AYRTON RODRIGO HILGERT

**INFLUÊNCIA DO ESFORÇO FÍSICO SOBRE O GRAU DE
INFLAMAÇÃO NO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS
ATLETAS**

São Paulo

2021

AYRTON RODRIGO HILGERT

**INFLUÊNCIA DO ESFORÇO FÍSICO SOBRE O GRAU DE INFLAMAÇÃO NO
SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS ATLETAS**

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
Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes

**São Paulo
2021**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4046
FMVZ

Hilgert, Ayrton Rodrigo
Influência do esforço físico sobre o grau de inflamação no sistema respiratório de equinos atletas / Ayrton Rodrigo Hilgert. – 2021.
71 f. ; il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.

1. Cavalo. 2. Exercício. 3. Vias aéreas. 4. Endoscopia. 5. Lavado traqueal. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DO ESFORÇO FÍSICO SOBRE O GRAU DE INFLAMAÇÃO NO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS ATLETAS", protocolada sob o CEUA nº 5270200820 (ID 008410), sob a responsabilidade de **Wilson Roberto Fernandes e equipe; Ayrton Rodrigo Hilgert** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 25/09/2020.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF PHYSICAL EFFORT ON THE INFLAMMATION OF ATHLETIC HORSE RESPIRATORY SYSTEM", utilizing 16 Equines (males and females), protocol number CEUA 5270200820 (ID 008410), under the responsibility of **Wilson Roberto Fernandes and team; Ayrton Rodrigo Hilgert** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/25/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 10/2020 a 10/2020

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 12 anos**

N: **16**

Linhagem: **Quarto-de-milha e Mangalarga**

Peso: **300 a 500 kg**

Local do experimento: Propriedades no interior do estado de São Paulo.

Comentário CEUA: *O estudo reúne condições de ser aprovado por esta CEUA*

São Paulo, 05 de outubro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: HILGERT, Ayrton Rodrigo

Título: **Influência do esforço físico sobre o grau de inflamação no sistema respiratório de equinos atletas**

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 Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Talissa, minha amada esposa, alicerce de amor
e apoio fundamental para que pudéssemos
chegar até aqui.

Ao Bento, nosso maior presente e inspiração na busca por
um mundo melhor.

Aos meus pais, Eliane e Airton, pelo amor de sempre e incondicional
apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão, Matheus, que mesmo em seu silêncio transmite os mais lindos
e importantes ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Não há forma de agradecer tudo o que cada um contribuiu para estarmos aqui. Eu escrevendo, e você, lendo. Cada pessoa que passou pela minha vida, cada momento vivido. Todo esse caminho lindamente percorrido que me conduziu, para agora, estarmos aqui. Eu não sei quando você lê, mas escrevo em meio a uma Pandemia. Janeiro de 2021. Nesse momento o que eu mais queria era poder abraçar cada pessoa querida em minha vida. Citada aqui ou não. Mas saiba que enquanto refletia e escrevia esse texto, senti o carinho do abraço de cada um. Espero sinceramente que você sinta o mesmo. Espero ainda poder te agradecer pessoalmente e abraçar verdadeiramente.

Começo abraçando e agradecendo a minha amada esposa, Talissa. Além de toda a alegria e beleza dos nossos dias juntos, se não fosse por seu apoio, eu não estaria aqui. Agradeço imensamente por cada palavra de incentivo, cada afago nos dias mais pesados, e toda a sua energia entregue para que esse trabalho fosse concluído. Além de tudo, essa Tese foi construída também com muito amor e lhe serei eternamente grato por isso.

Agradeço também ao Bento, meu filho, que mesmo com seus bracinhos pequenos tem um abraço gigante capaz de acolher todas as minhas angústias e devolver alegria e leveza. Obrigado por todos os risos que vêm da alma, todo o amor e inspiração que me motivam na busca por um mundo melhor.

Aos meus pais, por seu amor e incondicional incentivo em todas as fases da minha trajetória acadêmica e profissional. Sempre me proporcionando o que fosse preciso para que eu pudesse percorrer o caminho escolhido. Concluo mais uma etapa desse trajeto graças a vocês. Obrigado por tudo!

Ao meu querido irmão, Lauro Matheus Hilgert, não consigo te agradecer por isso. Não acho justo. Temos um detalhezinho diferente em nossa genética que provocou possibilidades de vida bem distintas. O caçula, dentro das suas possibilidades, me ensinou a cada segundo a importância de que seja um segundo bem vivido. Então saiba, meu irmão, que cada momento aproveitado e

todas as conquistas que me foram permitidas, foram graças a seus ensinamentos. Te carrego sempre comigo. Te amo!

Ao meu estimado orientador, Professor Dr. Wilson Roberto Fernandes, pela oportunidade, pelo apoio e todo o aprendizado ao longo da nossa jornada juntos. Me sinto honrado por essa parceria. Agradeço também por ter proporcionado ao esse mundo a existência de uma figura ímpar, meu amigo Guilherme Fernandes, com o qual fui presenteado por sua amizade e divertidos momentos juntos.

A todos os amigos e colegas de pós-graduação que ao meu lado deram suporte a essa caminhada e a tornaram mais prazerosa. Não irei citar todos os nomes, mas sintam-se aqui representados pelo queridíssimo Paulo Bogossian, com quem dividi lado a lado essa jornada e assim tive o privilégio de conviver com sua sabedoria e alegria.

À Universidade de São Paulo e seus professores, em especial à Profª Drª Carla Bargi Belli, Profª Drª Alice M. Della Libera, Profª Drª Raquel Yvonne A. Baccarin, Prof. Dr. Stefano C. Filippo Haggen, Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, Profª Drª Aline M. Ambrósio, Prof. Dr. André Zoppa e Prof. Dr. Antônio C. de Assís Neto, e tantos outros, seja na FMVZ ou em outras Faculdades, com quem tive a oportunidade de conviver e aprender ao longo desses anos. Ao grande mestre Dr. Júlio David Spagnollo, com quem muito aprendi.

Ao Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Júnior, com quem sempre pude aprender nas ricas oportunidades de encontros e conversas, cuja contribuição foi inestimável para elaboração desse trabalho.

Aos funcionários do HOVET-USP Marcos Roberto Rodrigues Alves, Rosendo José Pires Neto, Cicero Antonio da Silva, Gervasio Garcia da Silva, Felipe dos Santos Belau por todos esses anos de amizade, apoio e diversão.

À Faculdade FGP pelo incentivo à pesquisa através do empréstimo de equipamentos. Aos alunos da FGP e da Universidade Anhanguera que foram essenciais na execução do experimento, muito obrigado pelo companheirismo.

Aos animais, em especial os cavalos, foco central desse estudo e fonte de inspiração e motivação no amor pela profissão.

A você, muito obrigado!

