DANIEL AUGUSTO BARROSO LESSA

**Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) em eqüinos de
policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: estudo clínico e da
atividade macrofágica alveolar**

São Paulo

2003

DANIEL AUGUSTO BARROSO LESSA

Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) em eqüinos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: estudo clínico e da atividade macrofágica alveolar

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes

São Paulo

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1336
FMVZ

Lessa, Daniel Augusto Barroso

Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) em eqüinos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: estudo clínico e da atividade macrofágica alveolar / Daniel Augusto Barroso Lessa. – São Paulo : D. A. B. Lessa, 2003.

102 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2003.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.

1. Eqüinos. 2. Macrófagos alveolares. 3. Fagocitose. 4. Lavado broncoalveolar. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LESSA, Daniel Augusto Barroso

Título: Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) em eqüinos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: estudo clínico e da atividade macrofágica alveolar

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

À Cláudia, meu amor, que com muita garra e paciência soube entender, e suportar todas as dificuldades e privações para que eu pudesse chegar até aqui.

À Ana Vitória e à Maria Clara, frutos desse amor e razão da nossa
existência.

À memória de João Barroso, meu avô, que me transmitiu seu amor pelos cavalos e onde quer que esteja acompanha minha caminhada.

Aos cavalos, que suportaram tudo, sem entender nada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a realização de mais um ideal.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, por ter aceito ser meu orientador, por toda confiança em mim depositada e pelas críticas sempre pertinentes.

À Prof^a Dra. Elvira Saraiva/IMIPPG/UFRJ/RJ e toda sua equipe, pela inestimável colaboração, amizade e confiança em mim depositada.

Ao amigo, Prof. Dr. Edwin Maure Pile, pelo grande auxílio na elaboração da análise estatística.

Ao Prof. Eduardo Borges Viana, médico veterinário, amigo e colaborador, pelo auxílio na realização deste trabalho, pelas críticas, observações e apoio nos momentos difíceis.

Ao amigo e professor, com quem tenho a honra de compartilhar a lecionação da Disciplina de Clínica Médica de Grandes Animais, Dr. Orlei Justen dos Santos, por todo apoio e estímulo, desde os tempos de graduação.

Aos colegas de Pós-Graduação, especialmente à Carla B. Belli, Lílian Michima, Ênio Mori, Gláucia Abramovitc, Pierre Soares, Melanie S. Marques, Clarisse Coelho e Lúcia Wachholz, pela convivência e auxílio nos momentos importantes.

À amiga e médica veterinária Flávia Toledo, pela boa vontade na realização das endoscopias.

Aos colegas médicos veterinários do Regimento Escola de Cavalaria Andrade Neves/EB/RJ e da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro (PMERJ) pelo inestimável auxílio na execução do experimento.

Aos comandantes do Regimento Escola de Cavalaria Andrade Neves/EB/RJ e do Regimento de Polícia Montada (RPMont/PMERJ), pela disponibilização dos equinos para o experimento e por mais este voto de confiança em nosso trabalho.

Aos laboratórios Bravet e Boeringher Ingelheim Divisão Vetmédica, pela doação de medicamentos utilizados no experimento.

Às médicas veterinárias e amigas, Prof^{fa}. Dra. Carmem Helena e Prof^{fa}. Dra. Alice Della Libera pelo apoio e paciência.

A Prof. Dr. Cláudio de Moraes por ter aberto as portas do Instituto de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao amigo e conselheiro, Prof. Luis Mário Lima Castilhos, por ter me mostrado o caminho da medicina interna, pela crença incondicional nos meus ideais e apoio nos momentos difíceis.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, mas que por ventura deixaram de ser citados.

RESUMO

LESSA, D. A. B. **Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) em eqüinos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ:** estudo clínico e da atividade macrofágica alveolar. [Inflammatory airway disease (IAD) in equines of the Police of Rio de Janeiro City, RJ: clinical and alveolar macrophagic activity evaluation]. 2003. 102 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Objetivou-se caracterizar clinicamente a Doença Inflamatória de Vias Aéreas (DIVA) assim como verificar o comportamento da atividade dos macrófagos alveolares destes animais. Utilizaram-se 17 eqüinos adultos machos e fêmeas, com idade variando entre 11 e 24 anos, sendo oito do Regimento Escola de Cavalaria Andrade Neves (grupo Controle) e nove da Polícia Militar do Rio de Janeiro (grupo Doente, com DIVA). Estes animais não apresentavam história pregressa recente (dois meses) compatível com doença respiratória, nesse período não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento e apresentavam resultados de leucogramas e determinações de fibrinogênio plasmático dentro da normalidade. Realizaram-se exames físicos, endoscópicos, mensurações da diferença de pressão intrapleural máxima (Ventigrafia), e citologia broncoalveolar. Para o grupo Controle os animais foram selecionados levando-se em conta os resultados de normalidade nos exames executados. O grupo Doente foi selecionado considerando-se achados de anormalidade compatíveis com alterações inflamatórias pulmonares no mínimo em dois exames, sendo obrigatórios os exames endoscópicos e de citologia broncoalveolar. Para a avaliação da atividade macrofágica, macrófagos alveolares obtidos através de lavagem broncoalveolar foram cultivados a 37°C em atmosfera de 7% CO₂, aderidos em lamínulas de vidro estéril, de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços contendo 300 µL de RPMI 1640 enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino inativado pelo calor. Realizaram-se testes de fagocitose de Zymosan (por uma hora) e de interação com Promastigotas de *Leishmania braziliensis* cepa

3456 (por uma até 48 horas pós infecção). A análise das funções vitais e das mensurações da diferença de pressão intrapleurar máxima revelou, ainda que dentro de valores fisiológicos, diferenças significativas apenas para a temperatura corpórea e frequência cardíaca. Para os achados do exame físico, não foi detectada diferença estatística entre os grupos. Com relação ao lavado broncoalveolar, o grupo Doente apresentou aumento na contagem celular total, moderado aumento na porcentagem de neutrófilos, discreta redução na porcentagem de macrófagos, porém com aumento no número de macrófagos espumosos e de células epiteliais além de discreto aumento na porcentagem de eosinófilos. Não observou-se diferença, entre os grupos, na capacidade fagocítica com relação ao Zymosan. Porém, uma diferença significativa na capacidade fagocítica após uma hora de interação e redução do índice de sobrevivência de *L. braziliensis* após 48 horas de cultivo no grupo Doente foi observada. Os resultados demonstraram que a DIVA nos animais de policiamento apresentou caráter assintomático e que os macrófagos alveolares provenientes destes animais, quando comparados aos do grupo Controle, não apresentaram alteração em sua capacidade fagocítica para Zymosan, mas sim para *L. braziliensis* e um maior estado de ativação, caracterizado pela maior redução no índice de sobrevivência deste parasita após 48 horas de cultivo.

Palavras-chave: Equinos. Macrófagos alveolares. Fagocitose. Lavado broncoalveolar.

ABSTRACT

LESSA, D. A. B. **Inflammatory airway disease (IAD) in equines of the Police of Rio de Janeiro City, RJ:** clinical and alveolar macrophagic activity evaluation. [Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) em eqüinos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: estudo clínico e da atividade macrofágica alveolar]. 2003. 102 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

The objectives were to characterize clinically the inflammatory airway disease (IAD), as well as to verify the behavior of the alveolar macrophages activity in the horses. Seventeen adult horses, from both sexes, from 11 to 24 years old, were used, eight from the Regimento Escola de Cavalaria Andrade Neves (Control group) and nine from the Polícia Militar do Rio de Janeiro (Diseased group, with IAD). These animals did not present recente previous history (two months) compatible with respiratory disease. In this period the horses did not undergo any kind of treatment and presented leucogram and plasmatic fibrinogen determination results under normality. Physical and endoscopic examination, measurement of the maximal intrapleural pressure (Ventigraphy) and bronchoalveolar cytology were done. For the Control group, the animals were selected considering the normal results of the exams. The Diseased group was selected considering abnormal findings compatible with inflammatory pulmonary alterations at least in two exams, obligatory the endoscopic examination and bronchoalveolar cytology. To evaluate the macrophagic activity, alveolar macrophages obtained through bronchoalveolar lavage were cultured under 37°C in a 7% CO₂ atmosphere, adhered to 13 mm diameter sterile glass cover slips, in 24 wells polystyrene plates containing 300µL of RPMI 1640 enriched with 10% Foetal Calf Serum inactivated by heat. Assays for phagocytosis of Zymosan (for 1h) and for promastigotes of *Leishmania braziliensis* strain 3456 binding (for one until 48 hours post-infection) were done. The vital functions and the measurement of the maximal intrapleural pressure measurement analyses showed, even under physiological

values, significant differences for body temperature and heart rate. There was not statistical difference between the groups for the physical examination findings. In relation to the bronchoalveolar lavage, the Diseased group presented an increase in total cell count, a moderate increase in neutrophil percentage, a discrete reduction in macrophage percentage, but with a higher number of foamy macrophages and epithelial cells, and also a discrete increase of eosinophil percentage. It was not observed any difference between groups in the phagocytic capability in relation to Zymosan. However, a significant difference in the phagocytic capability after one hour interaction and a reduction of the survival index of *L. braziliensis* after 48 hours of culture in the Diseased group was observed. The results demonstrated that IAD in the police horses presented an asymptomatic characterization and that the alveolar macrophages from these horses, when compared to the Control group, did not present alteration in their phagocytic capacity for Zymosan, but did for *L. braziliensis*, and a greater activation status, characterized by a greater reduction of the survival index of *L. braziliensis* after 48 hours of culture.

Keywords: Equines. Alveolar macrophages. Phagocytosis. Bronchoalveolar lavage.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação gráfica da avaliação das funções vitais (temperatura, frequência cardíaca e frequência respiratória) dos dois grupos experimentais. T: temperatura; FC: frequência cardíaca (Batimentos por Minuto); FR: frequência respiratória (Movimentos por Minuto)
- Gráfico 2 - Representação gráfica do resultado do exame físico (frequência relativa) de alterações físicas no aparelho respiratório dos eqüinos dos dois grupos experimentais
- Gráfico 3 - Representação gráfica do resultado da aferição da diferença de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima) nos animais do experimento, segundo os grupos
- Gráfico 4 - Representação gráfica da contagem de leucócitos ($\times 10^5/\text{mL}$) do LBA nos eqüinos dos grupos experimentais
- Gráfico 5 - Representação gráfica do escore macroscópico do lavado broncoalveolar nos eqüinos dos grupos experimentais
- Gráfico 6 - Representação gráfica da contagem diferencial para células presentes no lavado broncoalveolar dos eqüinos dos grupos experimentais
- Gráfico 7 - Representação gráfica dos índices fagocíticos (Ifag) para Zymosan e para *Leishmania braziliensis* por macrófagos alveolares dos eqüinos dos grupos experimentais, após 1 hora de interação
- Gráfico 8 - Representação gráfica dos resultados da fagocitose de Zymosan por macrófagos alveolares (percentual) dos eqüinos dos grupos experimentais
- Gráfico 9 - Representação gráfica dos índices de Sobrevivência (IS) da *Leishmania braziliensis* após 48h de infecção dos macrófagos alveolares dos eqüinos dos grupos experimentais

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Doente. Presença de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, inclusive macrófago espumoso (seta) e material fagocitado. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x
- Figura 2 - Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA de um animal do grupo Doente. Presença de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, inclusive macrófago espumoso. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x
- Figura 3 - Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Controle. Presença hemossideróforos. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x
- Figura 4 - Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Doente. Presença de células gigantes. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x
- Figura 5 - Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Doente. Presença de células epiteliais ciliadas e célula produtora de muco (seta). Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x
- Figura 6 - Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-Zymosan. Macrófagos com partículas de Zymosan fagocitadas (setas). Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x
- Figura 7 - Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-*L. braziliensis*. Presença de parasitas intracelulares (setas) após 1 hora de interação. Grupo Doente. Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x
- Figura 8 - Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-*L. braziliensis*. Macrófagos infectados após 48 horas de interação. Presença de parasitas intracelulares (setas). Grupo Controle. Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x
- Figura 9 - Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-*L. braziliensis*. Macrófagos infectados após 48 horas de interação. Presença de parasita intracelular (seta). Grupo Doente. Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultado da avaliação das funções vitais (temperatura, frequência cardíaca e frequência respiratória) dos dois grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- Tabela 2 - Resultado do exame físico dos eqüinos dos dois grupos experimentais (frequência absoluta e percentual). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- Tabela 3 - Resultado da aferição da diferença de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima) nos animais do experimento, segundo os grupos. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- Tabela 4 - Resultado da contagem de leucócitos ($n \times 10^5/mL$) e escore macroscópico do LBA nos eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- Tabela 5 - Resultados da contagem diferencial para células presentes no lavado broncoalveolar dos eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- Tabela 6 - Resultado do teste de fagocitose de Zymosan e de *Leishmania braziliensis* por macrófagos alveolares dos eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- Tabela 7 - Resultados da fagocitose de Zymosan por macrófagos alveolares (percentual) dos eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- Tabela 8 - Resultado dos índices de Sobrevivência (IS) da *Leishmania braziliensis* após 48h de infecção dos macrófagos alveolares de eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE A - Dados gerais de identificação dos eqüinos do grupo Controle alojados no ResC. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE B - Dados gerais de identificação dos eqüinos do grupo Doente alojados na PMERJ. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE C - Funções vitais do grupo Controle (n=15). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE D - Funções vitais do grupo Doente (n=17). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE E - Resultados do eritrograma e da determinação do fibrinogênio plasmático dos eqüinos do grupo Controle. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE F - Resultados do eritrograma e da determinação do fibrinogênio plasmático dos eqüinos do grupo Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE G - Resultados do leucograma dos eqüinos do grupo Controle. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE H - Resultados do leucograma dos eqüinos do grupo Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE I - Achados clínicos relativos ao aparelho respiratório do grupo Controle (n=15 exames). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE J - Achados clínicos relativos ao aparelho respiratório do grupo Doente (n=17 exames). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE L - Resultados da endoscopia do grupo Doente (n=9). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE M - Valores de diferença de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE N - Volume de lavado broncoalveolar recuperado e viabilidade celular (média $\pm$ 1 DP), dos eqüinos dos grupos Controle e Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE O - Contagem total de leucócitos, viabilidade, volume total recuperado e escore no grupo Controle (n=15). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

- APÊNDICE P - Contagem total leucócitos, viabilidade, volume total recuperado e escore no grupo Doente (n=17). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE Q - Valores percentuais para a contagem diferencial da citologia broncoalveolar do grupo Controle (n=15). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE R - Valores percentuais para a contagem diferencial da citologia broncoalveolar do grupo Doente (n=17). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE S - Valores para Índices Fagocíticos (IFag) de Zymosan e de *Leishmania braziliensis* no grupo Controle. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE T - Valores para Índices Fagocíticos (IFag) de Zymosan e de *Leishmania braziliensis* no grupo Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE U - Valores para o percentual de macrófagos que fagocitaram Zymosan após 1 hora de interação. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002
- APÊNDICE V - Valores para Índices de Sobrevivência (IS) de *Leishmania braziliensis* após 48h de infecção. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DIVA	Doença inflamatória das vias aéreas
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
HPiE	Hemorragia pulmonar induzida por exercício
Ifag	Índice de fagocitose
IS	Índice de sobrevivência
LBA	Lavado broncoalveolar
p. a.	<i>pro analisis</i>
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PMERJ	Polícia Militar do Rio de Janeiro
SFB	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	SINTOMATOLOGIA CLÍNICA	23
2.2	DOENÇA INFLAMATÓRIA ASSINTOMÁTICA	26
2.3	DIAGNÓSTICO	28
2.3.1	Endoscopia	29
2.3.2	Testes de função pulmonar	31
2.3.3	Lavado broncoalveolar	33
2.3.3.1	Características macroscópicas	33
2.3.3.2	Características morfológicas normais	34
2.3.3.3	Características morfológicas da DIVA	36
2.4	ATIVIDADE MACROFÁGICA	40
3	MATERIAL E MÉTODO	43
3.1	ANIMAIS	44
3.2	TRIAGEM	44
3.2.1	Exame físico	44
3.2.2	Exame endoscópico	45
3.2.3	Hemograma e determinação do fibrinogênio plasmático	45
3.2.4	Aferição indireta da pressão intrapleural (Ventigrafia)	46
3.2.5	Obtenção do lavado broncoalveolar	46
3.2.5.1	Citologia do lavado broncoalveolar	48
3.2.5.2	Determinação da viabilidade e ajuste da concentração de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar	49
3.3	Avaliação da atividade dos macrófagos alveolares	49
3.3.1	Teste de fagocitose de ZYMOSAN (SIGMA®)	49
3.3.2	Interação <i>Leishmania braziliensis</i> -macrófago	50
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4	RESULTADOS	52
4.1	FUNÇÕES VITAIS	53
4.2	RESULTADOS DO EXAME CLÍNICO DO APARELHO RESPIRATÓRIO	54
4.2.1	Exame físico	54
4.2.2	Endoscopia	55
4.2.3	Aferição indireta da Pressão Intrapleural (Ventigrafia)	56
4.2.4	Lavado broncoalveolar	57
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES	65
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICES	89

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O aparelho respiratório é fundamental para a saúde e para o bom desempenho atlético dos eqüinos. Processos mórbidos nesse sistema são responsáveis por prejuízos orgânico e econômico consideráveis em cavalos de corrida (BAILEY et al., 1999; ROSSDALE et al., 1985).

