4 (2,3%, 3,0%, 10,3%, 2,0%, 3,0%, 1,5% e 34,5%). O animal que apresentou 3,5% de eosinófilos no LT na avaliação em T2, também havia apresentado 3,0% em T1, bem como 1,5% e 2,0% em T3 e T4, respectivamente. Um dos animais que havia apresentado 41,0% em T2 apresentou 34,5% em T3, e em seguida zerou e se manteve até o final do estudo. Ainda, mais outro animal apresentou 4% de eosinófilos no LT em T4, repetindo em T5 e zerando até o final, como mostra o Gráfico 3.1

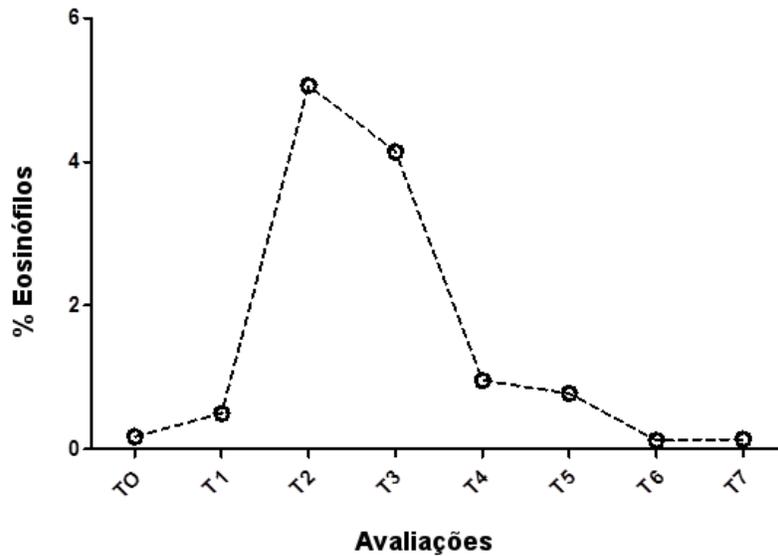


Gráfico 3.1 – Variação no percentual de eosinófilos no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento, através da coloração de Romanowski.

Com relação à presença dos neutrófilos no LT, em T0 o valor médio estava dentro da normalidade para cavalos saudáveis (<20%) (Tabela 3.1).

A quantidade de neutrófilos atingiu a maior média do estudo em T1, durante o início do treinamento, sendo esta a única avaliação cuja média foi maior do que o limite máximo 20%, considerado para cavalos hígidos (Gráfico 3.2).

O percentual de neutrófilos na avaliação do LT foi menor nos tempos T3 ($p = 0,004$), T4 ($p < 0,0001$), T6 ($p = 0,0002$) e T7 ($p = 0,002$) em relação a T1, sendo que em T6 e T7 foram menores que T0 e T2 ($P < 0,001$). Houve correlação positiva entre a percepção de odor de urina nas cocheiras e o aumento do percentual de neutrófilos no LT, em T1 ($p = 0,001$, $r = 0,6094$).

Com relação aos linfócitos, o percentual médio em T3, T4 e T7 foi menor do que em T2. Em T2, durante o momento de avaliação, a quantidade de linfócitos foi maior que o limite superior considerado para cavalos normais (Tabela 3.2).

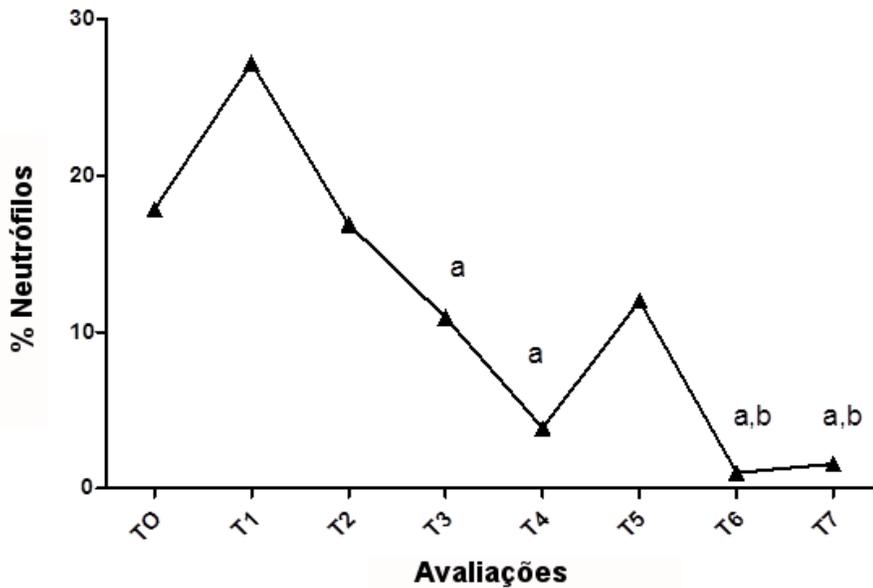


Gráfico 3.2 – Variação no percentual de neutrófilos no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento, através da coloração de Romanowski. ^ap < 0,01 vs. T1 e ^bp < 0,001 vs. T0 e T2.

A presença de hemossideróforos no LT foi observada desde o início do estudo (Gráfico 3.3), sendo que na primeira avaliação (T0) houve 36,4% a menos de macróforos com hemossiderina em relação ao momento de maior detecção que foi em T6. Observou-se também queda no percentual de hemossideróforos no momento T2, sendo 55,8% menor em relação a T1 ($p = 0,008$). A partir da terceira avaliação, houve aumento crescente no percentual de hemossideróforos no LT em relação à avaliação anterior, sendo de 21,3% (T3 em relação a T2), 27,7% (T4 em relação a T3), 30,0% (T5 em relação a T4) e 23,9% (T6 em relação a T5). Nas avaliações em T6 ($p = 0,016$) e T7 ($p = 0,009$) houve maior número de hemossideróforos em relação ao momento T2.