“O ar se comporta no ar,
assim com a água
se comporta na água.”
“Saper vedere.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

HILGERT, A. R. **Influência do esforço físico sobre o grau de inflamação no sistema respiratório de equinos atletas**. 2021. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O sistema respiratório apresenta a segunda maior prevalência de lesões responsáveis por queda de rendimento em equinos atletas e é considerado o fator limitante de performance dos animais hígidos nas provas de alto rendimento. Essas informações apontam para a alta exigência e estresse sobre as vias aéreas de cavalos que participam de competições. Hipotetizou-se que o esforço físico realizado em modalidades esportivas provoca resposta inflamatória nas vias aéreas de equinos atletas. Portanto, esse trabalho tem como objetivo avaliar marcadores da inflamação nas vias aéreas de equinos atletas saudáveis frente ao esforço físico realizado nas modalidades esportivas de Três Tambores e Marcha. Foram utilizados dezesseis equinos saudáveis e sem histórico de afecções respiratórias, das raças Mangalarga Marchador e Quarto-de-milha, distribuídos uniformemente entre as modalidades de Marcha (MA) e Três Tambores (TT), respectivamente. Todos os animais foram submetidos a uma simulação de prova da modalidade em que participam, sendo realizada uma avaliação do sistema respiratório prévia (M0) e outra 24 horas após (M1) a realização do exercício. Em ambos os momentos foram realizados exame físico, endoscopia das vias aéreas e lavado traqueal, a partir do qual foi realizada a citologia e quantificação das interleucinas IL-4, IL-10, IL-17, IFN- α e IFN- γ . Não foi observada variação nos parâmetros do exame físico nos dois momentos. Já na avaliação endoscópica, foi constatado um aumento significativo no escore de acúmulo de muco na traqueia após o exercício em ambos os grupos ($p < 0.001$). Em dois animais do grupo TT foi observada a presença de sangue na traqueia no momento M1 ($p < 0,07$). Na citologia do lavado traqueal observou-se um aumento significativo no número de neutrófilos em ambos os grupos após o exercício ($p < 0,001$), mas que ocorreu de maneira mais acentuada nos animais de marcha ($p = 0,01$). Também observou-se aumento significativo no número de hemossiderófagos no momento M1 ($p < 0,01$), que nesse caso, foi mais intenso no grupo de Três Tambores ($p = 0,008$). Dentre

as Interleucinas avaliadas, o principal resultado observado foi o aumento na concentração de IL-17 em ambos os grupos, mas com significância estatística apenas no grupo de Marcha ($p=0,02$). Esses resultados apontam em concordância com a hipótese, permitindo a conclusão de que o exercício gera resposta inflamatória nas vias aéreas de equinos.

Palavras-chave: Cavalo. Exercício. Vias aéreas. Endoscopia. Lavado traqueal.

ABSTRACT

HILGERT, A. R. **Influence of physical effort on the inflammation of athletic horse respiratory system.** 2021. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The respiratory system has the second highest prevalence of injuries responsible for decreased performance in equine athletes and it is considered a limiting factor for the performance of healthy animals in high performance tests. This information points to the high airways demand and stress of athletic horses. It was hypothesized that the physical effort performed in competition causes an inflammatory response in equine athletes airways. Therefore, the aim of this study was to evaluate markers of respiratory inflammation of healthy equine athletes under physical effort performed in Barrel Racing and *Marcha* modalities. Sixteen healthy horses of the Mangalarga Marchador and Quarter-horses breeds with no history of respiratory disorders were used and evenly distributed between the *Marcha* (MA) and Barrel Racing (TT) modalities, respectively. All animals were submitted to a simulation of the modality they participate, with a previous respiratory system examination (M0) and another 24 hours after (M1) the exercise performance. At both sampling times, physical examination, airways endoscopy and tracheal wash were performed, cytology and interleukins IL-4, IL-10, IL-17, IFN- α and IFN- γ quantification were done. There was no parameters variation of the physical examination at both sampling times. In the endoscopic evaluation, there was a significant increase in the tracheal mucus accumulation score after exercise in both groups ($p < 0.001$). In two horses of TT group, blood was observed in the trachea at M1 ($p < 0.07$). In cytology tracheal wash there was a significant increase in the number of neutrophils in both groups after exercise ($p < 0.001$), but *Marcha* horses had the highest result ($p = 0.01$). There was also a significant increase in the number of hemosiderophages at M1 ($p < 0.01$), which in this case it was more intense in the Barrels Racing group ($p = 0.008$). The main result among the interleukins evaluated, the expressive increase observed was of the IL-17 concentration in both groups, but only the *Marcha* group had statistical significance

($p = 0.02$). These results agrees with the present hypothesis, which leads to the conclusion that exercise generates an inflammatory response in horse airways.

Keywords: Horse. Exercise. Airways. Endoscopy. Tracheal wash.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da graduação proposta por GERBER <i>et al.</i> (2004) para avaliação endoscópica dos animais.....	38
Figura 2. Comportamento do escore de acúmulo de muco nos momentos de cada grupo.....	44
Figura 3. Prevalência do escore médio de acúmulo de muco nas vias aéreas dos animais dos dois grupos em ambos os momentos.....	45
Figura 4. Ausência (0) ou presença de sangue (1) observada via endoscopia nas vias aéreas dos animais da modalidade de Três Tambores (TT) nos momentos M0 e M1.....	46
Figura 5. Ilustração da variação do número médio de neutrófilos sofrida pelos animais dos dois grupos entre o momento M0 e M1.....	47
Figura 6. Ilustração da variação do número médio de hemossiderófagos observado nos animais dos dois grupos entre o momento M0 e M1.....	48
Figura 7. Concentração de IL-4 nos dois momentos de cada grupo.....	50
Figura 8. Variação da concentração de Interferon Gama (IFN-Gama) nos dois momentos de cada grupo.	51
Figura 9. Variação da concentração de IL-17 nos dois momentos de cada grupo.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalo de detecção das Interleucinas pelo teste “Horse Cytokine 5-plex assay”	39
--	----

Tabela 2: Valores médios de frequência respiratória (FR) e número de animais em que foi observada a presença de secreção nasal (SN)	42
---	----

Tabela 3. Descrição dos resultados obtidos na endoscopia, apresentados individualmente para cada avaliador e divididos entre os momentos Pré e Pós de cada grupo	43
--	----

Tabela 4. Valor médio da contagem celular relativa (%) observada na citologia do lavado traqueal dos animais dos dois grupos em ambos os momentos	47
---	----

Tabela 5. Descrição das médias de obtidos pela quantificação em cada momento das Interleucinas nas amostras de Lavado Traqueal nos dois grupos	49
--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO APLICADA AO SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	20
2.2	RESPOSTA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE EQUINOS AO EXERCÍCIO.....	22
2.3	INFLAMAÇÃO DAS VIAS AEREAS DECORRENTE DO EXERCÍCIO.....	24
2.4	DOENÇAS DE VIAS AÉREAS RELACIONADAS AO EXERCÍCIO.....	26
2.4.1.	Doença Inflamatória das Vias Aéreas.....	27
2.4.2.	Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Exercício.....	28
2.5	AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NAS VIAS AÉREAS DE EQUINOS.....	30
3	HIPÓTESE.....	32
4	OBJETIVOS.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1	ANIMAIS.....	34
5.2	MOMENTOS DE AVALIAÇÃO.....	35
5.3	AVALIAÇÃO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DOS ANIMAIS.....	36
5.3.1	Exame físico.....	36
5.3.2	Endoscopia das vias aéreas.....	37
5.3.3	Lavado traqueal.....	38
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
6	RESULTADOS.....	41
6.1	EXAME FÍSICO.....	41

6.2	ENDOSCOPIA.....	42
6.3	CITOLOGIA DO LAVADO TRAQUEAL.....	46
6.4	QUATIFICAÇÃO DE INTERLEUCINAS.....	49
7	DISCUSSÃO.....	53
8	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICES.....	70

1 INTRODUÇÃO

A histórica relação entre homem e cavalo está diretamente ligada ao desenvolvimento da própria humanidade e suas civilizações. Desde a domesticação, os equinos vêm sendo utilizados como companheiros do ser humano para executar tarefas que vão desde meio de transporte e trabalho no campo, até a essencial ferramenta de guerras que impactaram diretamente na consolidação de divisas geográficas e culturais, culminando com a formação das nações como as conhecemos no mundo contemporâneo.