Dentre desses processos, podemos considerar a Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA), também denominada de inflamação das vias aéreas posteriores (BURREL, 1985), inflamação das pequenas vias aéreas posteriores (HOFFMAN, 1999; HOFFMAN; VIEL, 1997), doença das pequenas vias aéreas (VIEL, 1997b) e inflamação do trato respiratório posterior ou doença das vias aéreas posteriores (LAVOIE, 1997), que é uma síndrome inflamatória não séptica das vias aéreas posteriores, particularmente de animais jovens (ROBINSON, 2001). Também é considerada por Hoffman (1999), Lavoie (1997) e Viel (1997a, b) como um estágio inicial da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

Burrel (1985) observou uma incidência de 50% dessa enfermidade no Reino Unido. Sweeney et al. (1992a) observaram uma variação de 27-80% nos Estados Unidos e Wood et al. (1999), em estudo epidemiológico longitudinal no Reino Unido, detectaram uma prevalência de 13,8% de doença inflamatória das vias aéreas (DIVA). Na Inglaterra, Chapman et al. (2000) verificaram que cerca de 11,3% dos aspirados traqueais de eqüinos examinados apresentaram alterações compatíveis com doença das vias aéreas posteriores.

Em cavalos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, foi detectada uma prevalência de 60% de DPOC, porém 100% dos animais examinados apresentaram algum estado inflamatório pulmonar, caracterizado por neutrofilia acima de 10% no lavado broncoalveolar (AMARAL et al., 1999). Nesta mesma população eqüina, aparentemente

saudável, Lessa et al. (2002) verificaram que 60% das amostras de lavado broncoalveolar apresentaram alterações compatíveis com quadros inflamatórios, sendo um compatível com DPOC e os demais (11) compatíveis com DIVA.

Os macrófagos relacionam-se diretamente com a fagocitose, destruição de partículas e microorganismos, processamento e apresentação de antígenos, modulação da resposta inflamatória e quimiotaxia para neutrófilos.

Estas células perfazem 90% das células efetoras no parênquima pulmonar (BUECHNER-MAXWELL, 1993) e são, portanto, primordiais para a manutenção da integridade do mesmo, assim como para o desencadeamento do processo inflamatório local.

Deconto (1984b) sugeriu que em animais com doenças pulmonares crônicas a capacidade fagocitária dos macrófagos alveolares estaria alterada, em sua função, sendo parcialmente substituída pela ação de neutrófilos. Tremblay et al. (1993) observaram que macrófagos alveolares de animais com DPOC mantidos estabulados, apresentaram maior estado de ativação. Franchini et al. (1998) conseguiram, através de estimulação “in vitro” de macrófagos alveolares, esclarecer o mecanismo do influxo neutrofílico para a árvore respiratória nos casos de DPOC. Estes autores observaram que ocorreu redução na capacidade fagocítica dos macrófagos assim como houve secreção de proteínas que foram responsáveis pela quimiotaxia para os neutrófilos.

As informações disponíveis na literatura sobre a atividade dos macrófagos alveolares de eqüinos com doenças respiratórias crônicas, tais como DPOC e DIVA, ainda são escassas. Considerando-se o papel dos macrófagos no processo inflamatório pulmonar, o conhecimento do comportamento da atividade desta células será de grande importância para o auxílio na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos destas enfermidades.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar clinicamente a DIVA em animais destinados ao policiamento urbano, assim como verificar o comportamento da atividade dos macrófagos alveolares destes animais.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SINTOMATOLOGIA CLÍNICA

Derksen et al. (1989) examinaram 50 eqüinos com histórico de alteração respiratória destes, 29 apresentaram tosse, 23 intolerância ao exercício, 16 rinorréia e 7 dispnéia. Os autores registraram ainda ruídos pulmonares anormais em 19 e dispnéia expiratória em 4 animais.

Fogarty e Buckley (1991) observaram sinais clínicos de intolerância ao exercício, dificuldade respiratória pós-exercício, tosse ocasional e rinorréia com diferentes características (espumosa, mucóide e sanguinolenta) nos animais com doença respiratória.

Tosse, rinorréia e dispnéia em repouso foram os sintomas observados isoladamente ou associados em 69 eqüinos examinados por Vrins et al. (1991). Os autores consideraram como suspeitos para DIVA os animais que apresentavam ausência de febre, leucograma normal assim como níveis de fibrinogênio plasmático normais, e presença de secreções na traquéia quando da realização da endoscopia.

Hoffman (1995) afirmou que boa parte das doenças das vias aéreas posteriores são de baixa intensidade ou assintomáticas, dividindo-as em doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e doença inflamatória das vias aéreas (DIVA). Considerou que esta última difere clinicamente da DPOC porque os animais afetados são mais jovens, os sinais clínicos são moderados, ou manifestados apenas ao esforço máximo e os animais afetados não apresentam dispnéia.

Moore et al. (1995) avaliando 32 cavalos de sela em treinamento e com histórico de redução de performance, observaram rinorréia mucopurulenta em 16 animais, rinorréia mucóide em 11 rinorréia serosa em 3 deles. Destes animais 15 apresentaram tosse crônica. A média de duração da má performance e dos sinais clínicos foi de 3,1 ($\pm$ 0,5) meses. Sibilos expiratórios foram auscultados em 1 animal com a utilização de bolsa para reinalação; em 8 animais foram detectado ruídos respiratórios anormais na traquéia, sendo que a tosse pode ser induzida por pressão traqueal em sete cavalos. A rinorréia e a tosse crônica foram consideradas achados clínicos comuns para animais com DIVA, entretanto anormalidades pulmonares auscultáveis raramente foram identificadas.

A tosse como marcador de doenças das vias aéreas posteriores em cavalos apresentou sensibilidade de 38% e especificidade de 84%. Animais que apresentaram a enfermidade por pelo menos dois meses, apresentaram tosse com maior frequência do que os que a tiveram por um mês. A associação entre esta enfermidade e rinorréia não foi estatisticamente significativa quando da ausência de tosse, porém, quando as duas ocorreram simultaneamente, a possibilidade da enfermidade estar presente foi extremamente alta. Não foi estabelecida relação estatística entre pirexia e doenças do trato respiratório tanto anterior como posterior (BURRELL et al., 1996).

A doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) progride através de estágios, sendo o estágio inicial geralmente reversível e de boa resposta à terapia. Aspectos clínicos da DIVA podem ser similares a muitas outras condições respiratórias e incluem tosse, quando se alimenta, ou no início do exercício, rinorréia, e frequência respiratória discretamente elevada (>20 /minuto), porém muitos cavalos não exibem tosse ou rinorréia. Tolerância reduzida ao exercício ou performance ruim, com prolongado período de recuperação, podem ser os únicos sintomas. A colocação de saco nas narinas para reinalação de CO_2 geralmente provoca tosse nestes cavalos, e um discreto esforço abdominal expiratório (dispnéia expiratória) pode ser

percebida por um observador atento. Por vezes, pode parecer que existe uma melhora aparente sem tratamento em função da reação alérgica ser parcialmente controlada, pelos mecanismos normais de defesa orgânica. Uma vez negligenciada nesta fase inicial, a doença progredirá gradualmente para uma obstrução mais significativa de pequenas vias aéreas.

Esta transição é demonstrada, após exercício, por uma aparente perda de energia, e pode haver manutenção de frequência respiratória elevada e narinas dilatadas. O estágio final é reconhecido como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Neste estágio, a maior parte das vias aéreas está parcial ou totalmente obstruída, e o animal tosse frequentemente enquanto está na cocheira, apresenta acessos de tosse durante exercícios moderados e pode apresentar rinorréia purulenta, respiração abdominal, e linha de esforço respiratório, além de freqüentes episódios de encurtamento da respiração com narinas dilatadas. A doença pode variar na progressão e gravidade devido a vários fatores, incluindo período de exposição ambiental a alérgenos, idade do animal e resposta inflamatória individual aos mecanismos da doença. Presença de sibilos é o aspecto mais comum à ausculta, e à percussão as bordas ventral e dorsal dos campos pulmonares vão se tornar hiperressonantes (VIEL, 1997b).

Christley et al. (2001b) trabalhando com cavalos de corrida com tosse, observaram que 94% deles apresentaram discreta presença de muco nas vias aéreas posteriores, comparativamente no grupo controle o percentual foi de 45%, além disso, animais que tossiam foram sete vezes mais propensos a ter discreta quantidade de muco na traquéia, comparado ao grupo controle. A tosse foi fortemente associada ao aumento do muco traqueal e ao aumento na proporção de neutrófilos dos lavados.

Viel (1997a) descreveu a inflamação de vias aéreas posteriores de cavalos jovens com hipersensibilidade tipo 1, mediada por mastócitos, em cavalos que apresentam declínio gradual de performance no treinamento e/ou corrida, ou tosse intermitente em repouso e no início da seção de treinamento. A ausculta revela aumento dos ruídos bronquiais sobre a área

dorsal de ambos os campos pulmonares. Durante a reinalação com bolsa plástica, sibilos podem ser detectados, porém crepitações são raramente audíveis. Os campos pulmonares podem estar hiperressonantes e expandidos dorsal e caudalmente. Nos quadros onde a presença de neutrófilos é elevada, o processo inflamatório é idêntico ao observado na DPOC, com exceção de a doença estar nos seus estágios iniciais. Ocasionalmente rinorréia mucopurulenta é observada, e com o auxílio de bolsa de reinalação, a auscultação pode revelar sibilos e crepitações.

Dos 53 animais analisados por Ferro et al. (2002) com DIVA, tosse espontânea ou facilmente estimulada foi observada em 40 animais (75,4%), rinorréia mucosa ou mucopurulenta em 30 (56,6%) e nenhum deles apresentou febre.

2.2 DOENÇA INFLAMATÓRIA ASSINTOMÁTICA

Burrell (1985) com base em achados endoscópicos detectou inflamação em 50% dos animais em treinamento assintomáticos, submetidos a exame, e concluiu que algum grau de inflamação é comum em cavalos de corrida.

Sweeney et al. (1992a) observaram evidências citológicas de doença inflamatória de vias aéreas caracterizadas por aumento de neutrófilos, (em 27% dos cavalos) presença de eosinófilos (em 94%), mastócitos (em 83%), células gigantes (em 65%) ou espirais de Curschman (em 42%), nos aspirados traqueobrônquicos de cavalos de corrida aparentemente saudáveis em treinamento e com desempenho satisfatório. Diante desta situação caracterizaram-na como de natureza assintomática e amplamente disseminada nesta população.

Burrell et al. (1996) constataram que doenças do trato respiratório posterior demonstradas pelo aumento de secreções mucopurulentas na traquéia, visíveis à endoscopia, e resposta neutrofílica evidente no aspirado traqueal, foram consideravelmente mais comuns que outras formas clínicas aparentes de doença respiratória tais como rinorréia, pirexia e tosse, demonstrando que a DIVA freqüentemente é assintomática e pode facilmente passar despercebida se a endoscopia traqueal não for feita regularmente.

Christley et al. (2001a) observaram que 20% dos animais considerados nomais apresentavam mais de 20% de neutrófilos nos lavados de traquéia, sendo que 45% apresentaram algum muco na traquéia, dos quais 14% apresentaram quantidades de moderada a grande de muco traqueal. Dependendo de como se define DIVA, uma considerável proporção de cavalos de corrida podem ser considerados afetados.

Examinando 5 animais com média de idade de 16,6 anos e portadores de DIVA, Couëtil et al. (2001) verificaram que nenhum dos animais apresentou histórico de aumento de esforço respiratório quando encocheirados e alimentados com feno. Concluíram que o exame clínico sozinho pode não ser suficiente para diagnosticar alterações respiratórias discretas como DIVA ou DPOC durante períodos nos quais os animais estejam assintomáticos, e que alguns cavalos mais velhos apresentam condições semelhantes à DIVA que acomete cavalos de corrida jovens.

Holcombe et al. (2001) diagnosticaram neutrofilia no lavado broncoalveolar (LBA) sem nenhum outro sinal de doença respiratória durante o exame clínico em potros árabes sadios que foram estabulados após período de manutenção em regime extensivo de criação.

Lessa et al. (2002) avaliaram 20 amostras de LBA de 17 eqüinos de policiamento aparentemente saudáveis e observaram que 12 amostras (60%) apresentaram alterações compatíveis com quadros inflamatórios, sendo um de DPOC e onze de DIVA.

Hodgson e Hodgson (2002), em um trabalho de revisão, observaram que 65% de cavalos de corrida com má performance, porém sem sinais clínicos ou históricos de doença respiratória apresentaram evidências de inflamação na citologia do aspirado traqueal, do LBA ou em ambos.

A doença assintomática pode ser comum na DIVA, conseqüentemente, o uso da endoscopia e a avaliação citológica de amostras colhidas das vias aéreas posteriores são necessárias para investigar por completo a saúde respiratória de cavalos, particularmente naqueles com histórico de má performance (HODGSON; HODGSON, 2002).

2.3 DIAGNÓSTICO

Hodgson e Hodgson (2002) afirmaram que o histórico detalhado é parte essencial da avaliação diagnóstica; e a auscultação cuidadosa dos campos pulmonares incluindo-se o uso de bolsas para reinalação deve ser empregada. Relataram ainda que animais com DIVA raramente apresentam anormalidades auscultáveis mesmo com a reinalação, devido à baixa sensibilidade deste método, e recomendaram testes confirmatórios para o diagnóstico da enfermidade

2.3.1 Endoscopia

Whitwell e Greet (1984) observaram que 62% dos cavalos de corrida com tosse apresentaram copiosa secreção mucopurulenta na traquéia enquanto somente 2% dos que tossiram não apresentaram nenhuma secreção mucopurulenta visível na traquéia.

Burrell (1985) observou presença de exsudato mucóide ou mucopurulento em 50% das endoscopias realizadas em cavalos de corrida (média de idade de três anos e variação de um a sete anos) em treinamento e considerados clinicamente normais. Do total de animais com exsudato traqueal, 58% apresentaram a menor quantidade, enquanto quantidade moderada ou grande foi observada em 28 e 14% dos animais, respectivamente. Pequenas quantidades comumente observadas podem somente refletir mobilização normal de muco durante o exercício, porém grandes quantidades de muco podem ser consideradas o resultado de inflamação de vias aéreas posteriores.

Derksen et al. (1989) examinaram 50 eqüinos com histórico de alterações respiratórias e observaram secreções anormais à endoscopia em 44% dos animais.

Fogarty e Buckley (1991) avaliaram 65 eqüinos e verificaram a presença de exsudato mucopurulento de moderado a copioso em 31% dos animais.

Aproximadamente 79,7% de um total de 69 eqüinos examinados por Vrins et al. (1991) apresentaram secreções mucopurulentas na traquéia.

O eqüino apresenta o trato respiratório anterior relativamente insensível e permite a passagem do endoscópio para a traquéia com o mínimo de irritação. Entretanto, mesmo animais normais tossirão quando o endoscópio tocar na mucosa distal da traquéia na área da carina. A traquéia normal do eqüino não contém secreção visível, ainda que alguns estudos tenham demonstrado que muitos cavalos jovens apresentam acúmulo de secreções respiratórias na traquéia, isto simplesmente indica a presença de doença pulmonar

amplamente disseminada neste grupo. A observação endoscópica de um acúmulo de secreções de mucóide, mucopurulenta a purulenta repousando na área horizontal da traquéia é o indicador mais sensível de inflamação pulmonar. Poucos cavalos acometidos de doença pulmonar significativa não têm acúmulo de secreções na traquéia. Se um grau significativo de tosse existe, a parede traqueal pode estar com uma coloração rosa intensa, contrastando com o rosa pálido em cavalos normais. A presença de pequenos vasos proeminentes na parede traqueal é normal. Com inflamação pulmonar a carina que normalmente é pálida e de aparência cortante, pode estar arredondada e avermelhada (DIXON, 1997).