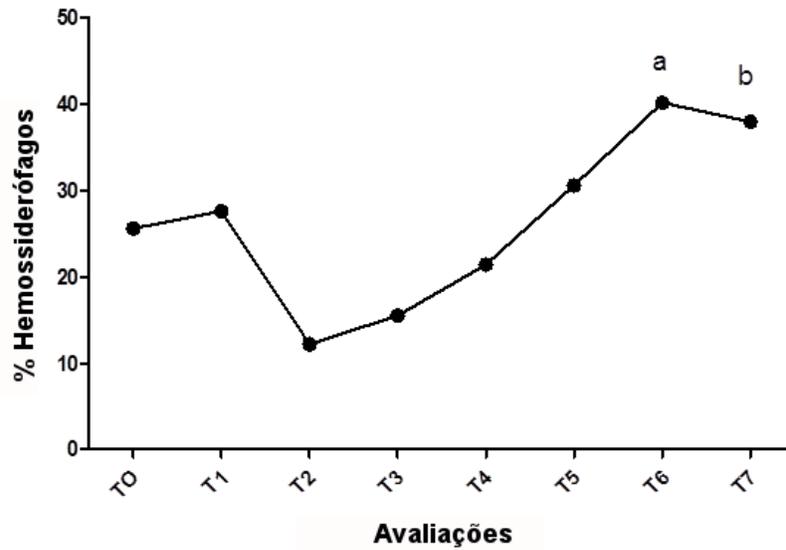


Gráfico 3.3 – Variação no percentual de hemossiderófagos no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento, por meio da coloração de Azul da Prússia. ^ap = 0,016 vs T2 e ^bp = 0,009 vs T2.

3.3.5 Fosfatase Alcalina

A atividade da FA no LT foi maior nas avaliações em T4, T5 e T6, em relação a T0, como mostra o Gráfico 3.4.

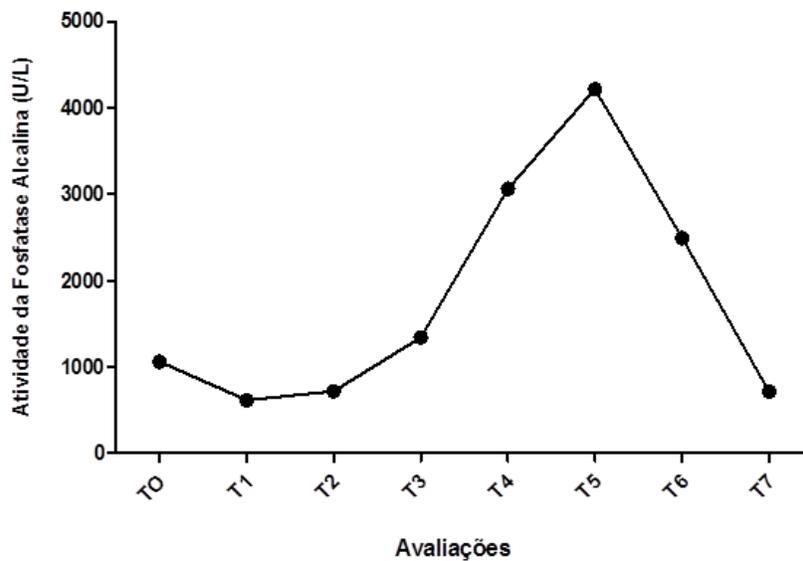


Gráfico 3.4 – Variação no percentual de FA no LT de cavalos PSI de corrida durante o primeiro ano de treinamento

3.3.6 Cultura Bacteriana

Foram realizadas colheitas de material para cultura bacteriana em cinco cavalos, em função especialmente do exame endoscópico ter revelado quantidade exacerbada de secreção com aspecto mucopurulento e consistência viscosa na traqueia. Os animais também estavam com corrimento nasal mucopurulento e tosse. Essa colheita aconteceu durante dois tempos, T3 foi coletado material de um animal, com crescimento de *Streptococcus equi*. Em T5 foi necessário coletar amostra de quatro animais para cultura, sendo que desses, uma cultura foi negativa e nas outras foram encontradas *Pseudomonas Aeruginosa*, *Aspergillus sp* e *Acinetobacter Lwoffii*.

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo pode-se evidenciar alterações importantes nas vias aéreas dos cavalos de corrida durante o primeiro ano de treinamento, e o LT, associado ao exame físico e endoscopia, foi uma técnica de avaliação citológica útil. Pode-se demonstrar que, 30 dias após serem inseridos no regime de estabulação apresentaram um quadro de neutrofilia, que resolvido deu vez a uma reação eosinofílica. Este estudo levanta questões importantes a serem investigadas futuramente, como a participação específica do ambiente ou, mais especificamente ainda, o envolvimento de alérgenos presentes na cama de serragem ou no feno nas alterações encontradas.

Além do ambiente, deve-se entender melhor a influência dos fatores desencadeadores de estresse nos resultados observados no presente estudo. Apesar de não ter ocorrido alteração nos níveis de cortisol em relação à mudança de manejo e estabulação em estudo anterior (Aurich *et al.*, 2015), isso não foi realizado em cavalos PSI de corrida jovens nas condições dos avaliados no presente estudo, sendo que isto precisa ser investigado e melhor entendido.

A partir do momento que entraram no estábulo, o programa imunoprofilático adotado prevê a vacinação contra influenza equina e herpesvirus tipos 1 e 4, mas o manejo preventivo prévio certamente variou, já que nove dos animais investigados foram adquiridos em leilões em outros estados, foram provenientes de diferentes criatórios e enfrentaram, além da preparação para os leilões, as viagens de caminhão. Esses

estiveram em maior risco de acúmulo e desenvolvimento de bactérias patogênicas nas vias aéreas (Raidal *et al.*, 1997), bem como a exacerbação de virose como o herpesvirus tipo 4 (Badenhorst *et al.*, 2015), em função do transporte e fatores estressantes decorrentes dos leilões.