Atualmente, com o advento da mecanização e tecnologia, as funções dos equinos relacionadas ao trabalho continuam presentes e indispensáveis em diversas situações, mas diminuíram significativamente em termos de abrangência e importância. Entretanto, devido a sua íntima relação com o desenvolvimento de diferentes culturas e civilizações, muitas atividades que anteriormente eram realizadas como trabalho, foram tradicionalmente mantidas, porém, gradativamente convertidas em atividades de esporte e lazer, perdurando dessa forma a ligação do homem com o cavalo, consolidada na forma de diferentes comunidades com suas tradições e costumes. Assim surgiram inúmeros esportes equestres que hoje ocupam um espaço de inestimável importância no cenário cultural e econômico da sociedade moderna.

A realização destes esportes e a busca constante pela excelência na performance, gera uma exigência ao organismo dos animais que muitas vezes pode atingir ou até ultrapassar o limite de suas capacidades orgânicas, rompendo barreiras fisiológicas que são oriundas de um processo de evolução e seleção natural de milhões de anos.

O sistema respiratório é um dos componentes orgânicos do equino mais impactados por essa exigência de performance na prática esportiva, pois como é descrito por DERKSEN & ROBINSON (2002), a execução de exercícios depende primariamente do funcionamento da tríade composta pelos sistemas locomotor, circulatório e respiratório. Os dois primeiros, no entanto, são passíveis de uma resposta adaptativa ao esforço, já que apresentam a capacidade de sofrer transformações em resposta ao programa de treinamento, enquanto que, de

acordo com os pesquisadores ART; BAYLY; LEKEUX, (2002) e FRANKLIN; VAN ERCK-WESTERGREN; BAYLY, (2012) o sistema respiratório não possui essa capacidade de adaptação, tornando-o possivelmente mais suscetível à sobrecargas e suas consequências patológicas na prática de esportes de alta performance.

Em vista disso, esse trabalho busca avaliar a resposta inflamatória que o sistema respiratório de equinos atletas porventura apresente em decorrência da prática de modalidades esportivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO APLICADA AO SISTEMA RESPIRATÓRIO

A fisiologia do exercício é definida como o conhecimento científico das alterações e adaptações dos sistemas a um estímulo de estresse (EVANS, 2007). Há na literatura diversos estudos na medicina humana e veterinária, com o objetivo de estudar os parâmetros envolvidos, bem como a evolução e adaptação destes parâmetros com o treinamento (CHAMARI; PADULO, 2015; HIRAGA; SUGANO, 2017). O sucesso atlético dos equinos depende de um complexo equilíbrio e interação de mecanismos fisiológicos concernentes aos sistemas músculo-esquelético, nervoso, respiratório e cardiovascular (KUSANO et al., 2008). Em termos gerais, com a imposição do aumento da carga nesses sistemas e o intenso aumento nos níveis metabólicos em decorrência do exercício, a capacidade e a integridade destes sistemas representam um índice importante na determinação do potencial de performance de cavalos. (EVANS, 2007), sendo o sistema respiratório o fator limitante para a progressão de performance em animais já treinados (FRANKLIN; VAN ERCK-WESTERGREN; BAYLY, 2012).

Existe, na literatura, muitas pesquisas com treinamento e testes com cavalos durante o exercício em esteira. Tal método permite avaliação de respiração (KUSANO et al., 2007), consumo de oxigênio (SIDES et al., 2018), frequência cardíaca (ALONSO et al., 2013), lactato sanguíneo (RINGMARK et al., 2015) e outros metabólitos enquanto os animais estão ao passo, trote ou mesmo galope (EVANS, 2007). Por outro lado, existem muitos estudos que demonstraram que avaliações a campo das respostas ao exercício também podem contribuir para a identificação de um limite para o desempenho atlético (COTTIN et al., 2010).

A resposta ventilatória do sistema respiratório de equinos frente ao exercício é de difícil mensuração direta, dadas as proporções volumétricas desses animais e a limitação física dos aparelhos disponíveis (FRANKLIN; VAN ERCK-

WESTERGREN; BAYLY, 2012). No entanto, algumas pesquisas realizaram essas mensurações de maneira satisfatória, fornecendo resultados que são usados como base para correlacionar com outros parâmetros fisiológicos do equino que são mais facilmente mensuráveis na rotina clínica (ART et al., 1990).

A quantidade máxima de oxigênio utilizada pelo cavalo durante um exercício máximo é definida como consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), e esse é obtido por meio dos testes físicos de exercícios progressivos, com a inclinação da esteira mantida de forma constante e a velocidade de exercício sendo aumentada a cada 60 segundos até o cavalo alcançar a fadiga. Através do monitoramento constante do VO_2 durante o teste, nota-se um aumento linear do VO_2 concomitante ao aumento da velocidade de exercício, até o momento em que o aumento da carga de trabalho não é acompanhado por uma elevação proporcional no consumo de oxigênio (DERMAN e NOAKES, 1994). PRINCE et al. (2002) compararam o efeito do treinamento em cavalos da raça PSI e Árabes durante diferentes testes de exercício progressivo em esteira, e observaram valores maiores de VO_{2max} , da velocidade para o VO_{2max} e do tempo total de exercício durante o teste nos animais da raça PSI.

A determinação do VO_2 e, mais especificamente, do VO_2 máximo (VO_{2max}) é uma importante maneira de avaliar a capacidade aeróbica dos animais em treinamento, pois integra a eficiência e a coordenação entre os sistemas respiratório, cardiovascular e neuromuscular, fornecendo também as informações fisiológicas e metabólicas (COTTIN et al., 2010). A máscara de fluxo de gases determina concentrações de O_2 e CO_2 no ar inspirado e expirado, podendo, dessa forma, determinar diferentes taxas do VO_2 para diferentes intensidades de exercício preestabelecido (EVANS, 2000).

A monitoração da frequência cardíaca tem sido empregada para quantificar carga de trabalho durante o exercício intenso, pois se o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) não puder ser medido durante um teste de exercício clínico, é importante lançar mão de uma medida correlacionada com a velocidade de consumo máximo de oxigênio, como a VHR_{max} . No entanto, em um estudo realizado por ALONSO et al. (2013) com intuito de verificar a influência do treinamento nos índices de desempenho utilizando-se a V_{200} (velocidade máxima atingida quando a frequência cardíaca atingir 200 bpm) durante o teste padrão de

exercício progressivo em esteira de alta velocidade, utilizando-se a V200, FC_{pico} (pico de frequência cardíaca) e a distância percorrida, foi constatado que V200 não é eficaz para avaliação do desempenho atlético em treinamento em esteira, alertando que a associação de outros índices de desempenho e a distância percorrida podem assegurar melhores resultados na interpretação do programa de treinamento.

O ácido láctico é uma substância química produzida no sistema glicolítico e é conhecido por estar intimamente ligada à atividade física e metabolismo subsequente (ADEVA-ANDANY et al., 2014). A velocidade que resulta em uma concentração de lactato sanguíneo de 4 mmol/l é considerada um bom indicador da capacidade de desempenho para cavalos (ENOMOTO; SHIMIZU; KUDO, 2018). Um estudo realizado por Courouc; Chatard; Auvinet (1997) demonstrou que valores baixos de V4 esto associados a desempenhos ruins, e altos valores de V4 foram freqentemente relacionados a bons desempenhos, mas no sempre. Alertaram, ainda, que uma vez que valores baixos de V4 parecem estar associados a baixo desempenho, ele pode ajudar os treinadores a fazer uma seleo entre uma populao de cavalos e, portanto, a gerenciar seu treinamento com mais eficincia.