Em animais com DIVA caracterizada por um aumento de mastócitos (hipersensibilidade tipo 1) a endoscopia traqueal ou contém uma quantidade moderada de secreção mucóide clara, indicativa de processo inflamatório com mastócitos, ou secreção mucopurulenta, indicativa de processo inflamatório com presença aumentada de eosinófilos. A passagem do endoscópio provoca tosse excessiva pela irritação brônquica, observando-se também hiperemia, edema e broncoconstrição. Na inflamação com aumento do número de neutrófilos, as secreções são de cor esbranquiçada e pequenos pontos de debris mucopurulentos podem ser facilmente observados nos brônquios. A mucosa respiratória está edematosa, hiperêmica e hiperreativa a passagem do endoscópio (VIEL, 1997a).

Couëtil et al. (2001) consideraram como diagnóstico endoscópico de DIVA quando evidências de aumento na quantidade de secreções respiratórias mucopurulenta foram observadas no mínimo duas vezes nos seis últimos meses.

Gerber¹ (2001 apud HODGSON; HODGSON, 2002) afirmaram que não há concordância sobre a quantidade de muco observada à endoscopia traqueal que constitua uma anormalidade. Relataram que alguns cavalos de corrida, vivendo em cocheiras e sem sinais

¹ GERBER, V.; STRAUB, R.; SCHOTT H. D. et al. Is mild airway inflammation and mucus accumulation really abnormal and clinically significant? In: HAVEMEYER FOUNDATION MONOGRAPH SERIES, 4., 2001, **Proceedings Workshop Equine Allergic Diseases of Horses**, 2001. p.10.

clínicos evidentes de doenças de vias aéreas, ocasionalmente tem pequeno acúmulo ventral confluyente de muco. Entretanto quando cavalos de corrida exibem acúmulos de muco, especialmente quando este se estende por porção considerável da traquéia, é um achado considerado como anormal e indicativo de inflamação de vias aéreas.

Ferro et al. (2002) analisaram 53 cavalos de corrida e observaram que no exame endoscópico a maior parte dos animais apresentou graus diferentes de hiperplasia folicular linfóide, exsudato traqueal, edema e hiperemia de carina.

2.3.2 Testes de função pulmonar

Viel (1986) concluiu que os testes mais comuns para avaliação de função pulmonar (volumes pulmonares, ventilação e mecânica pulmonar) foram de pequeno valor na detecção de DIVA crônica assintomática.

O principal uso dos testes de função pulmonar em medicina eqüina é para a avaliação de doença pulmonar obstrutiva crônica. Estes testes podem ocasionalmente detectar e quantificar doenças das pequenas vias aéreas que não são clinicamente detectáveis. Entretanto, sua maior importância é para quantificar a gravidade, assim como a resposta à terapia com drogas broncodilatadoras e controle ambiental.

A cada subdivisão brônquica a sessão transversal das vias aéreas condutoras praticamente duplica de diâmetro e portanto nas vias aéreas mais distais existe uma grande capacidade de reserva. Conseqüentemente, a maioria das pequenas vias aéreas necessita estar obstruída antes que os testes de função pulmonar possam detectar qualquer obstrução. Estas pequenas vias aéreas distais são os locais primários para a DPOC e para muitas outras doenças pulmonares crônicas dos eqüinos. Estes fatores combinados com a falta de

cooperação do paciente significam que os testes de função pulmonar rotineiramente utilizados são restritos à volume corrente em repouso e serão relativamente de baixa sensibilidade ao menos que obstrução significativa do fluxo de ar esteja presente. O Ventigraph®² pode medir objetivamente alterações de pressão intratorácica, ou seja, cavalos que clinicamente podem aparentar discreto aumento no esforço respiratório (DPOC) podem apresentar um grande aumento na pressão intratorácica (DIXON, 1997).

Testes de função pulmonar incluindo a análise dos gases arteriais e mensuração da pressão intrapleural podem ser de ajuda para quantificar o grau de disfunção pulmonar e monitorar a progressão do caso, entretanto são de muito pouca sensibilidade para auxiliar em casos de DPOC assintomática (MAIR; DERKSEN, 2000).

A variabilidade nos resultados dos testes de função pulmonar faz com que estes sejam de pouco valor para a confirmação do diagnóstico a menos que o animal esteja tão gravemente afetado que a confirmação seja desnecessária (ROBINSON, 2002).

Desde o início da década de 90 vários grupos tem tentado determinar a utilidade de métodos alternativos para o diagnóstico de disfunção de vias aéreas em cavalos com DIVA. Ainda que o volume de informações relacionadas aos testes de função pulmonar continue crescendo, particularmente com referência a esta enfermidade, até o momento a sensibilidade das técnicas relatadas limita sua eficácia como ferramenta clínica para abordar cavalos com esta síndrome. Não é surpresa que para esta condição clínica, estes testes não sejam de valor diagnóstico, pois a afecção pulmonar e as alterações estruturais são menos graves que na DPOC (HODGSON; HODGSON, 2002).

² Boehringer Ingelheim, Bracknell, Herts, UK

2.3.3 Lavado broncoalveolar

2.3.3.1 Características macroscópicas

McKane et al. (1993) avaliaram as características macroscópicas do lavado broncoalveolar (LBA) para a cor, turbidez, e presença de muco estabelecendo um escore para 62 Puros Sangue Inglês com idade entre um e 7 anos (média de $2,8 \pm 1,4$ ano), com exceção dos potros de sobreano, os demais animais estavam em treinamento ou correndo, e não apresentavam sinais de intolerância ao exercício, porém 10 deles apresentavam histórico de tosse crônica. A cor foi graduada em: 0 ausente; 1 rosa; 2 vermelho claro; e 3 vermelho ou vermelho escuro, e a classificação para a turbidez foi baseada na opacidade da amostra (0 transparente; 1 turvo; 2 aparência de vidro enfumaçado; e 3 translúcida). O número e o tamanho das partículas mucóides foi usado para categorizar as amostras de muco (0 ausente; 1 poucas e pequenas; 2 muitas partículas pequenas; e 3 muitas partículas grandes). Os valores médios para os 62 animais foram para a coloração $0,6 \pm 1,0$, turbidez $1,3 \pm 0,6$ e número e tamanho das partículas $1,5 \pm 0,7$.

Segundo McGorum e Dixon (1994), o LBA de animais normais é discretamente turvo e apresenta espuma devido ao conteúdo de surfactante. Muco visível e aglomerados celulares são indicativos de doença pulmonar.

Mori (2000) modificou e aplicou o escore de McKane et al. (1993) para avaliar o lavado broncoalveolar de eqüinos experimentalmente infectados com herpesvírus eqüino tipo 1. No grupo considerado hígido, o somatório das médias de cada categoria do escore totalizou 0,48.

Nos quadros inflamatórios de vias aéreas posteriores onde Viel (1997a) observou aumento na população de mastócitos, a aparência do LBA foi clara e sem debris floculentos.

Naqueles em que ele verificou aumento na contagem de neutrófilos, o LBA apresentou debris floculentos em suspensão.

2.3.3.2 Características morfológicas normais

McKane et al. (1993) trabalhando com cavalos de corrida em treinamento, verificaram um percentual de 73% das amostras com eritrócitos livres e 90% com hemossiderófagos, caracterizando nestes animais a ocorrência imediata ou prévia de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE).

O LBA de animais normais apresenta predominantemente macrófagos alveolares, linfócitos, mastócitos, um pequeno número de células epiteliais ciliadas e não ciliadas e eosinófilos. Além destas, células basofilóides também podem estar estão presentes. Os macrófagos variam de tamanho e morfologia com grandes macrófagos multinucleados e formas mitóticas comumente reconhecidas. Eles apresentam uma alta relação citoplasma núcleo e são prontamente reconhecidos quando grandes e vacuolados. Após uma hemorragia pulmonar, eritrócitos são fagocitados por macrófagos pulmonares e seus pigmentos heme são reduzidos a hemossiderina, dando origem aos hemossiderófagos. Este pigmento é facilmente reconhecido nas colorações hematológicas rotineiramente empregadas como grânulo intracitoplasmáticos de coloração âmbar, verde ou marrom. Os hemossiderófagos deixam lentamente os pulmões e podem ser observados em LBAs de animais que não correram há vários meses (MCGORUM; DIXON, 1994).

No lavado de um cavalo normal os macrófagos devem ter aparência uniforme com mínima vacuolização citoplasmática (MOORE, 1996).

Amostras de LBA normal geralmente apresentam celularidade moderada e contém proporções aproximadamente iguais entre macrófagos alveolares e pequenos linfócitos. Pode existir um discreto “fundo” de muco. O número de células epiteliais e os tipos variam dependendo do ponto de aspiração. Ainda que muco e eosinófilos estejam ausentes poucos neutrófilos podem estar presentes (FREEMAN; ROSZEL, 1997).

Fernandes et al. (2000) também observaram, esporadicamente, formas bi, tri e multinucleadas de macrófagos em cavalos clinicamente saudáveis.

No quadro 1, pode-se observar as citações dos autores respectivamente com o volume infundido, as contagens celulares total e a diferencial para o LBA de equinos considerados saudáveis.

<i>Referência</i>	<i>Volume</i> <i>(mL)</i>	<i>Total</i> <i>(x 10⁵/mL)</i>	<i>Macrófago</i> <i>(%)</i>	<i>Hemos-</i> <i>siderófago</i> <i>(%)</i>	<i>Linfócito</i> <i>(%)</i>	<i>Neutrófilo</i> <i>(%)</i>	<i>Mastócito</i> <i>(%)</i>	<i>Eosinófilo</i> <i>(%)</i>	<i>Célula</i> <i>epitelial</i> <i>(%)</i>
SWEENEY e BEECH (1991)	200-500	< 5	40 - 45	...	40 - 45	<5	MINORIA	MINORIA	...
SWEENEY et al. (1992b)	300	3,35	44,7	...	46,5	2,4	4,8	1,6	...
MCGORUM et al. (1993)	300	0,5 - 0,8	49,7 - 61,7	...	24,3 - 39,7	1,0 - 1,3	8,0 - 9,3	-	0,3 - 1,0
HARE et al. (1994)	2 x 250	5,3	60,1	...	36,7	2,2	0,4	0,03	0,4
LAPOINTE et al. (1994)	2 x 250	7,17	39,2	...	55,4	4,2	1,3	-	...
MOORE et al. (1995)	300	1,53	64,8	...	28,3	3,8	0,3	1,2	...
VIEL (1997a)	...	...	60,1	...	36,7	2,2	0,4	0,03	0,4
HARE e VIEL (1998)	2 x 250	3,6	67,7	...	31,5	0,4	1,0	0,3	-
HOFFMAN (1999)	2 x 250	...	MAIORIA	...	MAIORIA	<5	<2	<1	...
COUËTIL e DENICOLA (1999)	250	4,45	68,8	16,6	22,9	3,8	...	...	...
COUËTIL et al. (2001)	250	3,21	57,1	...	31,4	6,8	1,5	0,3	...

...: valores não disponíveis; -: valores nulos

Quadro 1 – Autores com respectivos volumes infundidos, contagens celulares total (x10⁵ células/mL) e diferencial (%) do LBA, segundo os tipos celulares para equinos considerados sadios

2.3.3.3 Características morfológicas da DIVA

Derksen et al. (1989) verificaram neutrofilia em 26 de 50 cavalos com diagnóstico de doença pulmonar crônica, afirmando que estes 26 animais apresentavam resposta inflamatória pulmonar induzida por antígenos ambientais. Em 5 animais observaram percentagens aumentadas de mastócitos ou eosinófilos, não sendo clinicamente distinguíveis dos outros animais do grupo com enfermidade crônica. Estas informações sugerem que diferentes

processos fisiopatológicos podem levar à doença pulmonar crônica ou que diferentes estágios de uma única doença respiratória podem ser caracterizados por diferentes populações celulares nas vias aéreas.

Fogarty e Buckley (1991) observaram neutrofilia (média de 13%) e aumento no percentual médio de hemossiderófagos (44%) de forma significativa no grupo com intolerância ao exercício. Neste grupo 26% dos animais apresentaram resposta de hipersensibilidade.

Vrins et al. (1991) observaram um aumento na contagem celular total, um progressivo aumento no percentual de neutrófilos conforme o aumento da gravidade da enfermidade, e aumentos ocasionais no número de mastócitos em todos os 69 animais clinicamente enfermos. Os macrófagos às vezes, apresentaram-se marcadamente vacuolados ou contendo eritrócitos ou leucócitos fagocitados, além disso também foram observadas espirais de Curschman.

McKane et al. (1993) apesar de terem considerado o grupo de animais estudados normais, observaram aproximadamente duas vezes mais neutrófilos, assim como macrófagos maiores e mais vacuolados em animais que participaram de treinamento ou correram, do que naqueles que trabalharam mais lentamente. Isto sugere que exercícios de alta intensidade possam estar associados com baixo grau de doença inflamatória pulmonar.

Hare et al. (1994) estudando o efeito do cromoglicato de sódio em 12 cavalos de corrida com DIVA, consideraram como aumento de células metacromáticas quando a contagem diferencial evidenciava valor acima de 2% para este tipo celular.

Moore et al. (1995) avaliando 32 eqüinos Standardbred em treinamento e com histórico de queda de performance, observaram contagem celular total aumentada, neutrofilia relativa (10,4%), linfocitose relativa (36,0%) e monocitose absoluta, sendo este quadro citológico de DIVA considerado como padrão inflamatório misto. Além disso, quatro animais apresentaram eosinofilia marcante (24,7%).

Em 19 animais com DIVA, a citologia broncoalveolar evidenciou valores percentuais de 15-59 para macrófagos, 34-68 para linfócitos, 1-15 para neutrófilos, 1-16 para mastócitos e 0-6 para eosinófilos. Uma percentagem excessiva de neutrófilos ou de mastócitos, implica que os cavalos possam experimentar uma reação inicial da fase inflamatória (medida por mastócito) ou tardia (neutrófilo, eosinófilo) no momento do exame, como visto na asma humana (HOFFMAN, 1995).

Bain (1997) e Moore (1996), em trabalhos de revisão sobre citologia broncoalveolar, sugeriram para as doenças inflamatórias as seguintes categorias: (1) inflamação mista com aumento na contagem total de leucócitos e uma moderada neutrofilia (15%), (2) aumento de células metacromáticas (> 2% de mastócitos) e (3) inflamação com aumento no número de eosinófilos.

A análise citológica de lavados de animais com inflamação de vias aéreas posteriores pode evidenciar aumento significativo na população de mastócitos com poucos eosinófilos, ou com um aumento significativo desta última população celular. Também podem ser observados quadros citológicos com contagem celular total marcadamente elevada, onde a maior proporção corresponde a população de polimorfonucleares. Não é incomum observar uma reação inflamatória com presença de neutrófilos em cavalos com hemorragia pulmonar crônica induzida pelo exercício (VIEL, 1997a).

Os macrófagos alveolares podem ter citoplasma variando desde, discretamente denso a discretamente espumoso, e isto é compatível com um estado de ativação quiescente ou discreta destes macrófagos. O padrão citológico compatível com alergia respiratória é uma inflamação com infiltrado eosinofílico, acima de 5% conforme Hare e Viel (1998), com evidências de irritação difusa de grandes e/ou pequenas vias aéreas, indicada por uma atipia variável de células epiteliais, ausência de debris necróticos, como os que ocorrem na migração larval parasitária através do pulmão, e aumento no muco. Ainda que a inflamação seja

variável, geralmente existe pelo menos moderado número de neutrófilos. Ocasionalmente a inflamação com infiltrado neutrofílico é discreta ou ausente, e aumento na contagem de linfócitos pode ser aparente. O número de macrófagos está consistentemente aumentado e muitos são espumosos (FREEMAN; ROSZEL, 1997).

A variação nos tipos celulares observados em cavalos com diagnóstico clínico de DIVA parece ser tanto técnica quanto regional. As contagens mais altas de mastócitos são em animais jovens enquanto as contagens mais altas de neutrófilos são em animais mais velhos, acima de 10 anos (HOFFMAN, 1999).

Em animais com DIVA, Couëtil et al. (2001) consideraram como padrão citológico inflamatório misto, um aumento significativo na contagem absoluta de linfócitos e um aumento não significativo no percentual de neutrófilos.

Holcombe et al. (2001) observaram alta percentagem de neutrófilos e baixa de linfócitos em cavalos Árabes jovens após a estabulação, caracterizando DIVA.

Ferro et al. (2002) na caracterização de padrões citológicos para 53 cavalos com DIVA, descreveram eosinofilia de 6,8% em 11,3% dos animais, neutrofilia de 7,2% em 18,9% dos animais, quadros mastocíticos de 6,1% em 15,1% dos animais e inflamação mista em 54,7% dos animais.

Um aumento de origem não traumática na população de células epiteliais do LBA é comumente observado em animais com infecções virais. O LBA de cavalos com DPOC ou cavalos jovens com DIVA em estado agudo, pode também demonstrar células epiteliais com perda de cílios e dano citoplasmático, entretanto, a separação da placa ciliar inteira é raramente evidente nestes casos (HEWSON; VIEL, 2002).