Essas questões poderão resultar em medidas profiláticas e curativas a serem empregadas no início da vida desportiva, apesar de que a influência dos achados encontrados no presente estudo, na capacidade desportiva desses cavalos em corrida, ainda precisa ser melhor entendida. Sabe-se que algumas manifestações das doenças respiratórias, tais como o aumento de muco traqueal, influencia a capacidade desportiva (Holcombe *et al.*, 2006), mas não se sabe o quanto podem estar relacionados aos achados observados nos primeiros meses de estabulação.

Ainda, deve-se entender melhor a possível influência das diferentes estações do ano nos achados do presente estudo. Em T1 observou-se o único momento de neutrofilia no LT (>20%), sendo que no presente estudo essa avaliação ocorreu durante o inverno. Riihimäki *et al.* (2008) investigaram a quantidade de poeira no ambiente e mediadores inflamatórios no LBA, e observaram que para os cavalos estabulados durante o inverno havia maiores quantidades de 1,3- β -glucanos no ambiente coincidindo com um aumento da quantidade de neutrófilos no LBA. Considerando o presente estudo, a traqueia e os brônquios principais são mais expostos ao meio externo e à ação de agentes nocivos, e por este motivo a resposta imunológica normalmente é mais acentuada (Hodgson e Hodgson, 2007). Contudo, apesar do inverno na Suécia (Riihimäki *et al.*, 2008) ser mais rigoroso que o inverno no Brasil, a resposta imunológica nas vias aéreas, entre os estudos, foi semelhante.

Ainda, a presença de endotoxina bacteriana ou gás amônia provenientes da urina podem ter influenciado nos achados. Apesar de não ter sido quantificada no presente estudo, sabe-se que ocorrem níveis elevados de endotoxina bacteriana no ambiente da cocheira (Clements e Pirie, 2007) que, inalada recruta neutrófilos para as vias aéreas de forma dose dependente (Pirie *et al.*, 2002).

Também, o gás amônia proveniente da urina acumulada na cama, pode resultar em inflamação traqueal neutrofílica (Malikides e Hodgson, 2003). No presente estudo se utilizou a percepção do odor de urina nas cocheiras, que apesar de avaliação subjetiva,

é realizada prontamente podendo indicar um risco para a ocorrência de inflamação em vias aéreas, como observado no presente estudo, indicando a necessidade para uma limpeza imediata da cama e cocheira.

A terceira (T2) e quarta (T3) avaliações evidenciaram uma resposta inflamatória eosinofílica nas vias aéreas. Este achado pode ser transitório (Viel e Hewson, 2003; Santos *et al.*, 2007), e de fato houve redução sem intervenção. Em populações semelhantes, isso foi observado no fluido do LBA no primeiro mês de estabulação relacionado ao fornecimento do feno em rede (Ivester *et al.*, 2014), e também no fluido de LT e de LBA em avaliação realizada após 30 dias de estabulação (Michelotto Jr., 2010). Provavelmente ocorreu uma resposta alérgica do tipo Th-2 frente à poeira e agentes ambientais inalados. Nenhum dos estudos investigou os agentes ambientais envolvidos. Apesar de poder interferir com o rendimento desportivo (Hare e Viel, 1998), a eosinofilia nos potros investigados foi observada em T2 e T3, mas não se sabe a influência destes achados no desempenho desportivo futuro.

A quantidade de células epiteliais aumentou durante todo o estudo. Apesar desse aumento poder estar relacionado à possível ocorrência de virose respiratória, pode constituir um achado comum nas amostras de LT colhidas com o auxílio do endoscópio (Viel e Hewson, 2003; Lessa *et al.*, 2007).

O aumento na quantidade de linfócitos no momento T2 (>10%), posterior à neutrofilia e juntamente à observação de eosinofilia no LT, leva a crer que os linfócitos apresentam um papel que pode ser importante na resposta inflamatória nas vias aéreas de cavalos de corrida jovens em início de treinamento, o que deve ser melhor estudado.

Em populações de cavalos de corrida semelhantes à investigada no presente estudo, sabe-se da participação de agentes microbianos, mas sem de fato saber o papel deles na inflamação respiratória desses animais (Hughes, 2013). As bactérias podem colonizar as vias aéreas dos cavalos de corrida sem causar um quadro característico de infecção, permanecendo de forma silenciosa. No presente estudo não se pode associar a presença de bactérias ou fungos a outros achados endoscópicos ou citológicos, como anteriormente se encontrou uma associação entre quantidades aumentadas de muco com o isolamento de *Streptococcus zooepidemicus* (Cardwell *et al.*, 2013), ou a relação entre tosse e presença de neutrófilos com bactérias fagocitadas (Christley *et al.*, 2001).

No presente estudo não se realizou a investigação seriada da presença de agentes microbianos, mas se estabeleceu colher material para cultura quando da necessidade em função de achados endoscópicos de quantidades aumentadas de secreção mucopurulenta. Interessantemente, as necessidades de colheitas foram entre meio de novembro e início de março, no final da primavera e todo o verão, que são épocas mais quentes e úmidas, o que favorece o crescimento de bactérias e fungos.

Com relação à presença de fungos, especificamente o *Aspergillus*, é bastante importante se entender a participação deles nos quadros observados no presente estudo, e o risco de influência na capacidade respiratória desportiva dos cavalos de corrida. O *Aspergillus* foi demonstrado estar significativamente mais presente no LT, em cavalos estabulados, naqueles portadores de obstrução recorrente das vias aéreas em relação aos cavalos saudáveis (Xavier *et al.*, 2014).

Todos os animais foram avaliados por uma mesma equipe e a auscultação foi feita por um único médico veterinário, para se manter a consistência. A opção foi a de examinar os cavalos em repouso, com o intuito de se identificar as alterações presentes, que não apresentavam manifestações clínicas evidentes, e que podem interferir na saúde e capacidade desportiva. De fato, no exame físico os parâmetros investigados permaneceram dentro dos valores de normalidade durante todo o estudo, demonstrando a necessidade de exames complementares para a avaliação respiratória dos cavalos atletas.