2.2 RESPOSTA DO SISTEMA RESPIRATRIO DE EQUINOS AO EXERCCIO

O fluxo de ar respiratrio em equinos submetidos ao exerccio aumenta de maneira significativa, uma vez que o volume minuto pode saltar de valores prximos a 80 l/min no repouso para mais de 1800 l/min durante o exerccio extenuante (ART et al., 1990). Esse incremento se deve muito mais ao aumento da frequncia respiratria, que passa de 10 a 15 movimentos/min para 110 a 130 movimentos por minuto, do que pela elevao do volume corrente, que aumenta em mdia 3 vezes, passando de 5 para 15 litros quando atingem o galope (BUTLER et al., 1993; ART; BAYLY; LEKEUX, 2002).

No entanto, a relação entre frequência respiratória e volume corrente é dependente do andamento do animal, uma vez que ao trote em altas velocidades o animal tende a apresentar maior volume corrente e menor frequência respiratória do que animais ao galope na mesma velocidade. Isso acontece porque durante o galope a movimentação corporal do animal e o deslocamento das vísceras abdominais atuam de maneira sinérgica às forças responsáveis pelos movimentos de inspiração e expiração, tornando a frequência respiratória sincrônica aos passos do equino (FRANKLIN; VAN ERCK-WESTERGREN; BAYLY, 2012).

O aumento no volume corrente é fruto da maior expansão da cavidade torácica, que promove um incremento na pressão negativa intrapleural, elevando seus valores de 4 cm de H₂O no repouso para até 80 cm de H₂O durante o exercício (ART et al., 1990). Essa pressão favorece a entrada de ar, que por sua vez, deve vencer as forças de resistência. A mais importante delas é exercida pelas vias aéreas superiores, principalmente cavidade nasal e laringe, que juntas oferecem aproximadamente 80% da resistência pulmonar total em condições normais (ART; BAYLY; LEKEUX, 2002). Quando em condições patológicas, a resistência gerada por essas estruturas se eleva drasticamente, causando prejuízos não só ao fluxo respiratório, como também à sanidade do restante das vias aéreas devido à sobrecarga de pressão e alteração na ventilação no sistema como um todo (MASON; RIGGS; COGGER, 2013).

Apenas parte do ar inalado atinge os alvéolos de maneira efetiva e realiza trocas gasosas, sendo conhecida como ventilação alveolar. O restante do ar permanece nas vias aéreas condutoras ou não realiza trocas no interior dos alvéolos, sendo a soma desses valores conhecida como espaço morto fisiológico (ART; BAYLY; LEKEUX, 2002). Durante o exercício o equino diminui de maneira expressiva a proporção do volume morto fisiológico, passando de valores relativos de 60% para 20%, tornando significativamente mais eficiente o aproveitamento do ar (MARLIN; ROBERTS, 1998).

2.3 INFLAMAÇÃO DAS VIAS AEREAS DECORRENTE DO EXERCÍCIO

Alterações no sistema respiratório apresentam-se como a segunda maior causa de queda de performance em equinos atletas (42%), ficando atrás somente do sistema musculoesquelético (DAVIDSON; MARTIN, 2003). Mesmo em animais sadios e sem alterações aparentes na função respiratória é esse o ponto que limita a performance dos atletas (DERKSEN; ROBINSON, 2002), pois segundo ART; BAYLY; LEKEUX, (2002) o treinamento promove um incremento nas etapas de transporte e utilização do oxigênio, mas não na ventilação, limitando assim a captação do oxigênio. Esse fato potencializa a possibilidade de ocorrer inflamação nas vias aéreas de equinos em resposta ao exercício, visto que o sistema respiratório está atuando em carga de trabalho limite para atender a essa elevação na demanda por parte dos demais sistemas exigidos no momento do esforço (FRANKLIN; VAN ERCK-WESTERGREN; BAYLY, 2012).

No entanto, ainda são escassos na literatura trabalhos que abordam de forma sistemática a ocorrência de inflamação das vias aéreas de animais sadios em resposta ao esforço de modalidades esportivas, enquanto que em humanos já é bem descrita esse tipo de alteração e as suas consequências no sistema respiratório durante o exercício (COUTO, *et al.* 2013; RUNDEL; JENKINSON, 2002).

Existem diversos trabalhos que demonstram a ocorrência de inflamação nas vias aéreas e consequente broncoconstrição durante o exercício em atletas humanos, principalmente em indivíduos com asma (cerca de 90% destes), mas durante ou em até 30 minutos após a realização de esforço físico esses sinais também podem ser observados em pessoas que nunca apresentaram sinais de asma, caracterizando a enfermidade conhecida como Broncoconstrição Induzida pelo Exercício (BIE), que apresenta uma maior prevalência nos indivíduos atletas, particularmente nos de alta performance (COUTO, *et al.* 2013; BRANNAN; TURTON, 2010; KUKAFKA; CICCOLELLA; D'ALONZO, 2008).

A teoria mais aceita sobre o mecanismo que desencadeia a BIE é a hipótese osmótica, por desidratação das vias aéreas, que propõe que a

hiperventilação leva à evaporação excessiva de água das vias aéreas desidratando as células superficiais, estimulando assim o movimento de água à partir das células vizinhas levando a contração celular e liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos e histamina, o que culmina com contração da musculatura lisa brônquica e aumento da permeabilidade vascular (COUTO, *et al.* 2013; ANDERSON; KIPPELEN, 2012; BRANNAN; TURTON, 2010;). Desta forma, a BIE estaria relacionada a fatores ambientais, como temperatura, umidade e qualidade do ar, e também a fatores individuais, como tipo e estágio de treinamento, determinantes genéticos e neuroimuno-endócrinos (COUTO, *et al.* 2013).

Segundo RUNDEL & JENKINSON (2002) a prevalência da BIE pode variar de 11 a 50% entre os atletas de acordo com a modalidade esportiva, sendo mais comum nos que praticam modalidades esportivas consideradas de alta ventilação, como futebol e atletismo, e modalidades de resistência, como esqui cross-country e maratona, sendo particularmente mais prevalente nessa última categoria pois estas atividades promovem um aumento na ventilação por longos períodos de tempo durante os treinamentos e competições, permitindo maior perda de água pela evaporação e subsequente inflamação das vias aéreas (PARSON; MASTRONARDE, 2005).

Em humanos a BIE e infecções do trato respiratório são mais frequentes em atletas de alta performance, que já estão em estágio avançado de treinamento, do que em atletas nas fases intermediárias de treinamento ou amadores, e ainda, atletas nas categorias intermediárias são menos susceptíveis a alterações na função respiratória do que indivíduos que não praticam algum tipo de esporte. Isso sugere que a relação entre alterações na função respiratória e exercício segue uma "curva-J", com exercício moderado ou regular promovendo um incremento na resistência do trato respiratório, enquanto que exercícios de forma intensa reduzem essa resistência (COUTO, *et al.* 2013).

Ao extrapolarmos esses estudos à medicina esportiva equina, mostra-se bastante plausível e importante a ocorrência de inflamação nas vias aéreas durante a realização de esforços físicos por mecanismos semelhantes aos já descritos em humanos, principalmente se levarmos em consideração as informações trazidas por (ART; BAYLY; LEKEUX, 2002) que demonstram que em

equinos a velocidade e o volume de ar envolvido nos movimentos respiratórios é significativamente maior do que no homem.