A seguir, no quadro 2, pode-se observar as citações dos autores respectivamente com os resultados das contagens celulares total e a diferencial para o LBA de eqüinos com DIVA

<i>Referência</i>	<i>Total</i> ($\times 10^5/\text{mL}$)	<i>Macrófago</i> (%)	<i>Hemos- siderófago</i> (%)	<i>Linfócito</i> (%)	<i>Neutrófilo</i> (%)	<i>Mastócito</i> (%)	<i>Eosinófilo</i> (%)	<i>Célula epitelial</i> (%)
VRINS et al. (1991)	5 - 8,5	30,3 - 43,9	...	26,0 - 37,1	16,5 - 39,4	1,6 - 4,4	0,1 - 0,7	1,1 - 2,7
HARE et al. (1994)	5,6 - 5,9	56 - 57	...	35 - 37	2,4 - 4,1	3,1 - 3,9	0,2 - 0,8	0 - 1,5
MOORE et al. (1995)	3,6	48,4	...	36,0	10,4	1,8	3,8	...
VIEL (1997a)	...	26,7 - 57,0	...	26,0-36,4	0,9 - 28,0	1,5 - 3,9	0,8 - 13,3	0,6 - 3,7
HARE e VIEL (1998)	6,5	58,6	...	25,8	0,8	1,4	11,6	-
COUËTIL e DENICOLA (1999)	5,82	54,8	30	33,6	12,0	...	...	...
HOLCOMBE et al. (2001)	0,74 - 0,98	40,1 - 41,1	...	35 - 39,1	5,7 - 13,2	4,1 - 4,7	0,4 - 2,5	5,1 - 11,0
COUËTIL et al. (2001)	5,35	42,0	...	36,3	20,4	1,5	0,5	...
FERRO et al. (2002)	> 3	38,8 - 49,3	...	41,8 - 53,6	0,1 - 7,2	0,2 - 6,1	0 - 2,2	...

...: valores não disponíveis; -: valores nulos

Quadro 2 – Autores com respectivas contagens celulares total ($\times 10^5$ células/mL) e diferencial (%) para o LBA de eqüinos com DIVA

2.4 ATIVIDADE MACROFÁGICA

Traub-Dargatz et al. (1988) avaliaram a atividade fagocítica de macrófagos alveolares de oito eqüinos, pré-transporte, e observaram um percentual de $71 \pm 8\%$ células fagocitando bactérias (*Streptococcus faecalis*).

Crisman et al. (1992) observaram um percentual de $67,5 \pm 11,5\%$ de macrófagos alveolares de sete animais sadios (pré-transporte) fagocitando hemácias de carneiro marcadas com anticorpo de coelho anti-hemácia de carneiro.

Tremblay et al. (1993) utilizando técnicas de separação de populações celulares através de gradiente de densidade, concluíram que, após estabulação, os macrófagos alveolares de

animais com DPOC apresentaram-se mais densos que os do grupo controle e, portanto com alto estado de ativação.

Macrófagos alveolares obtidos de equinos mantidos sob baixas condições de impurezas, quando cultivados e estimulados durante 24 horas, apresentaram diminuição significativa na atividade fagocítica para *Saccharomyces cerevisiae*. Quando a estimulação foi com LPS (lipopolissacarídeo) o percentual de células que fagocitaram as partículas foi de 15%, quando estimulados com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*)/ionomicina não foi observado fagocitose (0%). Em contrapartida, foi observado um percentual de 34% para macrófagos não estimulados (FRANCHINI et al., 1998).

Green et al. (1990) demonstraram “in vitro” que a ativação de macrófagos peritoniais murinos tratados com interferon gama e infectados com *Leishmania major* leva a destruição das formas amastigotas intracelulares destes parasitas, causando redução na sobrevivência dos mesmos dentro das células.

A destruição de *Leishmania enrietti* por macrófagos de camundongos de linhagem C57 é aumentada quando ativados por linfocinas. Os parasitas internalizados pelos macrófagos são destruídos após 48 horas de cultivo na presença de linfocinas. Culturas-controle, sem linfocinas permitem o crescimento irrestrito do parasita (ROITT et al., 1999).

Mori et al. (2001) estudaram a atividade de macrófagos alveolares de cavalos clinicamente saudáveis. Os resultados obtidos nos testes de mensuração da atividade foram: índice de espalhamento $25,1 \pm 19,7\%$, índice de fagocitose $89,4 \pm 6,2\%$ e liberação de peróxido de hidrogênio $1,6 \pm 0,3$ nmoles/ 2×10^5 células (sem PMA – *phorbol 12-myristate 13-acetate*) e $1,8 \pm 0,4$ nmoles/ 2×10^5 células (com PMA). Os resultados demonstraram um padrão de atividade para cavalos hígidos, os quais apresentaram índices de ativação mesmo sem eliciação prévia.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 17 eqüinos adultos sendo oito do Regimento Escola de Cavalaria Andrade Neves (REsC, ME, RJ), utilizados para equitação e nove da Polícia Militar do Rio de Janeiro (PMERJ), utilizados para policiamento (Apêndices A e B). Todos os animais foram mantidos em semelhantes condições de estabulação, alimentação e manejo higiênico-sanitário, sendo regularmente vermifugados e vacinados contra Influenza Eqüina.

Para o grupo Controle os animais foram selecionados levando-se em conta a história pregressa recente (dois meses) e atual sobre a ausência de qualquer tipo de infecção e/ou de tratamentos, além de resultados dos exame físico, endoscópico, ventigráfico, citologia broncoalveolar, leucograma e dosagem de fibrinogênio plasmático dentro dos parâmetros de normalidade.

O grupo Doente foi selecionado considerando-se o mesmo critério aplicado no grupo Controle para a história pregressa recente (dois meses), atual e resultados de leucograma e dosagem de fibrinogênio. Além disso, os animais deveriam apresentar alterações clínicas sugestivas de DIVA, no mínimo em dois exames, sendo que o exame endoscópico e de citologia broncoalveolar deveriam estar sempre compatíveis com quadros de DIVA.

3.2 TRIAGEM

3.2.1 Exame físico

Foram registrados os dados de identificação, a idade, o peso, o estado geral, a atitude, o comportamento, o aspecto das mucosas aparentes, linfonodos, os parâmetros vitais e as informações colhidas à inspeção, palpação, percussão e ausculta do aparelho respiratório.

Os animais foram considerados sadios ao exame físico, quando apresentaram parâmetros vitais dentro dos limites fisiológicos segundo Houston e Radostits (2002) e também quando os achados de percussão e ausculta pulmonar não revelaram alterações segundo McGorum et al. (2002).

Foram considerados doentes os que apresentaram mais de uma dentre as seguintes manifestações clínicas: intolerância ao exercício, rinorréia, tosse, dispnéia, dilatação de narinas, hipersonoridade com aumento caudo-ventral de mais de quatro cm à percussão dos campos pulmonares e auscultação pulmonar com ruídos respiratórios normais aumentados (ruídos bronquiais, bronco-vesiculares e vesiculares) e ruídos respiratórios anormais tais como: crepitações finas e/ou grosseiras, sibilos ou roncos.

3.2.2 Exame endoscópico

Os exames foram executados com fibroscópio¹ com 9 mm de diâmetro externo, 2,8 mm de diâmetro no canal de trabalho e 100 cm de comprimento. O aparelho respiratório foi examinado desde os meatos nasais (bilateralmente) até a traquéia. Foram considerados sadios os animais que apresentaram a traquéia em condições de normalidade (mucosa brilhante, íntegra e de coloração pálida, sem a presença de qualquer tipo de exsudato).

Foram considerados doentes os animais que apresentaram exsudato na traquéia, com ou sem hiperemia e/ou facilidade na provocação de tosse pela presença do endoscópio nesta região.

3.2.3 Hemograma e determinação do fibrinogênio plasmático

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular em volume aproximado de três mL e acondicionadas em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético². O hemograma e determinação do fibrinogênio plasmático foram executadas conforme as metodologias descritas por Coles (1984). Todos os animais do experimento obrigatoriamente estavam dentro dos parâmetros de normalidade para leucometria total e específica, bem como para os valores do fibrinogênio plasmático (Apêndices E, F, G e H), segundo os valores de referência de Tyler et al. (1987).

¹ GIF-PQ 20, Olympus

² VACUTAINER®, Becton Dickinson UK Ltd

3.2.4 Aferição indireta da pressão intrapleural (Ventigrafia)

A pressão intrapleural foi indiretamente aferida através da utilização de um balão esofágico preso à extremidade distal de um cateter conectado a um transdutor de pressão interligado a um fisiógrafo³. As mensurações foram registradas em papel milimetrado. Alterações na pressão esofágica (pico inspiratório-pico expiratório) durante o ciclo respiratório (respiração Tidal) medidos desta forma refletem a diferença máxima de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima). Foram considerados sadios os animais que apresentaram ΔP_{pl} máxima de até 4 cm de H₂O e doentes os que apresentaram valores acima deste (de acordo com SANCHES, 1998).

3.2.5 Obtenção do lavado broncoalveolar

Os animais foram contidos com cachimbo e sedados com cloridrato de romifidina⁴ na dosagem de 0,04 mg/kg, IV. Executou-se a higienização das narinas com água destilada e sabão neutro. Uma sonda de silicone⁵ previamente esterilizada em autoclave foi inserida até a faringe através do meato nasal inferior, um a dois minutos após instilação na glote e traquéia de pequena quantidade da solução de cloridrato de lidocaína a 0,5% sem vaso constritor aquecida a 37°C.

Com a cabeça do equino posicionada em extensão da articulação atlanto-occipital, o mais horizontal possível, inseriu-se a sonda na traquéia. Uma vez neste local, instilou-se mais

³ Ventigraph®, Boehringer Inegelheim, Divisão Vetmédica

⁴ Sedivet®, Boehringer Inegelheim, Divisão Vetmédica

⁵ Equine bronchoalveolar lavage catheter®, Bivona, USA

20-30 mL da solução de cloridrato de lidocaína. A instilação do anestésico local prosseguiu de forma contínua conforme o avanço da sonda e o desencadeamento da tosse, não ultrapassando um volume total de 60 mL. Avançou-se com a sonda lentamente até encontrar-se resistência. Neste ponto inflou-se o balão com até 10 mL de ar e fixou-se a extremidade posterior da sonda através de equipos plásticos ao cabresto.

Um frasco de 250 mL de solução salina 0,9% aquecida a 37°C foi acoplado a um equipo, que estava conectado à sonda através de uma torneira descartável de três vias⁶. Através de insuflação do frasco de solução salina com pêra de borracha, infundiu-se todo o volume, sob pressão. Em seguida o registro da torneira foi reposicionado abrindo para a outra saída onde estava conectada uma seringa de 60 mL para aspiração do fluido infundido. Quando o volume recuperado não era suficiente (menos de 50 mL), fazia-se nova infusão de 250 mL.

O fluido aspirado foi acondicionado em frasco estéril, graduado, de vidro com capacidade para 250 mL⁷. Adicionou-se 2 mL de uma suspensão de antibióticos contendo 100 UI de Penicilina + 100 µg/mL de Sulfato de Estreptomicina e 1 mL de Anfotericina B na dosagem de 50 µg/mL⁸. O frasco foi mantido em gelo até a hora do processamento laboratorial.

As características macroscópicas do lavado foram classificadas segundo um escore pela atribuição de valor de um a três levando-se em conta a variação de coloração, turbidez, tamanho e quantidade de partículas em suspensão, segundo McKane et al. (1993) e modificado por Mori (2000) (Quadro 3). Para cada amostra obtida foi atribuído um valor total final oriundo do somatório dos valores para cada característica.

⁶ Mark Med

⁷ Schott, Duran, USA

⁸ Fungizon[®], Squibb

<i>Escore</i>	<i>Característica do Lavado Broncoalveolar</i>		
	<i>Coloração</i>	<i>Turbidez</i>	<i>Nº e tamanho de partículas mucóides</i>
0	Ausente	Transparente	Ausente
1	Rosa	Translúcido	Poucas partículas pequenas
2	Vermelho	Turvo	Muitas partículas pequenas
3	Vermelho escuro	Opaco	Muitas partículas grandes

Quadro 3 – Características macroscópicas do LBA de cavalos segundo McKane et al. (1993) e modificado por Mori (2000)

3.2.5.1 Citologia do lavado broncoalveolar

Alíquotas de 200 µL da suspensão celular do lavado broncoalveolar (LBA) foram submetidas a citocentrifugação⁹ à 28g durante 6 minutos. Este procedimento foi realizado num prazo máximo de 4 horas após a coleta. As lâminas foram confeccionadas em duplicata, fixadas com álcool metílico p. a.¹⁰ e coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de imersão¹¹ com aumento de 1000x, sendo analisados os tipos celulares após contagem de 600 células. Foram considerados sadios os animais cuja contagem diferencial apresentou menos de 5% de neutrófilos. Para o grupo Doente foram considerados valores de neutrófilos iguais ou acima de 7%. Para ambos os grupos estas células não apresentavam características tóxicas, degenerativas e/ou de fagocitose bacteriana.

⁹ Cytospyn®, Incibrás

¹⁰ Merck®

¹¹ BX 40®, Olympus

3.2.5.2 Determinação da viabilidade e ajuste da concentração de leucócitos presentes no LBA

Alíquotas de LBA foram centrifugadas¹² a 450g durante 12 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640¹³ contendo 100 UI de Penicilina + 100 µg de Sulfato de Estreptomicina/mL. A uma alíquota de 10 µL desta suspensão celular adicionou-se 90 µL de solução de Azul de Trypan a 0,1% e realizou-se a contagem em Câmara de Neubauer, no quadrante dos leucócitos, em microscopia óptica¹¹ com aumento de 400x. As células que adquiriram coloração azul foram consideradas inviáveis (teste viabilidade por exclusão do Azul de Trypan). Utilizaram-se amostras com, no mínimo, 80% de células viáveis (Apêndice N). A contagem obtida foi multiplicada por 10⁴ (fator da câmara) e por 10 (diluição da alíquota para contagem), de modo a obter-se a contagem total. Após este procedimento, ajustou-se a concentração de células viáveis para 5 x 10⁶ células/mL.

3.3 Avaliação da atividade dos macrófagos alveolares

3.3.1 Teste de fagocitose de ZYMOSAN (SIGMA®)

Alíquotas de 200 µL da suspensão celular, contendo 10⁶ células, foram plaqueadas, em lamínulas de vidro estéril, de 13 mm de diâmetro¹⁴ em placas de 24 poços¹⁵, contendo 200 µL de RPMI 1640¹³ enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)¹⁶ inativado pelo calor. Após 1 hora a 37°C em atmosfera de 7% CO₂, as monocamadas foram lavadas com Solução

¹² Centra MP 4R®, Centrífuga refrigerada, IEC

¹³ GIBCO BRL®

¹⁴ Glasstécnica®

¹⁵ Costar® 3424

¹⁶ Fetal Clone I, Hyclone Lab. Inc. Logan, Utah, USA

Salina Fosfatada Tamponada (PBS) estéril a 37°C, para a remoção das células não aderentes, e 300 µL do RPMI 1640 a 37°C enriquecido foram adicionados. Os macrófagos foram contados em microscópio invertido¹⁷ e colocaram-se, nos poços, alíquotas de uma suspensão de parede de células mortas de *Saccharomyces cerevisiae*¹⁸ na proporção Zymosan:macrófago de 10:1.

As partículas de Zymosan permaneceram em contato com as células por 1 hora a 37°C e 7% CO₂. Ao final do período, as lamínulas foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas em metanol p. a.¹⁹ e coradas pelo Giemsa²⁰. Estas lamínulas foram desidratadas por passagens sucessivas em misturas de acetona p. a.²¹ e xilol p. a.²² nas proporções de 9:1, 7:3 e 3:7 e finalmente em xilol p.a. Por último foram montadas em lâminas para microscopia de 26x76 mm utilizando-se Permount²³.

Os experimentos foram feitos em duplicata e as leituras realizadas em microscópio óptico de imersão com aumento de 1000x. Foram contadas 400 células e os índices fagocíticos foram obtidos através do produto da percentagem de macrófagos que fagocitaram as partículas de Zymosan pelo número de partículas/macrófago.