Apesar de não ser possível avaliar a ocorrência de sangramento pulmonar decorrente do exercício no exame endoscópico realizado durante o repouso, a quantidade de hemossiderófagos no LT possibilitou relacionar o desenvolvimento da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício. Interessante que se observou número expressivo de hemossiderófagos no LT dos animais investigados no momento inicial do estudo. A ligação entre a hemorragia e a inflamação pulmonar tem sido demonstrada (Newton e Wood, 2002; Michelotto Jr. *et al.*, 2011). Anteriormente, a presença de hemossiderófagos no fluido do LBA foi correlacionada com a maior atividade do fator de ativação plaquetária, bem como com a maior concentração de proteínas e hidroperóxidos lipídicos nos cavalos PSI jovens em treinamento para corrida (Michelotto Jr. *et al.*, 2011). Possivelmente, o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar causada pelo

processo inflamatório possa ter permitido a passagem de eritrócitos para o espaço alveolar, o que exacerbaria a inflamação nas pequenas vias aéreas (Erickson e Poole, 2007) e tecido pulmonar (Derksen *et al.*, 2009). Houve uma redução nas quantidades de hemossiderófagos de T0 a T2, coincidindo a redução nas quantidades de neutrófilos no LT. Em seguida, a quantidade de hemossiderófagos no LT dos cavalos examinados aumentou até o final do estudo. Na presente pesquisa não se investigou o efeito direto do exercício sobre os achados observados, mas considerando-se que todos os animais eram cavalos jovens (2 anos de idade), em preparação para corrida, o treinamento evoluiu ao longo do estudo para todos os animais investigados.

3.5 CONCLUSÃO

A hipótese do presente estudo foi confirmada, pois os cavalos PSI jovens investigados apresentaram, durante os meses iniciais de treinamento, processo inflamatório neutrofílico nas vias aéreas no segundo mês após a estabulação, seguido de inflamação eosinofílica. Houve uma elevação crescente na quantidade de hemossiderófagos no LT até o final do estudo. Não houve relação da FA com os achados citológicos.

CAPITULO 4

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários fatores inerentes aos equinos PSI de corrida, tais como a vontade de ganhar e correr, sua força, potência e velocidade tem grande influência no sucesso nas competições e na performance destes animais. Mas fatores como as doenças respiratórias, inclusive a DIVA e a HPIE, podem influenciar significativamente na carreira destes cavalos atletas. Os resultados obtidos nas ferramentas de avaliação, como a observação do ambiente que estes animais habitam, o manejo dos mesmos, a avaliação clínica e endoscópica com LT podem ser utilizados como subsidio a proprietários e treinadores para elaborar protocolos de treinamento a integridade física dos cavalos atletas.

A observação do ambiente em que os cavalos habitam durante o período de treinamento e o manejo destes animais se mostrou um método eficiente de prevenção para futuros problemas respiratórios que esses animais possam a vir desenvolver. O que fica evidente neste estudo é que esses resultados relacionados ao ambiente e manejo não se atenham somente ao meio acadêmico, que possam ser divulgados por meio de apostilas e cursos dirigidos aos funcionários dos haras.

O LT constitui um método rápido, fácil e de baixo custo importante para a investigação das afecções do trato respiratório dos cavalos em treinamento para corrida. É uma técnica que permite a visualização e coleta de amostras respiratória destes animais. Neste estudo ficou claro a necessidade de uma padronização dos materiais, equipamentos, procedimentos de colheita e processamento das amostras, para que o resultado seja o mais fidedigno possível, para assim sermos capazes de utilizar as informações em prol destes animais. Sem esquecer que apesar do leque de exames complementares que estão acessíveis atualmente, uma excelente e completa anamnese e um correto exame físico são instrumentos de grande importância e significância para o reconhecimento do problema, e assim estabelecer uma futura abordagem para o bem-estar e saúde dos cavalos.

REFERÊNCIAS

Adler, K.B. Regulation of mucus secretion in the airway epithelium. Proceedings of the Third World Equine Airways Symposium, Cornell University, Ithaca, 2005, 20-22: 31-32.

Ainsworth, D. M. Sistema Respiratório. In: Reed, S. M. Medicina Interna Equina. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000: 228-230.

Ainsworth, D.M. e Cheetham, J. . Disorders of the respiratory system: diagnostic approach to respiratory disorders. In S.M. Reed, W.M. Bayly, e D.C. Sellon, Equine Internal Medicine . St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders. 2010: 289-341

Art, T.; Lekeux, P. Exercised-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. Livestock Production Science, 2005, 92: 101-111.

Aurich, J.; Wulf, M; Ille, N.; Erber R; von Lewinski M.; Palme R. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. Domestic Animal Endocrinology. 2015, 52: 11–16.

Badenhorst, M.; Patrick Page, P.; Ganswindt, A.; Laver, P;; Alan Guthrie A.;Schulman, M. Detection of equine herpesvirus-4 and physiological stress patterns in Young Thoroughbreds consigned to a South African auction sale. BMC Veterinary Research 2015: 11:126.

Barakzai . Treadmill endoscopy. In B. McGorum, P. Dixon, E. Robinson, & J.Schumacher, Equine Respiratory Medicine and Surgery, Saunders, 2007: 235-241.

Bailey, C.J., Reid, S.W.J., Hodgson, D.R. and Rose, R.J. (1999) Factors associated with time until first race and career duration for Thoroughbred racehorses. American Journal of Veterinary Research 1999, 60: 1196-1200.

Beech, J. Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. *Veterinary Pathology*, 1975,12: 157-164.

Beech, J. Tracheobronchial aspirates. In: Beech J. (ed). *Equine respiratory disorders*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991: 41-53.

Berndt, A.; Derksen, F.J.; Robonson, N.E. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *The Veterinary Journal*, 2008.