2.4 DOENÇAS DE VIAS AÉREAS RELACIONADAS AO EXERCÍCIO

Como mencionado anteriormente, em humanos as alterações no sistema respiratório são muito mais frequentes em atletas de alta performance, sendo inclusive já conhecidos alguns mecanismos relacionados à prática de esportes que desencadeiam essas afecções (COUTO, 2013). Também já foi dito que em equinos afecções do sistema respiratório são a segunda maior causa de queda de desempenho em animais atletas (DAVIDSON; MARTIN, 2003), sendo que parte dessa casuística se deve a doenças respiratórias que estão relacionadas diretamente ao momento da realização da prática esportiva e esforço físico.

Nesse grupo de doenças podemos citar as afecções dinâmicas de vias aéreas superiores, como o Deslocamento Dorsal de Palato Mole e a Neuropatia Laríngea Recorrente, por exemplo. Essas doenças são processos patológicos decorrentes de alterações morfofuncionais em estruturas dessa região, que através de processos mecânicos oferecem resistência a passagem do ar e consequentemente dificultam a ventilação do animal (REED; BAYLY; SELLON, 2004). Já que a etiopatogenia dessas doenças é inerente a processos mecânicos e não inflamatórios, essas afecções não serão discutidas em maiores detalhes nessa revisão.

Aqui serão discutidas as afecções que possuem um envolvimento maior com a ocorrência de processos inflamatórios em vias aéreas inferiores, como a Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) e a Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Esforço (HPIE).

2.4.1 Doença Inflamatória das Vias Aéreas

A doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) é a afecção crônica das vias aéreas mais comum em cavalos atletas (IVESTER; COUETIL; ZIMMERMAN, 2014) e consiste em uma afecção inflamatória não séptica das vias aéreas inferiores com etiologia e patogenia muito semelhantes a outra doença de importância na medicina equina, Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA), porém, com sintomatologia mais branda, esporádica, de ocorrência principalmente em animais jovens e em animais no momento da prática esportiva (ROBINSON, 2001; CARDWELL et al., 2011).

Ambas as doenças, DIVA e ORVA, são descritas como processos inflamatórios crônicos das vias aéreas inferiores, que ocorrem devido à uma resposta de hipersensibilidade da região à antígenos ambientais, como poeira, esporos de fungos, vapores de amônia, dentre outros (DAVIS; RUSH, 2002). As duas afecções são caracterizadas por broncoespasmo, produção excessiva de muco e alterações na parede bronquiolar que diminuem a luz das vias aéreas terminais, prejudicando a ventilação alveolar do animal e consequentemente as trocas gasosas (REED; BAYLY; SELLON, 2004; PIRIE, 2014).

Levantamentos internacionais demonstram uma variação muito grande na literatura quanto à prevalência de DIVA em equinos, com a maior parte apresentando resultados entre 11 e 50% (BURRELL, 1985; WOOD et al., 1999; CHAPMAN et al., 2000; KUSANO et al., 2008), podendo apresentar índices de até 80%, como o observado por SWEENEY; HUMBER; ROBY, (1992). Referente a dados nacionais, foram publicados dois trabalhos que encontraram uma prevalência entre 43 e 60% em equinos da cavalaria da polícia militar (LESSA et al., 2002; SAD et al., 2012), e um trabalho que avaliou animais de polo e demonstrou a prevalência de 32,4% de DIVA (SILVA et al., 2017).

A apresentação clínica se caracteriza por queda de performance, excesso de muco nas vias aéreas e tosse, que muitas vezes só são observados com o animal em exercício (IVESTER; COUETIL; ZIMMERMAN, 2014; WOOD et al., 2005). A ausência de tosse durante o exercício não descarta o diagnóstico de DIVA (WASKO et al., 2011), enquanto que, a ocorrência de episódios de tosse

ocasionais no animal em repouso aumenta as chances deste de se tornar portador de ORVA (BOSSHARD; GERBER, 2014). A auscultação torácica de animais com DIVA algumas vezes evidencia um aumento nos sons respiratórios e a presença de sibilos, principalmente nos momentos pós-exercício, entretanto, na maioria das vezes não é possível perceber alterações nesse tipo de exame (LAVOIE et al., 2011; COUETIL et al., 2016).

O principal meio de se concluir o diagnóstico de DIVA em equinos é somando a história clínica e sinais apresentados pelo animal à citologia das vias aéreas, onde pode ser observado um aumento no número de neutrófilo na amostra coletada, assim como nos casos de ORVA (BEDENICE; MAZAN; HOFFMAN, 2008). No entanto, nos casos de diva essa neutrofilia geralmente é leve ou moderada e pode vir acompanhada também de um aumento no número de eosinófilos e mastócitos, principalmente em animais jovens (IVESTER; COUETIL; ZIMMERMAN, 2014).

2.4.2 Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Esforço (rever no texto)

A Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Esforço (HPIE) é uma afecção muito frequente em equinos de esporte, e caracteriza-se pelo extravasamento de sangue na luz das vias aéreas, o que dificulta o fluxo de ar e as trocas gasosas, levando a uma queda brusca no rendimento e podendo inclusive levar o animal a óbito nos casos mais graves da doença (REED; BAYLY; SELLON, 2004)

O mecanismo envolvido no desenvolvimento da doença ainda não é totalmente conhecido, sendo consideradas algumas possibilidades, tais como: irregularidades na ventilação pulmonar devido a doença inflamatória nas vias aéreas; pressão mecânica de vísceras abdominais nos lobos dorsocaudais dos pulmões; e ainda, falha direta dos capilares alveolares devido a um aumento expressivo da relação entre a pressão arterial positiva e a pressão negativa no interior do alvéolo respiratório, gerando uma sobrecarga na barreira alvéolo-

capilar que acaba por se romper (REED; BAYLY; SELLON, 2004; HINCHCLIFF et al., 2005).

A HPIE já foi observada na maioria das raças de equinos que são submetidos a esforços extenuantes, tendo a sua prevalência estimada em 43% a 75% em equinos Puro Sangue Inglês de corrida (SULLIVAN et al., 2015a), 62% em animais Quarto-de-milha (HILLIDGE et al., 1984), 47,8% em equinos de equitação no Brasil (SAD et al., 2012) e 66,67% em equinos de salto (VICCINO et al., 2007).

No momento em que ocorre o episódio hemorrágico, o animal provavelmente apresentará uma brusca queda de performance, devido a dificuldade em realizar a hematose e oxigenar seus tecidos (HINCHCLIFF et al., 2005). Posteriormente ao episódio, as consequências da hemorragia e o processo inflamatório que se desencadeia em reação ao sangue presente na luz das vias aéreas, faz com que seja necessário um período maior de repouso a esse animal, prejudicando a sua rotina de treinamentos e carreira esportiva (RAPHEL; SOMA, 1982).

O principal meio diagnóstico para HPIE é a endoscopia das vias aéreas após a realização do exercício, através da qual pode ser visualizado e graduada (0 a 4, em que 0 seria a ausência de sangue e 4 o grau máximo de sangue visualizado via endoscopia) a quantidade de sangue livre na luz das vias aéreas. (HINCHCLIFF, et al., 2005). Outra maneira eficaz de se concluir o diagnóstico dessa doença é através da citologia de amostras de secreção das vias aéreas coletadas por lavado traqueal ou broncoalveolar, onde nos casos positivos da doença podem ser observados macrófagos que fagocitaram hemácias livres na via aérea, figuras celulares conhecidas como hemossiderófagos (LESSA et al., 2007).