3.3.2 Interação *Leishmania braziliensis* -macrófago

Para este experimento utilizaram-se macrófagos aderidos em lamínulas como descrito anteriormente. Promastigotas de *L. braziliensis* cepa 3456 foram usados para infectar macrófagos na mesma proporção do experimento anterior. Da mesma forma, as células

¹⁷ IX 70®, Olympus

¹⁸ Zymosan®, Sigma

¹⁹ Merck

²⁰ Merck

²¹ Reagen

²² Reagen

²³ Fischer Scientific, NJ, USA

permaneceram em contato pelo mesmo tempo e submetidas às mesmas condições previamente citadas. Este experimento foi realizado em quadruplicata. Decorrido o tempo de contato, retirou-se 2 lamínulas e procedeu-se da mesma forma como no Zymosan. Os dois poços restantes na placa foram lavados com PBS a 37°C, de modo a retirar-se os parasitas que não foram fagocitados. Colocaram-se 300 µL de RPMI 1640 enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino a 37°C. Manteve-se o cultivo em estufa a 37°C com 7% de CO₂ por um total de 48 horas a contar da infecção. Ao término do período procedeu-se da mesma forma como já citado. Procedeu-se as contagens e determinações dos índices fagocíticos após uma e 48 horas pós-infecção. A percentagem de sobrevivência do parasita dentro do macrófago após 48 horas foi calculada considerando-se os índices fagocíticos de 1 hora como 100% de sobrevivência conforme a metodologia de Pinto-da-Silva et al. (2002).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa computacional Bioestat 2.0 (AYRES et al., 2000) adotando-se o nível de significância 5% para os testes utilizados.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 FUNÇÕES VITAIS

Apesar da temperatura no grupo Controle ter sido significativamente mais alta ($37,97 \pm 0,31^{\circ}\text{C}$ para o grupo Controle e $37,61 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ para o grupo Doente; $p < 0,05$), este parâmetro manteve-se dentro dos limites fisiológicos em ambos os grupos (Tabela 1 e Gráfico 1).

Da mesma forma que a temperatura, a Frequência Cardíaca (FC) apresentou valores mais altos no grupo Controle ($35,07 \pm 3,45$ BPM para o grupo Controle e $30,88 \pm 3,64$ para o grupo Doente; $p < 0,05$), mas não ultrapassou os limites fisiológicos (Tabela 1, Gráfico 1 e Apêndices C e D).

Para a Frequência Respiratória, não ocorreu diferença entre os grupos ($11,87 \pm 3,42$ MPM para o grupo Controle e $13,29 \pm 3,93$ para o grupo Doente; $p > 0,05$, Tabela 1, Gráfico 1 e Apêndices C e D).

Tabela 1 – Resultado da avaliação das funções vitais (temperatura, frequência cardíaca e frequência respiratória) dos dois grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupo	N	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Frequência Cardíaca (BPM)	Frequência Respiratória (MPM)
Controle	15	$37,97 \pm 0,31^a$	$35,07 \pm 3,45^a$	$11,87 \pm 3,42^a$
Doente	17	$37,61 \pm 0,25^b$	$30,88 \pm 3,64^b$	$13,29 \pm 3,93^a$

Resultados expressos como média $\pm$ 1 DP; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA; $p < 0,05$). BPM: batimentos por minuto; MPM: movimentos por minuto

Gráfico 1 – Representação gráfica da avaliação das funções vitais (temperatura, frequência cardíaca e frequência respiratória) dos dois grupos experimentais. T: temperatura; FC: frequência cardíaca (Batimentos por Minuto); FR: frequência respiratória (Movimentos por Minuto)

4.2 RESULTADOS DO EXAME CLÍNICO DO APARELHO RESPIRATÓRIO

4.2.1 Exame Físico

Foram executados 15 exames físicos no grupo Controle e 17 no grupo Doente. A presença de secreção seca nas narinas foi observada em quatro exames no grupo Controle e em seis exames no grupo Doente. Detectou-se rinorréia também em 4 exames no grupo Controle e em 10 no grupo Doente. Não se detectou tosse nem alterações percutórias dos campos pulmonares em nenhum dos dois grupos. Alterações à ausculta pulmonar (ruído bronco-vesicular aumentado) foram detectadas em 8 exames do grupo Doente (Tabela 2, Gráfico 2 e Apêndices I e J). Apesar da detecção de alterações físicas, principalmente no grupo Doente, não ocorreu diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Resultado do exame físico dos eqüinos dos dois grupos experimentais (frequência absoluta e percentual). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Alterações físicas	Controle (%)	Doente (%)
Secreção seca nas narinas	4 (15)	6 (35,3)
Rinorréia	4 (15)	10 (58,8)
Alterações de percussão pulmonar	-	-
Alterações de ausculta pulmonar	-	8 (47)

Grupo Controle n=15 e Doente n= 17. Análise Multivariada (Teste de Hotelling; $p>0,05$), não houve diferenças significativas

Gráfico 2 – Representação gráfica do resultado do exame físico (frequência relativa) de alterações físicas no aparelho respiratório dos eqüinos dos dois grupos experimentais

4.2.2 Endoscopia

Foram executadas oito endoscopias no grupo Controle e nove no grupo Doente. As alterações endoscópicas compatíveis com processos inflamatórios do trato respiratório inferior encontradas no grupo Doente estão descritas no apêndice L.

4.2.3 Aferição indireta da Pressão Intrapleural (Ventigrafia)

Foram executadas 8 medidas da diferença de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima) no grupo Controle e 9 no grupo Doente. Todos os animais apresentaram valores normais, não sendo registradas diferenças significativas entre os grupos ($2,68 \pm 0,54$ cm de H_2O para o grupo Controle e $2,78 \pm 0,67$ para o grupo Doente; $p < 0,05$, Tabela 3, Gráfico 3 e Apêndice M).

Tabela 3 – Resultado da aferição da diferença de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima) nos animais do experimento, segundo os grupos. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupo	N	Diferença de pressão intrapleural (P_{pl}) máxima (cm H_2O)
Controle	8	$2,68 \pm 0,54^a$
Doente	9	$2,78 \pm 0,67^a$

Resultados expressos em valores médios $\pm$ 1 DP. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA; $p < 0,05$)

Gráfico 3 – Representação gráfica do resultado da aferição da diferença de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima) nos animais do experimento, segundo os grupos

4.2.4 Lavado broncoalveolar

A contagem leucocitária global do LBA no grupo Doente foi significativamente mais alta ($3,39 \pm 1,90 \times 10^5$ células /mL) que no grupo Controle ($2,31 \pm 0,96 \times 10^5$; $p < 0,05$), como exemplificado na tabela 4, gráfico 4 e apêndices O e P.

O escore macroscópico (Tabela 4, Gráfico 5 e Apêndices O e P) foi significativamente mais elevado no grupo Doente ($4,07 \pm 1,39$) que no Controle ($2,87 \pm 0,64$; $p < 0,05$).

Tabela 4 – Resultado da contagem de leucócitos ($n \times 10^5$ /mL) e escore macroscópico do LBA nos equinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupos	Leucócitos totais ($\times 10^5$ /mL)	Escore
Controle (n=15)	$2,31 \pm 0,96^a$	$2,87 \pm 0,64^a$
Doente (n=17)	$3,39 \pm 1,90^b$	$4,07 \pm 1,39^b$

Valores médios $\pm$ 1 DP. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA; $p < 0,05$)

Gráfico 4 – Representação gráfica da contagem de leucócitos ($\times 10^5$ /mL) do LBA nos equinos dos grupos experimentais

Gráfico 5 – Representação gráfica do escore macroscópico do lavado broncoalveolar nos equinos dos grupos experimentais

Os valores percentuais das contagens diferenciais de neutrófilos ($15,08 \pm 8,59$), macrófagos espumosos ($25,06 \pm 13,94$), eosinófilos ($1,19 \pm 1,85$) e células epiteliais ($2,98 \pm 3,46$) foram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) no grupo Doente quando comparados ao grupo de animais controle, onde os valores encontrados foram respectivamente: $2,23 \pm 1,20$; $6,00 \pm 7,15$; $0,42 \pm 1,02$ e $0,23 \pm 0,43$ (Figuras 1, 2 e 5, Tabela 5, Gráfico 6 e Apêndices Q e R).

Para os linfócitos ($41,3 \pm 9,60$ no grupo Controle e $35,91 \pm 10,43$ no grupo Doente), células gigantes ($0,21 \pm 0,37$ no Controle e $0,48 \pm 0,58$ no Doente) e mastócitos ($2,43 \pm 2,30$ no Controle e $3,19 \pm 2,28$ no Doente) não ocorreram diferença significativa ($p > 0,05$; Figuras 1, 2 e 4, Tabela 5, Gráfico 6 e Apêndices Q e R).

Macrófagos totais ($53,11 \pm 7,85$) e hemossiderófagos ($1,69 \pm 4,23$) foram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) no grupo Controle que no Doente ($41,14 \pm 7,45$ e $1,01 \pm 2,00$ respectivamente, Figuras 1 e 3, Tabela 5, Gráfico 6 e Apêndices Q e R).

Figura 1 – Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Doente. Presença de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, macrófago espumoso (seta) e material fagocitado. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x

Figura 2 – Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA de um animal do grupo Doente. Presença de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, macrófago espumoso. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x

Figura 3 –Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Controle. Presença hemossiderófagos. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x

Figura 4 –Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Doente. Presença de células gigantes. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x

Figura 5 –Fotomicrografia digitalizada de citologia de LBA no grupo Doente. Presença de células epiteliais ciliadas e célula produtora de muco (seta). Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de imersão, aumento 1000x

Tabela 5 – Resultados da contagem diferencial para células presentes no lavado broncoalveolar dos eqüinos dos grupos experimentais.
Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupo	Neutrófilo	Linfócito	Macrófago			Célula Gigante	Eosinófilo	Mastócito	Célula Epitelial
			Total	Hemossiderófago	Espumoso				
Controle (n=15)	2,35	41,33	53,11	1,69	6,00	0,21	0,42	2,43	0,23
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,20 ^a	9,60 ^a	7,85 ^a	4,23 ^a	7,15 ^a	0,37 ^a	1,02 ^a	2,30 ^a	0,43 ^a
Doente (n=17)	15,08	35,91	41,14	1,01	25,06	0,48	1,19	3,19	2,98
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	8,59 ^b	10,43 ^a	7,45 ^b	2,00 ^b	13,94 ^b	0,58 ^a	1,85 ^b	2,28 ^a	3,46 ^b

Resultados expressos em valores percentuais médios ± 1 DP. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA; p<0,05).

Gráfico 6 – Representação gráfica da contagem diferencial para células presentes no lavado broncoalveolar dos equinos dos grupos experimentais

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Com relação ao Índice fagocítico (Ifag) de Zymosan após uma hora de interação, os valores de $157,16 \pm 124,70$ (grupo Controle) e $188,58 \pm 71,96$ (grupo Doente) não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Tabela 6, Gráfico 7 e Apêndices S e T).

Também não ocorreu diferença significativa entre os grupos ($48,72 \pm 16,42$ para o Controle e $56,19 \pm 14,34$ para o Doente; $p > 0,05$) com relação ao percentual de macrófagos que fagocitaram Zymosan (Figura 6, Tabela 7, Gráfico 8 e Apêndice U).

Tabela 6 – Resultado do teste de fagocitose de Zymosan e de *Leishmania braziliensis* por macrófagos alveolares dos eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupos	Ifag-Zymozan (1h)	Ifag- <i>Leishmania braziliensis</i> (1h)
Controle	$157,16 \pm 124,70^a$	$130,00 \pm 97,72^a$
Doente	$188,58 \pm 71,96^a$	$60,61 \pm 27,01^b$

Resultados expressos como Índice fagocítico (Ifag) médio $\pm$ 1 DP, após 1 hora de interação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de proporção de médias; $p < 0,05$)

Gráfico 7 – Representação gráfica dos índices fagocíticos (Ifag) para Zymosan e para *Leishmania braziliensis* por macrófagos alveolares dos eqüinos dos grupos experimentais, após 1 hora de interação

Tabela 7 – Resultados da fagocitose de Zymosan por macrófagos alveolares (percentual) dos eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupo	Percentual de fagocitose (%)
Controle (n= 15)	48,72 $\pm$ 16,42 ^a
Doente (n= 17)	56,19 $\pm$ 14,34 ^a

Resultados expressos em percentual médio $\pm$ 1DP, após 1 hora de interação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA; $p < 0,05$)

Gráfico 8 – Representação gráfica dos resultados da fagocitose de Zymosan por macrófagos alveolares (percentual) dos eqüinos dos grupos experimentais

O Ifag para *L. braziliensis*, após uma hora de interação, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (130,00 $\pm$ 97,72 para o grupo Controle e de 60,61 $\pm$ 27,01 para o grupo Doente; $p < 0,05$), como ilustrado na figura 7, tabela 6, gráfico 7 e apêndices S e T.

O Índice de Sobrevivência (IS) da *L. braziliensis* após 48h de infecção (Figuras 8 e 9, Tabela 8, Gráfico 9 e Apêndice V) também foi significativamente menor no grupo Doente (18,85 $\pm$ 13,14) que no Controle (43,29 $\pm$ 23,29; $p < 0,05$).

Tabela 8 – Resultado dos índices de Sobrevivência (IS) da *Leishmania braziliensis* após 48h de infecção dos macrófagos alveolares de eqüinos dos grupos experimentais. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupo	IS da <i>L. braziliensis</i> (após 48h)
Controle (n=14)	43,30 ± 23,29 ^a
Doente (n=17)	18,85 ± 13,14 ^b

Resultados expressos em média ± 1 DP, após 48 horas de interação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA; $p < 0,05$)

Gráfico 9 – Representação gráfica dos índices de Sobrevivência (IS) da *Leishmania braziliensis* após 48h de infecção dos macrófagos alveolares dos eqüinos dos grupos experimentais

Figura 6 – Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-Zymosan. Macrófagos com partículas de Zymosan fagocitadas (setas). Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x

Figura 7 – Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-*L. braziliensis*. Presença de parasitas intracelulares (setas) após 1 hora de interação. Grupo Doente. Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x

Figura 8 – Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-*L. braziliensis*. Macrófagos infectados após 48 horas de interação. Presença de parasitas intracelulares (setas). Grupo Controle. Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x

Figura 9 – Fotomicrografia digitalizada de interação macrófago-*L. braziliensis*. Macrófagos infectados após 48 horas de interação. Presença de parasita intracelular (seta). Grupo Doente. Coloração de Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000x

5 DISCUSSÃO

Apesar da temperatura ter sido significativamente mais elevada no grupo Controle, quando comparada ao grupo Doente, esta ainda manteve-se dentro dos limites fisiológicos considerados por Houston e Radostits (2002). A normotermia observada no grupo Doente está em concordância com Ferro et al. (2002), Moore (1996) e Vrins et al. (1991), indicando ser o processo inflamatório pulmonar localizado e provavelmente sem maiores repercussões sistêmicas.

O parâmetro frequência cardíaca apresentou comportamento semelhante ao observado para a temperatura. Provavelmente em função das características comportamentais e de temperamento próprias de cada animal frente à situação de exame físico.

Dispnéia em repouso e/ou aumento na frequência respiratória são achados compatíveis com DIVA (DERKSEN et al. 1989; FOGARTY; BUCKLEY, 1991; VIEL, 1997b; VRINS et al., 1991). Frequência respiratória dentro de valores de normalidade em repouso, e que foi observado neste trabalho, também foi descrita por Viel (1997a). Este fenômeno pode ter acontecido em função do processo inflamatório pulmonar não ter sido grave o suficiente para determinar alterações morfo-funcionais relevantes, caracterizando assim uma enfermidade assintomática.

Presença de secreções secas nas narinas em casos de DIVA, conforme observado neste experimento, não foi relatado por nenhum outro autor. Este achado em animais do grupo Controle pode estar relacionado com afecções do trato respiratório superior, ou ainda ser reflexo das condições climáticas a que estão submetidos os animais do experimento.

O percentual de rinorréia observada ao exame físico dos animais do grupo Doente é maior do que o verificado por Derksen et al. (1989) e menor do que o observado por Moore et

al. (1995), porém está muito próximo do valor encontrado por Ferro et al. (2002). A observação de rinorréia em animais com DIVA também foi assinalada por Fogarty e Buckley (1991) e Vrins et al. (1991). A presença de rinorréia no grupo Controle pode também estar relacionada com afecções das vias aéreas anteriores.

Animais com DIVA podem apresentar alterações percutórias dos campos pulmonares (Viel, 1997a). A ausência de tais alterações no grupo Doente pode estar relacionada ao baixo grau de lesão causada por esta enfermidade, conforme já mencionado anteriormente, não sendo grave o suficiente para determinar alterações morfo-funcionais relevantes que pudessem ser percebidas à percussão, caracterizando desta forma uma enfermidade assintomática.