Brazil, T. A practitioner's guide to bronchoscopy in the horse. *Proceedings of the European Veterinary Conference: Voorjaarsdagen, Amsterdam, the Netherlands, 2010, 22-24: 277-278*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).

Biava, J.S. Avaliação Clínica, Endoscópica e Citológica da Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício (EIPH) em Cavalos da Raça Quarto de Milha. Botucatu, 2007. 107f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatú, SP, Brasil, 2007.

Birks, E.K.; Mathieu-Costello, O.; Fu, Z.; Tyler, W.S.; West, J.B. Very high pressures are required to cause stress failure of pulmonary capillaries in Thoroughbred racehorses. *Journal of Applied Physiology*, 1997, 82: 1584-1592.

Birks, E., Shuler, K., Soma, L., Martin, B., Marconato, L., Del Piero, F., . EIPH: postrace endoscopic evaluation of Standardbreds and Thoroughbreds. *Equine Veterinary Journal*, 2002, 34, 375-378.

Burrell, M.H.; Wood, J.L.; Whitwell, K.E.; Chanter, N.; Mackintosh, M.E.; Mumford, J.A. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationship between disease and viruses, bacteria and environment. *Veterinary Record*,1996,139,(13): 308-313.

Capelli A, Lusuardi M, Cerutti C.G.; Donner C.F. . Lung alkaline phosphatase as a marker of fibrosis in chronic interstitial disorders. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1995, 55, (1): 249-253.

Cardwell, J.M., Wood, J.L.N., Smith, K.C., Newton, J.R. Descriptive results from a longitudinal study of airway inflammation in British National Hunt racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 2013, 43, (6): 750-755.

Chapman, P.S.; Green, C.; Main, J.P.; Taylor, P.M.; Cunningham, F.M.; Cook, A.J.; Marr, C.M. Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Veterinary Record*, 2000, 146, (4): 91-95.

Christley R. M.; Hodgson, D.R.; Rose, R.J.; Reid, S. W. J.; Hodgson, J. L. Comparison of bacteriology and cytology of tracheal fluid samples collected by percutaneous transtracheal aspiration or via an endoscope using a plugged guarded catheter. *Equine Veterinary Journal: Londres*, 1999, 31,(3):197-202.

Christley, R.M., Hofgson, D.R., Rose, R.J., Hodgson, J.L., Wood, J.L.N., Reid, S.W.J. Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings, *The Veterinary Record*, 2001: 99-104.

Christley R. M, Rush, B.R. Inflammatory airway disease. In: McGorum, B.C, Dixon, P.M., Robinson, N.E, Schumacher, J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007: 591-599.

Clements, J.M.; Pirie, R.S. Respirable dust concentrations in equine stables. Part 2: the benefits of soaking hay and optimizing the environment in a neighboring stable. *Research in Veterinary Science*, 2007, 83: 263-268.

Cobben N.A, Drent M, Jacobs J.A, Schmitz M.P, Mulder P.G, Henderson R.F, Wouters E.F, van Dieijen-Visser M.P.. Relationship between enzymatic markers of pulmonary cell damage and cellular profile: A study in bronchoalveolar lavage fluid. *Experimental Lung Research*, 1999, 25, (2):99-111, doi:10.1080/019021499270321.

Costa, M.F.M.; Thomassian, A.; Gomes, T.S.. Estudo da Hemorragia Pulmonar induzida por esforço (HPIE) em cavalos de corrida PSI através da análise de 1889 endoscopias respiratórias após corrida. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 2004, 11, (3): 89-91.

Couëtil, L.L.; Denicola, D.B. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. *Equine Veterinary Journal Suppl*, 1999, 30: 77-82.

Couëtil, L.L. IAD: Cough, poor performance, mucus in the airways – what is so important about that *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 2002, 48: 200-207.

Couëtil, L.L. Inflammatory airway disease and clinical exercise testing. . *Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: Functional significance*, 2003, 9: 84-86.

Couëtil, L.L., Hinchcliff, K.W. Non-infectious diseases of the lower respiratory tract. In: HINCHCLIFF, K.W., KANEPS, A.J., GEOR, R.J. (Org.). *Equine Sports Medicine and Surgery*, 2004, 1: 613-654.

Couëtil, L.L.; Hoffman, A.M.; Hodgdon, J.; Buechner-Maxwell, V.; Viel, L.; Wood J.L.N.; Lavoie, J.P. Inflammatory airway disease of horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2007, 21: 356-361.

Couëtil, L.L., Hawkins J. The coughing horse: chronic cough. In: *Respiratory diseases of the horse*. Manson Publishing, 2013, 86-101.

Deconto, I. Zytologische und bakteriologische untersuchungen des trachea-bronchialsekretes bei chronisch lungenkranken pferden. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Hannover (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Hannover). 1983.

Derksen, F.J., Brown, C.M., Sonea, I.. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Veterinary Journal* 1989, 21: 23-26.

Derksen, F.J.; Robinson, N.E. Overview of the equine respiratory system. In: LEKEUX, P. *Equine Respiratory Disease*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/>. Acesso em: abril 2009

Derksen, F.J., Williams, K.J., Pannirselvam, R.R., de Feijter-Rupp, H., Steel, C.M., Robinson, N.E., Regional distribution of collagen and haemosiderin in the lungs of horses with exercise-induced pulmonary haemorrhage. *Equine Veterinary Journal*. 2009: 41, 586–591.

Dixon, P., McGorum, B., & Pirie, R. Inflammatory Airway Disease: European Clinician's Perspective. In A. Hoffman, N. Robinson, & J. Wade (Ed.), *Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*, Havemeyer Foundation Monograph series No. 9 (pp. 7-8). Boston, USA: R & W Publications (Newmarket) Ld, 2003.

Doucet, M. Y. & Viel, L.. Alveolar macrophage graded hemosiderin score from bronchoalveolar lavagem in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage and controls. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2002,16: 281-286.

Durando, M. . Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012: 192-193.

Dyce, K.M. Sach, W.O. Tratado de anatomia veterinária. Rio de Janeiro, Elsevier, 3 edição. 2004: 505-507.