As possibilidades terapêuticas e/ou medidas preventivas para reincidências são escassas na literatura, pois o principal meio de controle da HPIE utilizado na rotina de animais de corrida é a administração do diurético de alça (furosemida), o qual possui poucos estudos na literatura comprovando de maneira objetiva a sua eficácia e segurança (SWEENEY et al., 1990; HEGEDUS et al., 2007; SULLIVAN et al., 2015b).

2.5 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NAS VIAS AÉREAS DE EQUINOS

O exame físico do sistema respiratório dos equinos possui algumas limitações devido as dimensões do animal e sua capacidade respiratória bem desenvolvida, o que torna sutil e até imperceptível diversas alterações presentes no sistema (LECLERE; LAVOIE-LAMOUREUX; LAVOIE, 2011; COUETIL et al., 2016).

A endoscopia fornece uma gama importante de informações relevantes quando se busca avaliar o grau de inflamação das vias aéreas, pois através dela consegue-se ter uma avaliação do aspecto da mucosa das vias aéreas superiores, traqueia e brônquios, observando sinais de inflamação como coloração, edemaciação e aumento da vascularização (KOBLINGER et al., 2011). Além disso, através da endoscopia também é possível avaliar se existe secreção nas vias aéreas, a quantidade e aspecto desta secreção, e ainda, quando houver interesse pode-se coletar amostras da secreção para realização de citologia (GERBER et al., 2004).

Outro método bastante elucidativo no diagnóstico das doenças inflamatórias e mais sensível quando se busca avaliar inflamação local em animais hípidos, é a citologia a partir de amostras coletadas diretamente nas vias aéreas inferiores, podendo ser um aspirado da secreção encontrada na traqueia, um lavado da região traqueal ou da região broncoalveolar (FERNANDES; MORI; SANCHES, 2000). Amostras coletadas na região traqueal são representativas de toda a área pulmonar, mas podem apresentar baixa concentração celular e elevada diversidade populacional de células, devido à grande dinâmica de movimentação celular nessa região em consequência ao transporte mucociliar (DERKSEN et al., 1989). Já o lavado broncoalveolar se configura como um método mais sensível de avaliação das vias aéreas inferiores, no entanto, sua desvantagem é que representa apenas uma área pulmonar, o que pode interferir no diagnóstico de doenças focais (FERNANDES; MORI; SANCHES, 2000). Quanto ao método de coleta, o lavado traqueal apresenta-se vantajoso pelo fato de ser menos invasivo e passível de realização apenas com a contenção física do animal (LESSA et al., 2005).

O material obtido nas coletas de lavado traqueal e broncoalveolar também podem ser utilizados para avaliar as citocinas que atuam no estímulo e regulação do processo inflamatório (JOUBERT; CORDEAU; LAVOIE, 2011). Isso pode ser feito por diferentes métodos, como ELISA e citometria de fluxo pelo método de matriz de esferas de citocina, que quantificam e definem a concentração das Interleucinas presentes na amostra (MORGAN et al., 2004), fornecendo informações importantes na busca para compreender melhor os mecanismos envolvidos na patogênese de doenças das vias aéreas (DEBRUE et al., 2005; PADOAN et al., 2013), como também, quais são as interleucinas que estão ligadas a resposta inflamatória do sistema respiratório no exercício (AINSWORTH et al., 2003).

3 HIPÓTESE

O esforço físico realizado em modalidades esportivas provoca resposta inflamatória nas vias aéreas de equinos atletas.

4 OBJETIVOS

Avaliar marcadores da inflamação nas vias aéreas de equinos atletas saudáveis antes e após serem submetidos ao esforço físico realizado nas modalidades esportivas de Três Tambores e Marcha.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado em dois centros de treinamento e competição das referidas modalidades equestres, localizados nas cidades de Mairinque e Macatuba, no estado de São Paulo, nos quais foram avaliados animais em plena atividade atlética.

Tendo em vista o objetivo central do projeto que busca avaliar o impacto do esforço físico gerado em cada modalidade sobre o sistema respiratório de seus atletas, todos os animais foram submetidos a uma avaliação em repouso (M0) e outra 24 horas após a realização de uma simulação de mesma intensidade de uma prova oficial (M1). Os resultados obtidos em cada momento foram comparados para se verificar a variação provocada pela realização do exercício nos parâmetros avaliados no sistema respiratório dos animais.

As modalidades que participaram desse projeto estão entre as de maior relevância na equideocultura nacional, sendo elas as provas de Marcha e Três Tambores.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 16 equinos, machos e fêmeas, com idades entre 4 e 9 anos, participantes de provas equestres oficiais, criados em condições ótimas de estabulagem. A raça dos animais foi definida de acordo com a modalidade em que esse participa, sendo sempre avaliada no projeto a raça de equinos mais utilizada naquela prova. No grupo de animais da modalidade de Três Tambores, aqui denominado Grupo TT, foram utilizados animais a raça Quarto-de-milha; enquanto que no grupo dos animais de Marcha, aqui denominado Grupo MA, foram utilizados animais da raça Mangalarga Marchador.

Antes do início da fase experimental todos os animais foram submetidos a exame clínico completo para verificar o seu estado de saúde geral e sanidade do sistema respiratório. Para isso, foram realizadas as aferições da frequência cardíaca, frequência respiratória, motilidade intestinal, temperatura retal, inspeção

das mucosas aparentes e tempo de preenchimento capilar, além de auscultação traqueal e pulmonar. Como exames complementares foram realizados endoscopia das vias aéreas e lavado traqueal para avaliação citológica.

Através de um questionário preenchido junto ao proprietário ou treinador responsável pelo animal, foram coletadas informações referentes a dados de identificação dos animais, rotina de manejo e de treinamento, histórico de afecções e de performance em provas oficiais.

As coletas foram realizadas entre os meses de novembro e dezembro. Ao longo da fase experimental foi realizado o acompanhamento do estado geral de saúde dos animais, sendo eliminado do grupo experimental o animal que apresentasse qualquer afecção que pudesse afetar o seu quadro de saúde geral, performance na prova e resposta aos parâmetros avaliados.

5.2 MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

A primeira coleta de dados foi realizada previamente ao exercício, aqui denominada “M0”, avaliação em repouso. Para isso, era obrigatório que o equino estivesse em um período mínimo de 24 horas de repouso absoluto, mantido sob o manejo de seu local de alojamento. Além disso, eram necessários também sete dias prévios sem realizar esforço físico extenuante ou semelhante ao realizado nas provas da modalidade esportiva em que participa, sendo permitido apenas trabalhos leves de treinamento e condicionamento físico.

A avaliação realizada após o esforço físico, aqui denominada M1, foi executada 24 horas após a submissão do mesmo há uma simulação de prova realizada pelo próprio treinador. Sendo que nesse caso, a simulação foi fiel às provas oficiais em termos de regulamento e o treinador realizou estímulos com o intuito de exigir do cavalo o mesmo desempenho do que o obtido em competições.

5.3 AVALIAÇÃO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DOS ANIMAIS

Como descrito anteriormente, para critérios de comparação essa avaliação e coleta de dados foi realizada em um momento prévio e outro posterior à realização do exercício regulamentar previsto em cada modalidade esportiva.

Cada animal foi submetido nesses dois momentos à exame físico do sistema respiratório, endoscopia das vias aéreas, lavado traqueal para avaliação citológica e quantificação de interleucinas.