O percentual de alterações auscultatórias observadas neste trabalho, diverge dos valores relatados por Derksen et al. (1989), Moore (1995) e Vrins et al. (1991). Porém não foram raros conforme afirmam Hodgson e Hodgson (2002), Moore (1996) e Moore et al. (1995). Dentre as alterações verificadas à auscultação, são relatados os sibilos (MOORE et al., 1995; VIEL, 1997a) e mais raramente as crepitações (VIEL, 1997a). Ruídos bronquiais aumentados também foram relatados por Viel (1997a). Neste trabalho verificou-se um aumento no ruído bronco-vesicular, provavelmente decorrente de alterações inflamatórias capazes de alterar a dinâmica do fluxo de ar nas vias aéreas condutoras de pequeno calibre.

Apesar da predominância absoluta e relativa dos achados clínicos do aparelho respiratório no grupo Doente, a detecção de diferenças não significativas entre os grupos reforça a condição assintomática da enfermidade. Estes achados corroboram Burrell (1985), Burrell et al. (1996), Christley et al. (2001a), Couëtil et al. (2001), Hodgson e Hodgson (2002), Hoffman (1995), Holcombe et al. (2001), Lessa et al. (2002), Sweeney et al. (1992a) e Viel (1986).

Quanto à natureza mucosa das secreções observadas à endoscopia traqueal, os achados deste experimento corroboram os resultados de Burrell (1985), Christley et al. (2001a), Dixon (1997) e Viel (1997a), mas diferem de Couëtil et al. (2001), Fogarty e Buckley (1991), Vrins et al. (1991) e Whitwell e Greet (1984), que relataram secreções mucopurulentas. Estas diferenças podem estar relacionadas com o tempo de evolução da doença, o baixo grau do processo inflamatório e a intensidade do influxo neutrofílico decorrente do mesmo. A facilidade de provocação da tosse pela presença do endoscópio na traquéia, conforme foi observado neste trabalho, também foi salientada por Viel (1997a). A hiperemia traqueal também foi descrita por Dixon (1997) e Viel (1997a).

A hiperemia laríngea verificada neste trabalho, que também caracteriza quadros inflamatórios do trato respiratório anterior em animais com DIVA, não foi relatada na literatura revisada, porém outros achados compatíveis com inflamação do trato respiratório anterior como por exemplo, diferentes graus de hiperplasia folicular linfóide, foram observados por Ferro et al. (2002) em animais com esta enfermidade. McKane et al. (1993) constataram presença de doença inflamatória pulmonar de baixo grau em animais que apresentavam evidências de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, o que também foi observado em um dos animais deste trabalho. Isto pode ter ocorrido em função do sangue agir como agente agressor da mucosa, pela hiperemia decorrente do processo inflamatório e/ou fragilidade tissular da mucosa inflamada.

Mesmo sendo o valor da diferença de pressão intrapleural no grupo Doente maior que no Controle, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles, além disso, os valores estão dentro dos padrões de normalidade em ambos os grupos. Isto pode estar relacionado ao fato da baixa intensidade do processo inflamatório, fato este que corrobora as informações de Dixon (1997), Mair e Derksen (2000) e Robinson (2002).

Os valores para a leucometria global no LBA registrados no grupo Controle estão acima dos assinalados por McGorum et al. (1993) e Moore et al. (1995) e semelhantes aos de Sweeney e Beech (1991). Todavia estão abaixo dos verificados por Couëtil e Denicola (1999), Couëtil et al. (2001), Hare et al. (1994), Hare e Viel (1998) e Lapointe et al. (1994). No grupo Doente os valores encontrados estão abaixo dos relatados por Couëtil e Denicola (1999), Couëtil et al. (2001), Hare et al. (1994), Hare e Viel (1998), Moore et al. (1995) e Vrins et al. (1991). Por outro lado, estão acima dos observados por Holcombe et al. (2001) e semelhantes aos de Ferro et al. (2002). Estas diferenças podem estar relacionadas com diferenças na intensidade do processo inflamatório e com a leucotaxia para a superfície da mucosa do trato respiratório posterior, proporcional a este estado inflamatório. A diferença significativa observada, entre os grupos experimentais, na leucometria global no LBA caracteriza leucocitose e confirma o estado inflamatório pulmonar.

O valor de escore macroscópico encontrado no grupo Controle está abaixo do observado por McKane et al. (1993). Esta divergência pode estar relacionada ao fato desses autores terem trabalhado com animais sem aparentes problemas de performance, mas que apresentaram HPIE e algum grau de inflamação pulmonar. Por outro lado, ficou acima do valor encontrado por Mori (2000) para animais hígidos, provavelmente em função da maior celularidade observada neste trabalho. McGorum e Dixon (1994) afirmam que em animais normais, o LBA é discretamente turvo, fato que também foi verificado neste trabalho. A diferença entre os grupos experimentais também ratifica o estado inflamatório, pois a modificação do escore deve-se ao aumento da celularidade além da presença de secreções que vão conferir modificações de cor, de transparência, de quantidade e tamanho de partículas no lavado. McGorum e Dixon (1994) e Viel (1997a) também descreveram modificações no aspecto macroscópico do LBA que são compatíveis com as observadas neste trabalho.

Apesar das variações observadas na literatura com relação ao valor percentual da contagem diferencial para neutrófilos em animais saudáveis, Couëtil e Denicola (1999), Lapointe et al. (1994), Moore et al. (1995) e Sweeney et al. (1992b) registraram valores acima do observado neste trabalho, mas ainda abaixo de 5% considerados normais. Valores abaixo dos observados neste trabalho foram descritos por Hare et al. (1994), Hare e Viel (1998), McGorum et al. (1993) e Viel (1997a). Isto pode ser explicado pelas observações de Sweeney et al. (1992b) que verificaram um aumento no percentual de neutrófilos e redução no de mastócitos na razão inversa do aumento de volume infundido. Ainda que exista discordância na literatura quanto aos valores de normalidade para neutrófilos, as diferenças observadas em outros tipos celulares e o maior estado de ativação dos macrófagos alveolares no grupo Doente, conforme pode ser observado pelos resultados do índice de sobrevivência de *L. braziliensis* (após 48 horas de cultivo), ratificam os limites de neutrófilos adotados neste trabalho para distinguir os grupos.

Com relação ao percentual de neutrófilos nos animais com DIVA os valores registrados neste trabalho estão abaixo dos relatados por Couëtil et al. (2001) e Vrins et al. (1991), porém encontram-se acima dos registrados por Ferro et al. (2002), Hare et al. (1994), Hare e Viel (1998) e Moore et al. (1995), porém estes valores estão dentro da faixa de variação relatada por Viel (1997a). Quadros citológicos de neutrofilia também foram assinalados por Couëtil e Denicola (1999), Freeman e Roszel (1997) e Hoffman (1995; 1999). A atividade atlética é considerada como um fator de risco importante para a DIVA, uma vez que o aumento na velocidade do fluxo, bem como do volume captado durante o exercício facilita a penetração de impurezas no trato respiratório posterior que podem ser fatores de agressão para o mesmo. Há de se considerar que o exercício físico facilita a detecção clínica das manifestações funcionais como tosse, dispnéia e intolerância ao exercício nos animais enfermos. Como no policiamento urbano geralmente os animais andam ao passo ou ficam

parados em determinados locais durante longos períodos do dia, condição que os mantém expostos à intensa poluição urbana, mesmo eles apresentando quadros inflamatórios como os aqui diagnosticados, podem não apresentar as manifestações clínicas acima citadas. Da mesma forma, Holcombe et al. (2001) também concluíram que um grau relativamente moderado de inflamação pode não ser clinicamente detectável em animais de passeio.

O percentual de linfócitos para ambos os grupos não diferiram estatisticamente e mantiveram-se dentro de valores compatíveis com aqueles relatados por Ferro et al. (2000), Hoffman (1999), Holcombe et al. (2001), Hare et al. (1994), McGorum et al. (1993), Moore et al. (1995), Sweeney e Beech (1991) e Viel (1997a). Reduções não significativas no percentual destas células também foram relatadas por Holcombe et al. (2001) e podem meramente refletir variações nas proporções das populações celulares, uma vez que a avaliação é percentual, e no grupo Doente verificou-se um aumento significativo nos neutrófilos.

À semelhança do que ocorreu com os linfócitos, a redução no percentual de macrófagos no grupo Doente, mesmo tendo sido significativa, também pode ter sido em função de variações nas proporções das populações celulares, uma vez que os valores encontrados para ambos os grupos estão em conformidade com Ferro et al. (2002), Hoffman (1999), Holcombe et al. (2001), McGorum et al. (1993), Viel (1997a) e Vrins et al. (1991) tanto para animais sadios quanto doentes.

Em ambos os grupos, os valores para hemossiderófagos estão abaixo dos observados por Couëtil e Denicola (1999), Fogarty (1990) e McKane et al. (1993). A presença destes macrófagos caracteriza hemorragia pulmonar (MCGORUM; DIXON, 1994; MCKANE, 1993), mas também podem ser observados em outras situações clínicas (ROSZEL et al., 1988). A diferença observada entre os dois grupos estudados corresponde ao fato do grupo Controle ser formado por animais que apresentam atividade atlética (salto, pólo e instrução

militar) e, por conseguinte, poderem apresentar algum grau de hemorragia pulmonar. No grupo com DIVA, os animais utilizados em policiamento desenvolvem atividades geralmente ao passo, minimizando as chances de hemorragia pulmonar induzida por esforço.

Macrófagos alveolares de animais sadios apresentam um mínimo de vacuolizações citoplasmáticas (MOORE, 1996). Uma vez que macrófagos espumosos são compatíveis com estados de ativação e estão presentes em processos inflamatórios alérgicos pulmonares (FREEMAN; ROSZEL, 1997) assim como em animais com DIVA (MCKANE et al., 1993; VRINS et al., 1991), o aumento destas células no grupo Doente corrobora as informações acima e indica que realmente existe certo grau de processo inflamatório no trato respiratório posterior.

Células multinucleadas podem ser uma resposta a uma irritação não específica e sugerem um processo granulomatoso ou inflamatório crônico (BEECH, 1975). A presença de tais células em animais sadios também foi assinalada por (FERNANDES et al., 2000; MCGORUM; DIXON, 1994). O aumento na contagem destas células é considerada evidência de DIVA (SWEENEY et al., 1992a). Ainda que o valor para o grupo com DIVA tenha sido maior, a ausência de diferença estatística pode ser justificada pelo fato da inflamação não ter sido tão intensa a ponto de haver necessidade de fusão de células para o combate aos agentes agressores.

Ainda que os valores para eosinófilos no grupo Doente não tenham sido tão elevados quanto os observados por Ferro et al. (2002), Hare e Viel (1998) e Viel (1997), foram praticamente o triplo do valor para o grupo Controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa, caracterizando assim eosinofilia. Este quadro citológico também foi assinalado por Bain (1997), Ferro et al. (2002), Freeman e Roszel (1997) e Viel (1997a). Considerando-se que na dinâmica temporal das populações celulares nos processos inflamatórios alérgicos, a eosinofilia é tardia, os resultados aqui encontrados são plausíveis, pois os cavalos de

policiamento estão nesta atividade há vários anos e provavelmente convivem com a enfermidade por tempo consideravelmente longo.

Os valores para mastócitos na literatura consultada apresentam grande variação tanto no grupo Controle quanto no Doente. Neste último grupo, o valor está de acordo com as faixas de variação de Ferro et al. (2002), Hare et al. (1994), Hoffman (1995), Viel (1997a) e Vrins et al. (1991). Ainda que apresentando valor mais elevado para grupo com DIVA, a diferença não foi significativa. Como na dinâmica inflamatória estas células são precoces em relação aos eosinófilos, este padrão citológico se aplica aos animais em questão, semelhante a afirmação de Hoffman (1995, 1999) que observou altas contagens de mastócitos em animais jovens, e em animais mais velhos, acima de 10 anos, verificou altas percentagens de neutrófilos.

No grupo Controle, junto das células gigantes, as células epiteliais foram a menor população celular presente no LBA, corroborando McGorum e Dixon (1994). Freeman e Roszel (1997) afirmaram que o número e os tipos destas células vai variar (de nenhuma a muitas), conforme o ponto de aspiração na árvore brônquica. Esta afirmação explica por que amostras colhidas por aspiração ou lavado traqueal apresentam normalmente mais células epiteliais que amostras broncoalveolares, já que a via normal de eliminação de tais células é pelo transporte mucociliar. Para o grupo com DIVA, o valor está acima dos relatados por Hare et al. (1994), Hare e Viel (1998) e Vrins et al. (1991), e abaixo dos observados por Holcombe et al. (2001), porém, estão de acordo com Viel (1997a). Aumento significativo na contagem de células epiteliais, conforme aqui evidenciado, pode estar relacionado ao trauma ou às infecções virais, mas também ocorrem em casos de DPOC ou DIVA (HEWSON; VIEL, 2002). Este aumento nos casos de DPOC ou DIVA pode estar relacionado a aumento na taxa de renovação celular do epitélio respiratório, decorrente do processo inflamatório instalado.

Índices fagocíticos de 1 hora de interação para Zymosan e o percentual de fagocitose de Zymosan (após 1 hora de interação) não apresentaram valores significativamente distintos entre os dois grupos. Já com relação ao índice fagocítico para *L. braziliensis*, após uma hora de interação, houve redução estatisticamente significativa para o grupo doente. Isto indica que, com relação ao Zymosan, a DIVA parece não interferir na capacidade fagocítica dos macrófagos alveolares, mas com relação ao parasita, isto ocorre. Para que os macrófagos sejam infectados por este protozoário, há a necessidade de que receptores de superfície reconheçam determinadas estruturas moleculares (lipofosfolípidos) da superfície celular do parasita. Nossos resultados sugerem que receptores nos macrófagos, envolvidos no reconhecimento do parasita possam ter sido afetados no grupo doente, alterando o mecanismo de reconhecimento. Esta redução da fagocitose pode ser responsável pela manutenção da DIVA no grupo doente, uma vez que diante de um desafio constante, como o que ocorre no grupo doente, estas células talvez, por não fagocitarem todos os antígenos eficientemente, não são capazes de desencadear uma resposta definitiva e permanente contra os fatores agressivos que continuamente penetram no trato respiratório.

Com relação ao percentual de fagocitose, Crisman et al. (1992) e Traub-Dargatz et al. (1988) observaram valores maiores para o percentual de macrófagos que fagocitaram respectivamente *Streptococcus faecalis* e hemácias de carneiro marcadas com anticorpo anti-hemácia de carneiro. Esta diferença com relação aos resultados deste experimento pode ser em função das diferenças nos mecanismos de reconhecimento pelo macrófago para diferentes estruturas. Os valores percentuais determinados neste trabalho foram maiores que os de Franchini et al. (1998) para fagocitose de Zymosan, tanto em macrófagos alveolares sem, quanto com estimulação. Considerando-se que neste trabalho, os macrófagos alveolares de ambos os grupos apresentaram-se estimulados, conforme se pode inferir dos resultados do índice de sobrevivência de *L. braziliensis* após 48 horas, o comportamento de tais células foi

distinto do observado por Franchini et al. (1998) porque estes autores trabalharam com macrófagos alveolares de animais mantidos sob baixas condições de impurezas e que provavelmente poderiam não estar tão ativados. Como os animais que Mori (2000) considerou como hígidos apresentavam valores de 9,76% de neutrófilos na citologia broncoalveolar e portanto acima dos registrados para o grupo Controle deste experimento, pode ser que houvesse algum grau de inflamação no grupo estudado pelo autor e que isso possa ter refletido na atividade fagocítica dos macrófagos.

A redução da sobrevivência de *L. major* dentro de macrófagos está diretamente relacionada à ativação destas células (GREEN et al., 1990; ROITT et al., 1999). Linfocinas são necessárias para ativação macrofágica e aumentam a destruição de *L. enrietti* internalizadas por macrófagos de camundongos (ROITT et al., 1999). Baseado em tais afirmações, podemos inferir que a diferença observada no índice de sobrevivência de *L. braziliensis* após 48 horas de cultivo, ocorreu provavelmente em função dos macrófagos no grupo com DIVA estarem mais ativados que no grupo Controle. De modo semelhante, Tremblay et al. (1993) também concluíram que em animais com DPOC, estas células estavam mais ativadas. Uma vez que a característica “espumosa” é o aspecto morfológico, identificado na citologia, que caracteriza a ativação, o aumento também verificado neste tipo celular ratifica esta observação. A ativação verificada no grupo Controle está de acordo com as observações de Mori et al. (2001) em animais hígidos. É de se esperar que macrófagos alveolares já estejam ativados mesmo em animais saudáveis, face às funções deste tipo celular estudado e o permanente contato deste com o ambiente, fazendo com que o mesmo seja continuamente desafiado.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nos animais e condições deste experimento pode-se concluir que:

A doença inflamatória das vias aéreas no animais da PMERJ apresenta curso assintomático.

A reação inflamatória evidenciada na citologia broncoalveolar dos animais com DIVA caracterizou-se por neutrofilia, discreta redução no número de macrófagos com aumento no número de macrófagos espumosos e discreta eosinofilia com marcante aumento no número de células epiteliais.