Elfman, L.; Riihimäki, M.; Pringle, J.; Walinder, R. Influence of horse stable environment on human airways. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2009, 4, (10): 1-7.

Epp, T.S., McDonough, P., Padilla, D.J., Gentile, J.M., Edwards, K.L., Erickson, H.H., Poole, D.C.,. Exercise-induced pulmonary haemorrhage during submaximal exercise. *Equine Veterinary Journal* ,2006 ,36 (Suppl.): 502–507.

Erickson, H.H.; Poole, D.C. Exercise-induced pulmonary hemorrhage: current concepts. In: Lekeux, P. *Equine Respiratory Disease*. Ithaca, EUA: International Veterinary Information Service,2007. Doc. B0320.0102. Disponível em: < http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/erickson/chapter.asp?LA=1.

Evans, T.W.; Chung, K.F.; Rogers, D.F.; Barnes, P.J. Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms. *Journal of Applied Physiology*,1987, 63, (2): 479-484.

Feitosa, F.L..F. *Semiologia veterinária, A arte de diagnóstico*.São Paulo, Rocca, 2004: 313-320.

Fernandez, N.J.; Kidney, B.A. Alkaline phosphatase:beyond the liver. *Veterinary Clinical Pathology*, 2007, 36, (3): 223-233.

Gerber, V. Mucus in equine lower airway disease. In: Viel, L.; Robinson, N.E.; Ducharme, N.G.; McGorum, B.C. (Eds.). *Proceedings of the 2nd World Equine Airways Symposium*. Scotland,Edinburg, 2001. Disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/weas/2001/Gerber.pdf>.

Gerber, V., Straub, R., Marti, E., Hauptman, J., Herholz, C., King, M., Imhof, A., Tahon, L., Robinson, N.E. 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.

Gerber, V. Chronic cough. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 2008: 55-57.

Getty, R. *Anatomia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1986: 466-489.

Gonçalves, R.C. Semiologia do sistema respiratório. In F.L.F. Feitosa, *Semiologia Veterinária, a Arte do Diagnóstico*. São Paulo: Editora Roca. , 2004: 314-331.

Hare, J.E.; Viel, L. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1998, 12, (3): 163-170.

Henderson R.F.;, Scott G.G.; Waide J.J. . Source of alkaline phosphatase activity in epithelial lining fluid of normal and injured F344 rat lungs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995, 134, (1):170-174.

Hewson, J.; Viel, L. Sampling, Microbiology and Cytology of the Respiratory Tract. In: *Equine Respiratory Diseases*, P. Lekeux (Ed.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. (2002).

Hinchcliff, K.W.; Jackson, M.A.; Morley, P.S.; Brown, J.A.; Dredge, A.E.; O'Callaghan, P.A.; McCaffrey, J.P.; Slocombe, R.E.; Clarke, A.E. Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage and performance in Thoroughbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2005a, 227, 5: 768-774.

Hinchcliff, K.W.; Jackson, M.A.; Brown, J.A.; Dredge, A.E.; O'Callaghan, P.A.; McCaffrey, J.P.; Morley, P.S.; Slocombr, R.E.; Clarke, A.E. Tracheobronchoscopic assessment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 2005b, 66, 4:596-598.

Hinchcliff, K.W. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In: McGorum, B.C.; Dixon, P.M.; Robinson, N.E.; Schumacher J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007: 617-629.

Hodgson, D.R.; Christley, R.M.; Wood, J.L.N.; Reid, S.W.J.; Hodgson, J.L. Relationship between coughing and airway inflammation in young racehorses. In: Hoffman, A.; Robinson, N.E.; Wade, J.F. *Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*, Havemeyer Foundation Monograph Series N.º 9. Newmarket, UK: R & W Publications, 2003: 16-18.

Hodgson, J.L.; Hodgson, D.R. Tracheal aspirates: indications, technique, and interpretation. In: ROBINSON, N.E. *Current Therapy in Equine Medicine*, 5.ed. St. Louis: Saunders, 2003: 401-407.

Hodgson, J.L.; Hodgson, D.R. Collection and analysis of respiratory tract samples. In: McGorum, B.C.; Dixon, P.M.; Robinson, N.E.; Schumacher, J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007: 119-150.

Hoffmann, A. Newest diagnostic methods for inflammatory airway disease (IAD). *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 2002, 48, 208-217.

Holcombe, S.J.; Jackson, C.; Gerber, V.; Jefcoat, A.; Berney, C.; Eberhardt, S.; Robinson, N.E. Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Veterinary Journal*, 2001, 33, (3): 244-249.

Holcombe, S.J.; Robinson, N.E.; Derksen, F.J.; Bertold, B.; Genovese, R.; Miller, R.; de Feiter-Rupp, H.; Carr, E.A.; Eberhart, S.W.; Boruta, D.; Kaneene, J.B. Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 2006, 38, (4): 300-304.

Hughes, KJ; Nicolson, L; Da Costa, N; Franklin, SH; Allen, K.J.; Dunham, S.P. Evaluation of cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *Veterinary Immunol Immunopathol.* 2011, 15;140(1-2):82-9.

Hughes L A, Pinchbeck G L, Callaby R, Dawson S, Clegg P and Williams N . Antimicrobial prescribing practice in UK equine veterinary practice, *Equine Veterinary Journal* 2013, 45: 141-147.

Ivester, K. M., & Couetil, L. L. (2014). Management of chronic airway inflammation in the horse: a systematic review. *Equine Veterinary Educacion*, 2014, 26, (12): 647–56.

Kalina, M. Levi D, Riklis s.. Modulation of alkaline phosphatase activity in alveolar type II like cells. *Histochemistry*, 1990, 95:97-103..Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/r78138073kj077kw/>>. Acesso em: 13 nov. 2010.

Kaneko, J.J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ed. San Diego: Academic Press, 1989: 932.