5.3.1 Exame físico

O exame físico dos animais foi realizado por avaliadores treinados seguindo a ficha de exame constante no anexo 1 desse projeto, coletando informações relacionadas ao ambiente e manejo a que o animal é submetido, exame físico geral, inspeção de narinas e padrão respiratório, palpação, auscultação e percussão de regiões e estruturas de importância ao sistema respiratório de equinos.

Para tanto, foram levantadas informações junto ao responsável pelo animal, e em seguida, foi realizado o exame físico com o animal em repouso, em ambiente calmo e silencioso.

Para efeitos comparativos e como critérios de classificação, os dados obtidos no exame físico dos animais foram organizados e avaliados seguindo o modelo de escore clínico do sistema respiratório proposto por TESAROWSKI *et al.* (1996) que já vem sendo amplamente utilizado pela comunidade científica como um método objetivo de análise de dados relacionados ao exame físico do sistema respiratório de equinos.

5.3.2 Endoscopia das vias aéreas

Com o objetivo de se realizar uma inspeção das vias aéreas foi realizada endoscopia dessa região. Para isso foi utilizado um fibroendoscópio (Olympus®) com dimensões de 1,10 m de comprimento e 13 mm de largura, possuindo um canal de trabalho.

Este exame foi realizado com os animais em estação, utilizando contenção física com cabresto, e quando necessário, pôde-se utilizar também a contenção física com o cachimbo, posicionado no lábio superior dos animais. Para a introdução do endoscópio, foi utilizado gel de lidocaína a 2% para promover um menor desconforto ao animal e facilitar a inspeção desde a região de cavidade nasal até a traqueia.

As imagens obtidas através desse exame foram registradas por uma câmera filmadora acoplada ao fibroendoscópio, para posteriormente ser examinada por três avaliadores com experiência em avaliação endoscópica e que não possuíam ciência do grupo e momento em que foram feitas aquelas imagens (ensaio cego).

Nesse exame foram consideradas informações relacionadas a morfologia e função das estruturas de vias aéreas, bem como aspecto e coloração da mucosa. A visualização de sangue livre nas vias respiratórias foi graduada de 0 a 4 de acordo com o que é proposto na classificação da Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Esforço (HINCHCLIFF *et al.*, 2005), enquanto que o muco visível nas vias aéreas foi avaliado qualitativamente e graduado seguindo o que foi proposto por (GERBER *et al.*, 2004), preenchendo a ficha de exame de acordo com a graduação ilustrada na Figura 1.

Figura 1. Ilustração da graduação proposta por GERBER *et al.* (2004) para avaliação endoscópica dos animais.

Fonte: Traduzido de GERBER *et al.* (2004)

5.3.3 Lavado traqueal

Para a coleta de amostras de secreção da região da traqueia dos animais, foi introduzido pelo canal de trabalho do endoscópio um cateter de polietileno, através do qual é infundido um volume de 20 a 40 ml de solução fisiológica estéril, que imediatamente é recuperado por sucção leve. O material coletado foi fracionado em duas partes, sendo uma acondicionada em microtubos e congelada à temperatura de 20°C negativos, para posterior dosagem de interleucinas. Enquanto que a outra parte foi primeiramente armazenada em tubos com EDTA e refrigerada até o momento da preparação de lâminas para avaliação citológica, o que aconteceu em um prazo máximo de 8 horas desde o momento da coleta.

Para a realização dessa avaliação citológica do lavado traqueal, foram confeccionadas lâminas pela citocentrifugação das amostras de suspensões celulares, à velocidade de 28g por seis minutos. Essas lâminas foram fixadas com

álcool metílico p.a. e coradas pelo método de ROSENFELD (1947) para a contagem diferencial das células, conforme descrito por FERNANDES (2000).

Foram quantificadas as citocinas IL-4, IFN- γ , IFN- α , IL-10 e IL-17. As três primeiras estão relacionadas principalmente à resposta do sistema imune frente a antígenos e a processos crônicos, se fazendo importante a sua avaliação nesse estudo para descartar a presença de infecções respiratórias e processos respiratórios crônicos nos animais utilizados no experimento. Enquanto que as citocinas IL-10 e IL-17 foram investigadas pelo seu importante papel na resposta inflamatória das vias aéreas.

A quantificação foi feita por citometria de fluxo pelo método de matriz de esferas de citocina (CBA - *cytometric beads array*) seguindo o protocolo “Horse Cytokine 5-plex Assay” realizado comercialmente pela Universidade de Cornell, localizada no município de Ithaca, no estado de Nova York, nos Estados Unidos da América. Através desse teste é feita a detecção e quantificação direta das interleucinas acima mencionadas nas amostras de lavado traqueal. Para isso, as amostras foram acondicionadas em microtubos e armazenadas à uma temperatura de -20°C num prazo máximo de oito horas desde a coleta, e foram mantidas no freezer até o momento do envio para o laboratório. O qual foi realizado de acordo com as orientações do laboratório, acondicionando as amostras em caixas de isopor com gelo seco e enviadas por transporte aéreo para chegar ao destino dentro do prazo de 48 horas. Os limites de detecção das Interleucinas no referido ensaio estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Intervalo de detecção das Interleucinas pelo teste “Horse Cytokine 5-plex assay”

	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-17 (U/ml)	IFN- γ (U/ml)	IFN- α (pg/ml)
Limite de detecção inferior	40	15	10	10	12
Limite de detecção superior	80000	35000	10000	5000	30000

FONTE: Extraído de Animal Health Diagnostic Center, Cornell University, disponível em <https://ahdc.vet.cornell.edu>

O cálculo da concentração final das interleucinas nas amostras de lavado traqueal foi feito multiplicando-se o seu valor quantificado no ensaio pelo fator de correção da ureia, que é a relação entre a concentração sérica da ureia e a sua concentração no lavado traqueal. Isso é possível pois a ureia possui alta capacidade de difusão entre os tecidos, o que faz com que ela se mantenha em concentrações semelhantes nos diversos fluidos corporais, como o sangue e líquido surfactante, por exemplo (FERNANDES, 2001; PORTO et al., 2010).

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo estatístico dos dados obtidos foi realizado com o objetivo de investigar a hipótese de que o exercício tem influência sobre o evento inflamatório, bem como a hipótese de que a magnitude da inflamação pode variar conforme a modalidade. A hipótese nula de que não há diferença nas medidas observadas antes e depois do exercício foi testada por meio do teste *t* para amostras relacionadas (variáveis contínuas de distribuição normal), teste de wilcoxon (variáveis contínuas de distribuição não normal e variáveis ordinais) e teste de McNemar (variáveis qualitativas nominais). A hipótese nula de que não há diferença na magnitude do efeito do exercício nas diferentes modalidades foi testada por meio do teste *t* para amostra independentes (variáveis contínuas de distribuição normal), Mann-Whitney (variáveis contínuas de distribuição não normal e variáveis ordinais) e teste de Fisher (variáveis qualitativas nominais), utilizando-se para fins de comparação ambos os grupos (MA e TT), no tempo 1 (após o exercício). A premissa de normalidade foi avaliada por meio do teste Shapiro-wilk, e inspeção dos histogramas e gráficos quantil-quantil. Em algumas variáveis fez-se a transformação logarítmica com objetivo de mitigar assimetrias da distribuição. Nos resultados significativos para o teste *t*, fez-se a avaliação do tamanho do efeito (effect size) pelo teste de Cohen. A concordância entre os avaliadores no exame endoscópico foi testada por meio da estatística kappa.