Os macrófagos alveolares dos animais com DIVA, não apresentaram modificação na capacidade fagocítica com relação ao Zymosan, porém com relação a *L braziliensis* houve redução desta capacidade, quando comparada com animais do grupo sadio.

O menor índice de sobrevivência de *L braziliensis* após 48 horas de cultivo no grupo Doente é indicativo de que houve maior ativação dos macrófagos no grupo de animais com DIVA

REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. C.; GRAÇA, F. A. S.; VIANNA, L. F. C. G.; BORGES, J. R. J.; FERREIRA, A. M.; PIRES, N. R.; VOSS, C. Doença pulmonar obstrutiva crônica em eqüinos da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 77-83, 1999.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. A.; SANTOS, A. S. **BioEstat 2.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Brasília: CNPq, 2000. 259 p.
- BAILEY, C. J.; REID, S. W. J.; HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. Impact of injuries and disease on a cohort of two- and three-year-old thoroughbreds in training. **The Veterinary Record**, v. 145, n. 17, p. 487-493, 1999.
- BAIN, F. T. Cytology of the respiratory tract. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 13, n. 3, p. 477-485, 1997.
- BEECH, J. Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. **Veterinary Pathology**, v. 12, n. 3, p. 157-164, 1975.
- BUECHNER-MAXWELL, V. Normal respiratory epithelial structure and function. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 15, n. 4, p. 618-625, 1993.
- BURRELL, M. H. Endoscopic and virological observations on respiratory disease in a group of young thoroughbred horses in training. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. 2, p. 99-103, 1985.
- BURRELL, M. H.; WOOD, J. L. N.; WHITWELL, K. E.; CHANTER, N.; MACKINTOSH, M. E.; MUMFORD, J. A. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 13, p. 308-313, 1996.
- CHAPMAN, P. S.; GREEN, C.; MAIN, J. P. M.; TAYLOR, P. M.; CUNNINGHAM, F. M. Retrospective study of the relationships between age, inflammation and isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. **The Veterinary Record**, v. 146, n. 4, p. 91-95, 2000.
- CHRISTLEY, R. M.; HODGSON, 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**, v. 148, n. 4, p. 99-104, 2001a.
- CHRISTLEY, R. M.; HODGSON, D. R.; ROSE, R. J.; WOOD, J. L. N.; REID, S. W. J.; WHITEAR, K. G.; HODGSON, J. L. A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 3, p. 256-264, 2001b.

COLES, E. H. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. 566 p.

COUËTIL, L. L.; DENICOLA, D. B. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. **Equine Veterinary Journal**, p. 77-82, 1999. Supplement 30.

COUËTIL, L. L.; ROSENTHAL, F. S.; DENICOLA, D. B.; CHILCOAT, C. D. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 538-546, 2001.

CRISMAN, M. V.; HODGSON, D. R.; BAYLY, W. M.; LIGGITT, H. D. Effects of transportation on constituents of bronchoalveolar lavage fluid from horses. **Cornell Veterinarian**, v. 82, n. 3, p. 233-246, 1992.

DECONTO I. Doença pulmonar obstrutiva crônica. **A Hora Veterinária**, v. 4, n. 21, p. 23-32, 1984a.

DECONTO, I. Novos conhecimentos nos exames citológicos da secreção tráqueo-bronquial de cavalos com doenças pulmonares crônicas. In: JORNADAS BOEHRINGER DE PATOLOGIA EQUINA, 1-3., 1984, Porto Alegre; Rio de Janeiro. São Paulo. **Íntegra das palestras...**, p. 29-32 a.

DERKSEN, F. J.; BROWN, C. M.; SONEA, I.; DARIEN, B. J.; ROBINSON, N. E. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 1, p. 23-26, 1989.

DIXON, P. M. Ancillary diagnostic techniques for the investigation of equine pulmonary disease. **Equine Veterinary Education**, v. 9, n. 2, p. 72-80, 1997.

FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 604-609, 2000.

FERRO, E.; FERRUCCI, F.; SALIMEI, E.; ANTONIN, M.; CANIATTI, M. Relationship between the conditions of lower airways in healthy horses, environmental factors and air quality in stables. **Pferdeheilkunde**, v. 16, n. 6, p. 579-586, 2000.

FERRO, E.; FERRUCCI, F.; ZUCCA, E.; DI FABIO, V.; CASTOLDI, S. Arterial blood gas analysis in 53 racehorses with diagnosis of small airway inflammatory disease (SAID). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, n. 4, p. 165-168, 2002.

FOGARTY, U. Evaluation of a bronchoalveolar technique. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 3, p. 174-176, 1990.

FOGARTY, U.; BUCKLEY, T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 434-437, 1991.

FRANCHINI, M.; GILLI, U.; AKENS, M. K.; FELLEBERG, R. V.; BRACHER, V. The role chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, n. 1, p. 53-65, 1998.

FREEMAN, K. P.; ROSZEL, J. F. Equine cytology patterns in respiratory conditions of noninfectious or unknown origin. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 6, p. 755-763, 1997.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS JR., J. B.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990.

HARE, J. E.; VIEL, L. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 163-170, 1998.

HARE, J. E.; VIEL, L.; O'BYRNE, P. M.; CONLON, P. D. Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 17, n. 3, p. 237-244, 1994.

HEWSON, J.; VIEL, L. Sampling and cytology of the respiratory tract. In: LEKEUX, P. (Ed.) **Equine respiratory disease**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/viel/chapter_frm.asp?LA=1. Acesso em: 11 set. 2003.

HODGSON, J. L.; HODGSON, D. R. Inflammatory Airway Disease. In: LEKEUX, P. (Ed.) **Equine respiratory disease**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/hodgson/chapter_frm.asp?LA=1. Acesso em: 11 set. 2003.

HOFFMAN, A. M. Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease. **Equine Veterinary Education**, v. 11, n. 6, p. 330-336, 1999.

HOFFMAN, A. M. Small airway inflammatory disease in equids. In: ACVIM FORUM, 13., 1995, Florida. **Proceedings...** Florida: ACVIM, 1995. p. 754-757.

HOFFMAN, A. M.; VIEL, L. Techniques for sampling the respiratory tract of horses. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 13, n. 3, p. 463-475, 1997.

HOLCOMBE, S. J.; JACKSON, C.; GERBER, V.; JEFcoat, A.; BERNEY, C.; EBERHARDT, S.; ROBINSON, N. E. Stomping is associated with airway inflammation in young Arabian horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 3, p. 244-249, 2001.

HOUSTON, D. M.; RADOSTITS, O. M. O exame clínico. In: RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. (Ed.). **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 6, p. 81.

LAPOINTE, J. M.; VRINS, A.; LAVOIE, J.-P. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 227-229, 1994.

LAVOIE, J. P. Chronic obstructive pulmonary disease. In: ROBINSON, N. E. (Ed.). **Current therapy in equine medicine 4**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. p. 431-435.

LESSA, D. A. B.; VIANA, E. B.; ABRAMOVITC, G.; PAIVA, V. S.; FERNANDES, W. R. Aspectos citológicos do lavado bronco-alveolar de eqüinos da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. CD-ROM.

MAIR, T. S.; DERKSEN, F. J. Chronic obstructive pulmonary disease: a review. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 1, p. 35-44, 2000.

MCGORUM, B. C.; DIXON, P. M. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. **Equine Veterinary Education**, v. 6, n. 4, p. 203-209, 1994.

MCGORUM, B. C.; DIXON, P. M.; HALLIWELL, R. E. W.; IRVING, P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. **Research in Veterinary Science**, v. 55, n.1, p.57-59, 1993.

MCGORUM, B. C.; DIXON, P. M.; RADOSTITS, O. M.; ABBOTT, J. A. Exame clínico do trato respiratório. In: RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. (Ed.). **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.16, p. 231-269.

MCKANE, S. A.; CANFIELD, P. J.; ROSE, R. J. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, n. 11, p. 401-404, 1993.

MOORE, B. R.; KRAKOWKA, S.; ROBERTSON, J. T.; CUMMINS, J. M. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from Standardbred racehorses with inflammatory airway disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 5, p. 562-567, 1995.

MOORE, B. R. Lower respiratory tract disease. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 12, n. 3, p. 457-472, 1996.

MORI, E. **Avaliação da função dos macrófagos alveolares após infecção experimental em cavalos (*Equus caballus* - Linnaeus, 1758) por herpesvírus Eqüino Tipo 1 (HVE-1)**. 2000. 98 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MORI, E.; MORI, C. M. C.; FERNANDES, W. R. Avaliação da função de macrófagos alveolares em cavalos clinicamente saudáveis. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 72-178, 2001.

PINTO-DA-SILVA, L. H.; CAMURATE, M.; COSTA, K. A.; OLIVEIRA, S. M. P.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SARAIVA, E. M. B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complemente resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 1371-1377, 2002.

ROBINSON, N. E. International workshop on equine chronic airway disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 5-19, 2001.

ROBINSON, N. E. Recurrent airway obstruction (Heaves). In: LEKEUX, P. (Ed.). **Equine respiratory disease**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/robinson/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso em: 11 set. 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. 423 p.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 20, p. 329-335, 1947.

ROSSDALE, P. D.; HOPES, R.; WINGFIELD DIGBY, N. J. OFFORD, K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. **The Veterinary Record**, v. 116, n. 3, p. 66-69, 1985.

ROSZEL, J. F.; FREEMAN, K. P.; SLUSHER, S. H.; MORRIS, W. R.; HAURY, K. D.; CUDD, T. A. Siderophages in pulmonary cytology specimens from racing and non-racing horses. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 33., Lexington. 1988, **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1988. p. 321-329.

SANCHES, A. **Avaliação citológica do lavado traqueobrônquico de eqüinos clinicamente sadios e daqueles portadores de afecções do sistema respiratório**. 1998. 148 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SWEENEY, C. R.; BEECH, J. Bronchoalveolar lavage. In: BEECH, J. (Ed.). **Equine respiratory disorders**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. cap. 4, p. 55-61.

SWEENEY, C. R.; HUMBER, K. A.; ROBY, K. A. W. Cytologic findings of tracheobronchial aspirates from 66 Thoroughbred racehorses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 7, p. 1172-1175, 1992a.

SWEENEY, C. R.; ROSSIER, Y.; ZIEMER, E. L.; LINDBORG, S. Effect of lung site and volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 8, p. 1376-1379, 1992b.

TRAUB-DARGATZ, J. L.; McKINNON, A. O.; BRUYNINCKX W. J.; THRALL, M. A.; JONES, R. S.; BLANCQUAERT, A-M. B. Effect of transportation stress on bronchoalveolar lavage fluid analysis in female horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 7, p. 1026-1029, 1988.

TREMBLAY, G. M.; FERLAND, C.; LAPOINTE, J.-M.; VRINS, A.; LAVOIE, J.P.; CORMIER, Y. Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 3, p. 194-197, 1993.

TYLER, R. D.; COWELL, R. L.; CLINKENBEARD, K. D.; MACALLISTER, C. G. Hematologic values in horses and interpretation of hematologic data. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 3, n. 3, p. 461-484, 1987.

VIEL, L. Lower airway inflammation in young performance horses. In: ROBINSON, N. E. (Ed.). **Current therapy in equine medicine 4**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997a. p. 426-428.

VIEL, L. Small airway disease as a vanguard for chronic obstructive pulmonary disease. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 13, n. 3, p. 549-560, 1997b.

VIEL, L. Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM (Lung function and respiratory diseases in the horse), 1986, Hannover. **Proceedings...** Calw: Hippiatriska, 1986. p. 41-45.

VRINS, A.; DOUCET, M.; NUNEZ-OCHOA, L. A retrospective study of bronchoalveolar lavage cytology in horses with clinical findings of small airway disease. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 38, n. 6, p. 472-479, 1991.

WHITWELL, K. E.; GREET, R. C. Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 6, p. 499-508, 1984.

WOOD, J. L. N.; NEWTON, J. R.; CHANTER, N.; MUMFORD, J. A.; TOWNSEND, H. G. G.; LAKHANI, K. H.; GOWER, S. M.; BURREL, M. H.; PILSWORTH, R. C.; SHEPHERD, M.; HOPES, R.; DUGDALE, D.; HERINCKX, B. M. B.; MAIN, J. P. M.; WINDSOR, H. M.; WINDSOR, D. G. A longitudinal epidemiological study of respiratory disease in racehorses: disease definition, prevalence and incidence. In: WERNERY, U.; WADE, J. F.; MUMFORD, J. A. (Ed.). **Equine infectious diseases VIII**. Newmarket: R & W Publications, 1999. p. 64-70.

APÊNDICE A – Dados gerais de identificação dos eqüinos do grupo Controle alojados no ResC. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Nome</i>	<i>Raça</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Peso (kg)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Pelagem</i>
Mandrake	SRD	16	400	MC	Tordilha
Udine	SRD	11	440	F	Castanha
Ellen	SRD	24	450	F	Castanha
Nuven	SRD	17	410	F	Alazã
Nórdico	SRD	13	450	MC	Castanha
Neuza	SRD	12	400	F	Castanha
Nativa	SRD	12	430	F	Tordilha
Nexus	SRD	11	450	MC	Alazã

ResC: Regimento Escola de Cavalaria, SRD: sem raça definida; F: feminino; MC: masculino castrado

APÊNDICE B – Dados gerais de identificação dos eqüinos do grupo Doente alojados na PMERJ. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Nome</i>	<i>Raça</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Peso (kg)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Pelagem</i>
609	SRD	13	450	MC	Alazã
614	SRD	15	400	MC	Pampa
300	SRD	13	470	MC	Alazã
123	SRD	18	410	MC	Castanha
627	SRD	16	450	F	Baia
105	SRD	21	410	MC	Alazã
682	SRD	16	430	MC	Castanha
612	SRD	16	440	MC	Alazã
642	SRD	15	410	MC	Castanha

PMERJ: Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro; SRD: sem raça definida; F: feminino; MC: masculino castrado

APÊNDICE C – Funções vitais do grupo Controle (n=15). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>T (°C)</i>	<i>FC (BPM)</i>	<i>FR (MPM)</i>
Mandrake	38,1	36	8
	38	36	8
Udine	38	32	12
	38,3	40	12
Ellen	37,1	28	8
	38,5	40	12
Nuven	37,9	36	8
	38	32	20
Nórdico	37,7	32	12
	37,9	36	12
Neuza	37,8	34	12
Nativa	38	36	16
	38	36	16
Nexus	38	40	12
	38,2	32	10

T: temperatura; FC: Frequência Cardíaca; BPM: Batimentos por Minuto; FR: Frequência Respiratória; MPM: Movimentos por Minuto;

APÊNDICE D – Funções vitais do grupo Doente (n=17). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>T (°C)</i>	<i>FC (BPM)</i>	<i>FR (MPM)</i>
609	37,2	28	10
	37,5	30	16
614	37,8	36	16
	37,5	28	14
300	37,2	28	12
	37,5	30	10
123	37,6	32	16
	37,3	28	20
627	38	28	16
	37,9	28	20
105	37,7	32	8
	37,5	32	10
682	37,5	28	8
612	37,8	36	12
	37,5	33	16
642	38	40	14
	37,8	28	8

T: temperatura; FC: Frequência Cardíaca; BPM: Batimentos por Minuto; FR: Frequência Respiratória; MPM: Movimentos por Minuto;

APÊNDICE E – Resultados do eritrograma e da determinação do fibrinogênio plasmático dos eqüinos do grupo Controle. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Animal	VG (%)	Hematimetria $\times 10^6/\text{mm}^3$	VGM (fl)	CHGM (%)	Hemoglobina (g%)	Fibrinogênio (mg/dL)
Mandrake	41	9,30	44	33	13,6	200
	34	7,40	46	33	11,3	200
Udine	38	8,40	45	34	12,6	200
	26	5,40	48	33	8,6	200
Ellen	33	7,80	42	34	11	200
	37	8,20	45	35	12,3	200
Nuven	33	6,60	50	33	11	400
	31	6,70	46	33	10,3	200
Nórdico	26	4,70	55	33	8,6	200
	29	5,80	50	33	9,6	200
Neuza	31	6,30	50	33	10,3	200
Nativa	35	7,00	49	33	11,6	200
	35	7,60	46	34	11,6	200
Nexus	35	7,10	50	34	11,5	200
	30	6,10	49	33	10	200
Média	32,93	6,96	47,67	33,40	10,93	213,33
DP	4,22	1,21	3,24	0,63	1,40	51,64

VG: Volume Globular; VGM: Volume Globular Médio; CHGM: Concentração de Hemoglobina Globular Média; DP: Desvio padrão