Kusano, K., Hobo S., Ode, H. & Ishikawa, Y.. Tracheal endoscopic and cytological findings and blood examination results in thoroughbred racehorses suspected to have lower respiratory tract disease. *Journal of Equine Science*, 2008, 19, (4): 97-102.

Langsetmo, I., Fedde, M.R., Meyer, T.S. & Erickson, H.H. Relationship of pulmonary arterial pressure to pulmonary haemorrhage in exercising horses. *Equine Veterinary Journal*, 2000, 32: 379-384.

Lavoie, J.P. Recurrent airway obstruction (heaves) and summer-pasture-associated obstructive pulmonary disease. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, 2007: 565-584.

Lavoie, J.P., Cesarini, C., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lutz, S., Picandet, V., Jean, D., Marcoux, M. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 2011, 2: 1-8.

Lessa, D.A.B., Machado, C.H., Duarte, C.S., Wachols, L., Lima, J.R.P.A., Fernandes, W.R. Enfermidades do trato respiratório posterior em equinos de equitação no Rio de Janeiro: prevalência e aspectos clínico-laboratoriais. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 2005, 12, (1/3): 77-83.

Lessa, D.A.B.; Jorge, M.L. de A.; Viana, E.B.; Alencar, N.X. de; Fernandes, W.R. Análise do líquido broncoalveolar de equinos portadores de doença inflamatória das vias aéreas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 2011, 48, (2): 123-130.

MacNamara, B., Bauer S., Iafe J. Endoscopic evaluation of exercise-induced pulmonary hemorrhage and chronic obstructive pulmonary disease in association with poor performance in racing Standardbreds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1990, 196: 443–445.

Maden, M, Altunok V, Birdane F.M, Aslan V, Nizamlioğlu M . Specific enzyme activities in bronchoalveolar lavage fluid as an aid to diagnosis of tracheobronchitis and bronchopneumonia in dogs. *Research in Veterinary Science*, 2001, 71, (.2): 141-145, 2001. doi:10.1053/rvsc.2001.0503.

Malikides, N. Epidemiological studies on inflammatory airway disease (IAD) in young Thoroughbred racehorses. Sydney, Austrália, 2003. Tese (Universidade de Sydney).

Malikides, N.; Hughes, K.J.; Hodgson, J.L. Comparison of tracheal aspirates before and after high-speed treadmill exercise in racehorses. *Australian Veterinary Journal*, 2007, 85:10.

Mansmann, R.A.; Knight, H.D. Transtracheal aspiration in the horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1972,160, (11):1527-1529.

Mazan, M.R. Inflammatory airway disease in the horse. In: *AAEP Focus on upper and lower respiratory diseases*, Salt Lake City, UT. Proceedings... Salt Lake City: AAEP, 2010:100-106.

Mair, T.S., Stokes, C.R., Bourne, F.J. Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Veterinary Journal*, 1987, 19:458-462.

Mayhew, I.G. (2000). Clinical examination of horses and foals. In O.M. Radostitis, I.G.J. Mayhew & D.M. Houston (Eds.), *Veterinary clinical examination and diagnosis*. London, UK: Elsevier W.B. Saunders, 2000: 139-149.

McGorum, B.C.; Dixon, P.M. Clinical examination of the respiratory tract. In: McGorum, B.C.; Dixon, P.M.; Robinson, N.E.; Schumacher, J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Philadelphia: Elsevier, 2007: 103-117.

McKane, S.A.; Canfield, P.J.; Rose, R.J. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training. *Australian Veterinary Journal*, 1993, 70, (11): 401-404.

McKenzie, H.C. Rational therapy of inflammatory airway disease in equine athletes. *Proceedings of the AAEP Annual Convention*, 2011, 57: 12-15.

Michelotto Jr, P.V. Determinação do Estado do Aparelho Respiratório em Potros PSI de Corrida antes do Início dos Treinamentos através do Exame Clínico, Endoscopia e Citologia da Secreção Traqueo-Bronquial. Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brasil. 1993.

Michelotto Jr, P.V.; Bonfá, A.F.; Machado, C.D.; Deconto, I.; Cruz, L.A. Evidence of lower respiratory airway inflammation in healthy Thoroughbred yearlings before starting training. *Archives of Veterinary Science*, 2007,11, 3: 26-31.

Michelotto Jr, P.V.; Muehlmann, L.A.; Zanatta, A.L.; Bieberbach, E.W.R.; Fernandes, L.C.; Nishiyama, A. Platelet-activating factor and evidence of oxidative stress in the bronchoalveolar fluid of Thoroughbred colts during race training. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2010, 24, 2: 414-419.

Michelotto Jr, P.V., Muehlmann, L.A., Zanata, A.L., Bieberbach, E.W.R., Kryczyk, M., Fernandes, L.C., Nishiyama, A. Pulmonary inflammation due to exercise-induced pulmonary haemorrhage in thoroughbred colts during race training. *The Veterinary Journal*, 2011, 190: 3-6.

Moore, R. B., Krakowka, S., Robertson, J.T. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from Standardbred racehorses with inflammatory airway disease. *American Journal of Veterinary Research*, 1995, 56, 562-567.

Newton J, Wood J 2002: Evidence of an association between inflammatory airway disease and EIPH in Young thoroughbreds during training. *Equine Veterinary*, 2002, 34: 417-424.

Newton, J., Rogers, K., Marlin, D., Wood, J., & Williams, R. Risk factors for epistaxis in British racehorses: evidence for locomotory impact-induced trauma contributing to the aetiology of exercise-induced pulmonary haemorrhage. *Equine Veterinary Journal*, 2005, 37, 402-411.

Nyman, G. Inflammatory airway disease and gas exchange. Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: Functional significance, 2003, 9: 75-80.

Pecora, D.V. A method of securing uncontaminated tracheal secretions for bacterial examination. Journal of Thoracic Surgery, 1959, 37: 653-654.

Pirie, R.S., Dixon, P.M., Mc Gorum, B.C. Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigations of heaves. Equine Veterinary Journal, 2002, 34: 343-347.