APÊNDICE F – Resultados do eritrograma e da determinação do fibrinogênio plasmático dos eqüinos do grupo Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Animal	VG (%)	Hematimetria x10⁶/mm³	VGM (fl)	CHGM (%)	Hemoglobina (g%)	Fibrinogênio (mg/dL)
609	35	7,30	33	49	11,6	200
	31	6,60	34	47	10,3	200
614	30	6,00	33	50	10	200
	30	6,20	33	48	10	200
300	36	7,50	33	49	12	200
	31	6,30	33	49	10,3	300
123	39	7,80	33	50	13	200
	35	7,00	34	50	11,6	200
627	44	8,90	34	49	14,6	200
	36	7,30	33	49	12	250
105	41	8,70	33	47	13,6	200
	44	9,50	34	46	14,6	200
682	35	7,30	33	48	11,6	400
612	42	8,00	33	52	14	200
	49	9,60	33	51	16,3	200
642	34	6,80	33	50	11,3	200
	36	7,40	34	49	12	200
Média	36,94	7,54	33,29	49	12,28	220,59
DP	5,48	1,09	0,47	1,50	1,82	53,21

VG: Volume Globular; VGM: Volume Globular Médio; CHGM: Concentração de Hemoglobina Globular Média; DP: Desvio padrão

APÊNDICE G – Resultados do leucograma dos eqüinos do grupo Controle. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Animal	Leucometria Total/mm ³	Basófilo		Eosinófilo		Bastonete		Neutrófilo		Linfócito		Monócito	
		%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³
Mandrake	8.100	0	0	7	567	2	162	59	4.779	25	2.025	7	567
	6.200	0	0	5	310	0	0	61	3.782	25	1.550	7	434
Udine	8.900	0	0	1	89	0	0	65	5.785	29	2.581	4	356
	5.300	0	0	4	212	0	0	60	3.180	32	1.696	4	212
Ellen	3.000	0	0	3	90	1	30	32	9.60	62	1.860	3	90
	9.000	0	0	2	180	1	90	84	7.560	12	1.080	1	90
Nuven	8.400	0	0	1	84	0	0	64	5.376	28	2.352	3	252
	8.300	0	0	1	83	1	83	62	5.146	35	2.170	1	83
Nórdico	9.800	0	0	1	98	0	0	62	6.076	20	1.960	6	588
	7.800	0	0	10	780	0	0	60	4.680	25	1.950	5	390
Neuza	7.000	0	0	3	210	0	0	55	3.850	37	2.590	4	280
Nativa	7.000	0	0	5	350	0	0	58	4.060	37	2.590	1	70
	10.000	0	0	4	400	2	200	68	6.800	24	2.400	1	100
Nexus	7.500	0	0	1	75	0	0	48	3.600	46	3.450	5	375
	8.500	0	0	5	425	1	85	48	4.080	45	3.825	1	85
Média	7.653,33	0	0	3,53	263,53	0,53	43,33	59,07	4.647,60	32,13	2.271,93	3,53	264,80
DP	1.804,307	0	0	2,61	209,42	0,74	66,11	11,27	1.606,88	12,26	698,78	2,20	180,34

APÊNDICE H – Resultados do leucograma dos eqüinos do grupo Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Animal	Leucometria	Basófilo		Eosinófilo		Bastonete		Neutrófilo		Linfócito		Monócito	
		%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³	%	Absoluto /mm ³
609	8.300	0	0	0	0	1	83	56	4.648	40	3.320	3	249
	6.800	0	0	3	204	1	68	56	3.808	31	2.108	9	612
614	6.600	0	0	8	528	0	0	54	3.564	34	2.244	3	198
	5.800	0	0	4	232	0	0	56	3.248	36	2.088	5	290
300	9.700	0	0	3	291	1	97	68	6.596	27	2.619	2	194
	8.000	1	80	0	0	0	0	62	4.960	35	2.800	2	160
123	7.200	0	0	1	72	0	0	64	4.608	28	2.016	6	432
	7.700	0	0	2	154	0	0	66	5.082	28	2.156	4	308
627	5.600	0	0	1	56	0	0	67	3.953	29	1.624	4	224
	5.700	0	0	4	228	0	0	66	3.762	25	1.425	5	285
105	8.700	1	87	7	609	0	0	66	5.742	20	1.740	7	609
	8.500	0	0	0	0	1	85	64	5.440	28	2.380	8	680
682	6.700	1	67	3	201	1	67	65	4.355	25	1.675	7	469
612	10.000	1	100	4	400	0	0	62	6.200	33	3.300	2	200
	6.800	0	0	3	204	0	0	60	4.080	30	2.040	7	476
642	8.000	2	160	10	800	0	0	49	3.920	38	3.040	1	080
	9.000	1	90	7	630	0	0	54	4.860	38	3.420	0	0
Média	7.549,10	0,41	34,35	3,53	217,12	0,29	23,53	60,88	4.636,82	30,88	2.352,65	4,41	321,53
DP	1.347,90	0,62	51,29	2,96	242,79	0,47	38,10	5,67	948,84	5,44	629,20	2,62	194,41

APÊNDICE I – Achados clínicos relativos ao aparelho respiratório do grupo Controle (n=15 exames). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>Secreção seca nas narinas</i>	<i>Rinorréia bilateral</i>	<i>Ruídos pulmonares</i>	<i>Observações</i>
Mandrake	ausente	ausente	normais	
	ausente	ausente	normais	
Udine	ausente	ausente	normais	
	ausente	ausente	normais	
Ellen	discreta	ausente	normais	
	ausente	ausente	normais	
Nuven	discreta	ausente	normais	
	ausente	serosa e discreta	normais	taquipnéica, sensibilidade faríngea
Nórdico	ausente	ausente	normais	
	ausente	ausente	normais	
Neuza	ausente	serosa	normais	após reinalação com máscara
Nativa	discreta	ausente	normais	
	ausente	mucosa, discreta D, serosa discreta E	normais	
Nexus	discreta	Ausente	normais	
	ausente	mucosa e discreta	normais	

APÊNDICE J – Achados clínicos relativos ao aparelho respiratório do grupo Doente (n=17 exames). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>Secreção seca nas narinas</i>	<i>Rinorréia</i>	<i>Ruídos pulmonares</i>
609	ausente	serosa e discreta	normais
	ausente	serosa e discreta	normais
614	discreta	ausente	normais
	ausente	ausente	normais
300	discreta	ausente	BV aumentado PD
	ausente	seromucosa	BV aumentado PD
123	ausente	mucosa, discreta e transparente	BV aumentado PD/E
	ausente	mucosa, discreta e transparente	BV aumentado PD/E
627	discreta	Ausente	normais
	discreta	ausente	normais
105	ausente	mucosa, e discreta	normais
	ausente	mucosa, e discreta	normais
682	ausente	discreta	BV aumentado PD/E
612	ausente	discreta	BV aumentado PE
	discreta	ausente	BV aumentado PE
642	ausente	mucosa	normais
	discreta	ausente	BV aumentado PD

BV: Bronco-vesicular; PD: Pulmão direito; PE: Pulmão esquerdo

APÊNDICE L – Resultados da endoscopia do grupo Doente (n=9). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>Observações</i>
609	secreção mucosa na traquéia
614	discreta hiperemia traqueal, secreção mucosa na traquéia e endoscopia traqueal provocou tosse
300	secreção mucosa na traquéia
123	HPIE e discreta secreção mucosa na traquéia
627	moderada secreção mucosa na traquéia
105	discreta secreção mucosa na traquéia
682	secreção mucosa na traquéia
612	hiperemia laríngea, secreção mucosa c/ grumos na traquéia e tosse freqüente na endoscopia traqueal
642	secreção mucosa na traquéia

HPIE: Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Exercício

APÊNDICE M – Valores de diferença de pressão intrapleural (ΔP_{pl} máxima). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Grupo Controle</i>		<i>Grupo Doente</i>	
<i>Animal</i>	<i>Resultado (cm de H₂O)</i>	<i>Animal</i>	<i>Resultado (cm de H₂O)</i>
Mandrake	3	609	2,5
Udine	2	614	4
Ellen	3	300	2
Nuven	3,5	123	3
Nórdico	2,3	627	2,5
Neuza	3	105	2,5
Nativa	2	682	3,5
Nexus	2,6	612	2
		642	3

APÊNDICE N – Volume de lavado broncoalveolar recuperado e viabilidade celular (média $\pm$ 1 DP), dos eqüinos dos grupos Controle e Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupos	Volume (mL)	Viabilidade (%)
Controle (n=15)	145,47 $\pm$ 20,69 ^a	94,04 $\pm$ 3,31 ^a
Doente (n=17)	137,4 $\pm$ 31,95 ^a	91,72 $\pm$ 5,39 ^a

mL: mililitro; Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA; P<0,05)

APÊNDICE O – Contagem total de leucócitos, viabilidade, volume total recuperado e escore no grupo Controle (n=15). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>Leucócitos totais ($\times 10^5/\text{ml}$)</i>	<i>Viabilidade (%)</i>	<i>Escore</i>
Mandrake	147	3,8	92,6	4
	166	3,2	89,7	2
Udine	149	2,1	92,1	3
	160	3,3	95	3
Ellen	122	1,3	95,6	3
	162	1,2	95,5	3
Nuven	156	1,8	90,9	3
	101	3,9	94,3	3
Nórdico	178	1,7	90,3	2
	135	1,4	100	3
Neuza	122	3,2	89,5	4
Nativa	155	2	93,3	2
	155	1,7	100	2
Nexus	123	2,8	96,1	3
	151	1,3	95,7	3

APÊNDICE P – Contagem total de leucócitos, viabilidade, volume total recuperado e escore no grupo Doente (n=17). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>Leucócitos totais ($\times 10^5/\text{ml}$)</i>	<i>Viabilidade (%)</i>	<i>Escore</i>
609	190	1,9	100	4
	150	3,8	80,9	4
614	182	2,2	94,9	4
	147	3,6	93,8	4
300	170	3,4	88,5	3
	142	3,7	89,6	4
123	142	7,3	90,1	8
	131	7	88,1	6
627	155	1,1	100	2
	139	1,7	87,1	4
105	116	3,2	87,9	4
	71	5,6	90,2	4
682	126	2,1	91,9	3
612	104	2,6	100	4
	96	1,6	92,8	3

APÊNDICE Q – Valores percentuais para a contagem diferencial da citologia broncoalveolar do grupo Controle (n=15). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Nome</i>	<i>Neutrófilo</i>	<i>Linfócito</i>	<i>Macrófago</i>			<i>Célula Gigante</i>	<i>Eosinófilo</i>	<i>Mastócito</i>	<i>Célula epitelial</i>
			<i>Total</i>	<i>Hemos-siderófago</i>	<i>Espumoso</i>				
Mandrake	4,8	34,1	59	16,8	11,9	0,8	0,6	0,5	0
	4,3	46,3	48,7	0	2,7	0	0	0,7	0,3
Udine	0,4	46,7	50,7	1,3	27	0	0	2,4	0,7
	3	53	44	0	0	0	0	0	0
Ellen	2,5	35	56,8	0,6	3,5	0	0,3	4,2	0
	2	53,3	40,7	0	9,8	0	0,4	2	0,7
Nuven	3,3	50,3	45	0,7	3,7	0,7	0	1,3	0
	1,7	49,3	48,3	0,7	0	0	0	0,7	0
Nórdico	2	34	61	0	1	0	0,4	2,6	0
	2,3	28	61	1	7,1	0	0,6	8	0
Neuza	0,8	34,8	63	1,5	2,5	0,5	0	1,3	1,5
Nativa	2,3	28	63	0,5	2,1	0	0	6,6	0
	2,7	36	59	0	0	1,1	0	2	0
Nexus	1	55,7	42,7	2,3	12,5	0	0	0,7	0,3
	2,1	35,5	53,8	0	6,2	0	4	3,5	0

APÊNDICE R – Valores percentuais para a contagem diferencial da citologia broncoalveolar do grupo Doente (n=17). Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

<i>Animal</i>	<i>Neutrófilo</i>	<i>Linfócito</i>	<i>Macrófago</i>			<i>Célula Gigante</i>	<i>Eosinófilo</i>	<i>Mastócito</i>	<i>Célula epitelial</i>
			<i>Total</i>	<i>Hemos-siderófago</i>	<i>Espumoso</i>				
609	8,6	34,8	44,6	0,7	40	0	0	1,2	10,7
	23,3	43,5	30,9	3,2	33,3	0,3	0,3	1,7	0
614	9	37,7	39,8	0	15,5	1,2	2,5	3,7	6,2
	15,2	34,5	40,3	0	37,6	0	1,3	5,2	3,2
300	7,3	39,8	50,6	0	6,7	0	0	1,5	0,8
	8,6	49,8	40,9	1,2	6,5	0,2	0	0,2	0
123	13,9	53	31,4	4,8	9,5	0,4	0,4	1,2	0
	13,3	47,5	36,5	0,5	7,8	0,2	0,2	2,5	0
627	7,5	43,5	41,9	0	25,6	0,3	0,3	3,9	2,6
	7,1	31,4	48,5	0	46,7	0,6	0	9,7	2,6
105	8,8	25,8	48,9	0	29,3	0,3	0,9	3,5	11,7
	37,3	18,6	37,6	0	32,5	1,3	0	2,9	2,3
682	7,7	34,6	49,4	6,8	18,5	2,2	0,6	3,4	1,7
612	22,5	38,2	27,6	0	44	0,3	5,9	3,9	1,6
	22,5	31	34	0	40,5	0	5,4	4,5	2,6
642	24,7	13	52,2	0	14,7	0,3	2,3	4,9	2,6
	19	33,7	44,2	0	17,3	0,5	0,2	0,3	2,1

APÊNDICE S – Valores para Índices Fagocíticos (IFag) de Zymosan e de *Leishmania braziliensis* no grupo Controle. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Animal	IFag – Zymosan (1h) n=15	IFag – <i>L. braziliensis</i> (1h) n=15	IFag – <i>L. braziliensis</i> (48h) n=14
Mandrake	59,10	42,15	11,80
	188,50	45,60	8,80
Udine	177,20	37,95	20,66
	172,85	61,60	51,85
Elen	81,30	66,95	6,35
	101,00	35,95	contaminou
Nuven	191,45	162,85	76,15
	213,30	89,50	19,00
Nórdico	110,45	276,00	156,10
	142,45	83,35	38,40
Neuza	124,80	77,15	45,45
Nexus	40,00	48,40	37,00
	82,90	69,30	22,80
Nativa	193,45	68,80	40,60
	348,06	85,20	11,00

APÊNDICE T – Valores para Índices Fagocíticos (IFag) de Zymosan e de *Leishmania braziliensis* no grupo Doente. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Animal	IFag – Zymosan (1h) n=17	IFag – <i>L. braziliensis</i> (1h) n=17	IFag - <i>L. braziliensis</i> (48h) n=17
609	368,80	99,80	14,70
	220,40	100,30	7,30
614	183,90	73,70	21,40
	137,90	53,30	6,40
300	179,10	65,40	3,60
	236,00	72,20	4,40
123	108,40	55,90	20,10
	59,70	48,10	4,30
627	117,50	69,10	2,60
	196,40	100,90	6,30
105	142,00	9,00	3,40
	221,00	25,70	1,80
682	181,00	32,10	6,40
612	202,40	42,20	12,40
	136,60	47,70	19,00
642	239,70	90,00	32,20
	275,10	45,00	9,60

APÊNDICE U – Valores para o percentual de macrófagos que fagocitaram Zymosan após 1 hora de interação. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupo Controle (n=15)		Grupo Doente (n=17)	
Animal	Macrófagos (%)	Animal	Macrófagos (%)
Mandrake	24,7	609	78,6
	57,4		69
Udine	51,4	614	57,5
	60,7		54,9
Elen	37,4	300	52,3
	38,8		64,6
Nuven	63,9	123	41,4
	55		22,7
Nórdico	48,3	627	44,4
	54,8		54,3
Neuza	51	105	45,8
	16,3		62,2
Nexus	29,6	682	61,6
Nativa	66	612	52,7
	75,5		43,4
		642	73,8
			76

APÊNDICE V – Valores para Índices de Sobrevivência (IS) de *Leishmania braziliensis* após 48h de infecção. Rio de Janeiro, mar 2001-dez 2002

Grupo Controle (n=14)		Grupo Doente (n=17)	
Animal	IS	Animal	IS
Mandrake	28,00	609	14,73
	19,30		7,30
Udine	54,44	614	29,00
	84,17		12,00
Elen	9,48	300	5,50
Nuven	46,76		6,10
	21,23	123	35,90
Nórdico	56,56		8,90
	46,07	627	3,80
Neuza	58,91		6,20
Nexus	76,45	105	37,80
	32,90		7,00
Nativa	59,01	682	19,90
	12,91	612	29,40
			39,80
		642	35,80
			21,30