Raidal, S.L., Bailey, G.D., Love, D.N. Effect of transportation on lower respiratory tract contamination and peripheral blood neutrophil function. Australian Veterinary Journal 1997, 75(6): 433-438.

Radostits, O.M; Gay, C.C; Blood, D.C; Hinchcliff, K.W. Clínica Veterinária, Ed.9, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002:1554-1558.

Raker, C.W., Boles C.L.. Pharyngeal lymphoid hyperplasia in the horse. Journal of Equine Medicine and Surgery, 1978, 2: 202-207.

Riihimaki, M., Raine, A., Elfman, L.; Pringle J. Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2008, 72: 432–439

Robinson, N. Pathogenesis and management of airway disease. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. 1997, 43: 106-115.

Robinson N.E. & Hoffman, A. Inflammatory airway disease: defining the syndrome. Conclusions of the Havemeyer workshop. Equine Veterinary Education, 2003, 15: 61-63.

Robinson, N.E., Berney, C., Defeijter-Rupp, H., Jefcoat, A.M., Cornelisse, C., Gerber, V., Derksen, F.J. Mucus, cough, airway obstruction and inflammation. Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the syndrome, 2003, 9:13-15.

Rossdale, P.D. Hopes, R, Wingfield D.N.J. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. Veterinary Records, 1985, 116, 66-69.

Roy, M.F.; Lavoie, J.P. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. The Veterinary Clinics – Equine Practice, 2003, 19: 1-17.

Rush, B.R. Inflammatory airway disease: A clinician's view from North America. Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the syndrome, 2003, 9, 3-6.

Rush, B. e Mair, T.. Equine respiratory disease (1st Ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd., 2004: 1-9, 237-240, 291-294.

Rush, B.; Mair, T.; Gerber, V.; Straub, R.; Marti, E.; Hauptman, J.; Herholz, C.; King, M.; Imhof, A.; Tahon, L.; Robinson, N.E. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. Equine Veterinary Journal, 2004, 36, (7): 576-582.

Sanches, A. Avaliação citológica do lavado traqueobrônquico de equinos clinicamente sadios e daqueles portadores de afecções do trato respiratórios. São Paulo, 1998, 148 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.

Sanchez, A.; Couëntil, L.L.; Ward, M.P.; Clark, S.P. Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2005, 19: 87-92.

Schaer, B.D. & Orsini, J.A. Respiratory system. Diagnostic and therapeutic procedures. In J.A. Orsini & T. Divers, Equine emergencies: treatment and procedures St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.2007, (3rd Edition): 436-439.

Scheffer, J.F. e Gonzales, F.H.D Enzimologia Clínica em Medicina Veterinária, LacVet, UFRGS, Porto Alegre, 2003.

Speirs, V.C. Exame clínico de equinos. Porto Alegre: Artmed. 1999.

Sweeney, C.R., Beech, J. Bronchoalveolar lavage. In: BEECH, J. (ed). Equine respiratory disorders. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991:55-61.

Sweeney, C.R. Evaluating the lungs. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 1999, 45: 290-293.

Silva, M. M., Silveira, R.G, Kaiseller, P.H., Pimpão, C.T, Michelotto P.V.Jr.. Achados de exames endoscópicos em vias aéreas de cavalos de corrida da raça Puro Sangue Inglês e sua relação com a tosse. Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais, 2011, 9, 4: 403-406.

Thacker, E.L. Lung inflammatory responses. Veterinary Research, 2006, 37:469-486.

Taylor, I.G.R., Brazil, T.J. e Hillyer, M.H. Respiratory diseases. In Diagnostic techniques in equine medicine. London: Saunders Elsevier.2010, (2nd Ed.): 217-248.

Vicino, C. Ocorrência de hemorragia pulmonar induzida por esforço em cavalos de salto no estado de São Paulo. São Paulo. Dissertação (Mestrado), Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo. 2007. 66.

Viel, L. Diagnostic methodologies: RAO and IAD, World Equine Airways Symposium, 2009: 176-179.

West, J.B.; Mathieu-Costello, O. Stress failure of pulmonary capillaries as a mechanism for exercise induced pulmonary haemorrhage in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 1994, 25, (6): 429-431.

Woods, P.S.; Robinson, N.E.; Swanson, M.C.; Reed, C.E.; Broadstone, R.V.; Derksen, F.J. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Veterinary Journal*, 1993, 25, (3): 208-213.

Wood, L.G.; Gibson, P.G.; Garg, M.L. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *European Respiratory Journal*, 2003, 21:177-186.

Wood, J.L.N.; Newton, J.R.; Chanter, N.; Mumford, J.A. Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 2005, 37, (3): 236-242.

Widmer, A.; Doherr, M.G.; Tessier, C.; Koch, C.; Ramseyer, A.; Satraub, R.; Gerber, V.; Association of increased tracheal mucus accumulation with poor willingness to perform in show-jumpers and dressage horses. *The Veterinary Journal*, 2009, 182: 430-435.

Wilkins, P.A. Diseases of the respiratory system. Diagnostic procedures for the respiratory system. In B.P. Smith, *Large animal internal medicine*. St. Louis, Missouri: Mosby.2009, (4th Edition), 490-551.

Whitwell, K.E., Greet T.R.C. Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 1984,16: 499-508.

Whitwell, K.E., Greet T.R.C. Collection and Evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Journal of American Medical Veterinary Association*, 1986, 188, (3): 301-302.

Xavier, M.O.; Nogueira, C.E.W.; Meirelles, M.; Fernandes, W.R.; Andreolla, H.; Severo, L.C.; Pasqualotto, A.C.; Meireles, M.C.A. Fungi in the respiratory tract of horses with recurrent airway obstruction. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2014, 66, (5):1457-1463.

Zhang, H., Porro, G., Orzech, N., Mullen, B., Liu, M., Slutsky, A.S. Neutrophil defensin mediate acute inflammatory response and lung dysfunction in dose-related fashion. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2001, 280: 947-954.