6 RESULTADOS

Os resultados apresentados nesse trabalho foram obtidos a partir de um grupo de 16 equinos atletas, divididos de maneira igualitária entre as raças Mangalarga Marchador e Quarto-de-milha, competidores ativos nas modalidades de Marcha e Três Tambores, respectivamente.

Durante o período de estudo e realização dos testes, nenhum animal apresentou qualquer tipo de intercorrência ou alteração observada nos exames realizados, não se fazendo assim necessário o descarte de dados obtidos.

6.1 EXAME FÍSICO

Todos os animais, em ambos os momentos, apresentaram os parâmetros vitais dentro dos valores de referência esperados para a espécie. Não foram observados em nenhum dos momentos alterações no exame físico sugestivas de acometimento por alguma doença, seja ela no sistema respiratório ou não.

Dentre os parâmetros relacionados ao sistema respiratório, os que apresentaram alguma variação foram a frequência respiratória e a presença de secreção nasal.

Em todos os casos em que foi observada a presença de secreção nasal (SN) tratava-se de secreção serosa unilateral. A frequência com que foi observada (Tabela 2) não apresentou relevância estatística quando comparados os diferentes grupos e momentos ($p < 0,05$).

A frequência respiratória apresentou valores médios maiores no momento M1 (Tabela 2), mas essa diferença também não foi significativa ao ser analisada estatisticamente ($p < 0,05$).

Tabela 2: Valores médios de frequência respiratória (FR) e número de animais em que foi observada a presença de secreção nasal (SN):

Variável	Avaliador	Grupos			
		Marcha (MA)		Três Tambores (TT)	
		M0	M1	M0	M1
FR		13.5±3.82	21.5±10.6	21.2 ± 8.71	23.2 ± 4.10
SN		2/8	2/8	4/8	3/8

Para categorização dos resultados obtidos, os mesmos foram aplicados ao escore clínico proposto por (TESAROWSKI; VIEL; MCDONELL, 1996), que varia de 0 a 25. No presente estudo, todos os animais, em ambos os momentos, apresentaram escore abaixo de 5, sendo, portanto, considerados saudáveis pelo referido autor, uma vez que acima do escore 9 é considerado uma possível alteração no sistema respiratório. Não houve variação significativa estatisticamente quando comparados os escores entre os momentos (teste de Wilcoxon) e grupos (teste de Mann Whitney).

6.2 ENDOSCOPIA

As imagens obtidas pela endoscopia das vias aéreas dos animais no referido estudo foram satisfatórias para avaliação de todos os parâmetros propostos. No entanto, em um dos animais do grupo TT no momento M1 o vídeo apresentou luminosidade em intensidade menor do que os demais, e por esse motivo, um dos avaliadores preferiu não emitir o seu parecer na análise desse animal, gerando o número de 31 observações em cada variável descrita pelo avaliador 3.

A concordância entre os três avaliadores foi testada por meio da estatística kapp, e observou-se coeficiente igual a 0,928 (n=31). O nível de significância utilizado foi de 5%.

Os dados resultantes da avaliação do exame endoscópico das vias aéreas podem ser observados na Tabela 3. Para a variável “anomalias” o valor representa a frequência de observação de alterações em relação ao número de animais avaliados. Para as demais variáveis o valor representa a mediana observada e o intervalo interquartil dos dados analisados (valor entre parênteses).

Tabela 3. Descrição dos resultados obtidos na endoscopia, apresentados individualmente para cada avaliador e divididos entre os momentos Pré e Pós de cada grupo:

Variável	Avaliador	Grupos			
		Marcha (MA)		Três Tambores (TT)	
		M0	M1	M0	M1
Anomalias	1	0/8	0/8	0/8	0/8
	2	0/8	0/8	0/8	0/8
	3	0/8	0/8	0/8	0/7
Acúmulo de Muco	1	0.5 (1)	2 (1)	0.5 (1)	2.5 (1)
	2	1 (0.25)	2.5 (1)	1 (1)	2.5 (1)
	3	1 (0.25)	3 (0.25)	1 (0.25)	3 (0.5)
Localização	1	01 (0)	01 (0)	01 (0)	01 (0)
	2	01 (0)	01 (0)	01 (0)	01 (0)
	3	01 (0)	01 (0)	01 (0)	01 (0)
Viscosidade	1	3 (0.25)	3 (0.25)	3 (0)	3 (0.25)
	2	3 (0.25)	3 (0.25)	3 (0)	3 (0.25)
	3	3 (0.25)	3 (0.25)	3 (0)	3 (0.25)
Coloração	1	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)
	2	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)
	3	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)

Como pode-se notar na tabela acima, não foram observadas anomalias estruturais e/ou funcionais, bem como sinais sugestivos de doenças respiratórias, no exame endoscópico das vias aéreas superiores e traqueia dos animais utilizados nesse estudo.

As características da secreção observada no lúmen da traqueia, tais como localização, viscosidade e coloração não apresentaram variação significativa entre os grupos e momentos avaliados. Em todos os animais o acúmulo de secreção se localizou na região ventral da traqueia. A viscosidade concentrou seu escore em torno de 3, com intervalo interquartil de 0.25, exceto no momento M0 do grupo TT, em que o valor desse intervalo foi zero. A coloração foi classificada

como branca na maioria das avaliações, indicando também a posição intermediária (3) no escore proposto por GERBER et al. (2004), com intervalo interquartil equivalente a zero.

O acúmulo de secreção mucosa apresentou visível diferença entre os momentos T0 e T1 nos dois grupos estudados, sendo os maiores escores observados no momento pós-exercício. A análise estatística realizada através da regressão de Poisson demonstrou diferença significativa em ambos os grupos, com $p < 0.001$. Na comparação entre os grupos MA e TT no momento M1, também pela regressão de Poisson, não foi observada diferença estatística significativa.

A Figura 2 ilustra o escore apontado em cada observação realizada pelos avaliadores, gerando um total de vinte e quatro observações em cada grupo, uma vez que cada um era composto por oito animais e os exames foram avaliados por três pesquisadores. Já a Figura 3 retrata a distribuição do escore médio observado em cada grupo e momento avaliado.

Figura 2. Comportamento do escore de acúmulo de muco nos momentos de cada grupo.

Figura 3. Prevalência do escore médio de acúmulo de muco nas vias aéreas dos animais dos dois grupos em ambos os momentos.

Em dois dos oito animais do grupo TT no momento M1 foi observado presença de sangue na traqueia em grau 1 (Figura 4) seguindo o escore proposto por HINCHCLIFF et al. (2005), com variação de 0 a 4. Essa observação apresentou relevância estatística significativa quando analisada pelo teste de McNemar ($p < 0,07$).

Figura 4. Ausência (0) ou presença de sangue (1) observada via endoscopia nas vias aéreas dos animais da modalidade de Três Tambores(TT) nos momentos M0 e M1.

6.3 CITOLOGIA DO LAVADO TRAQUEAL

Os valores relativos das populações celulares observadas nas amostras de Lavado traqueal estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valor médio da contagem celular relativa (%) observada na citologia do lavado traqueal dos animais dos dois grupos em ambos os momentos:

Célula	Grupos			
	Marcha (MA)		Três Tambores (TT)	
	M0	M1	M0	M1
Neutrófilos	6.25 ± 4.01	32.8 ± 17.1	6.92 ± 3.20	15.8 ± 3.89
Hemossiderofagos	0 (0)	6.16 (5.74)	4.84 (1.5)	11 (1.42)
Macrofagos	83.3 (8.75)	52.5 (22.8)	75.8 (10.4)	65.7 (7.67)
Linfocitos	10 ± 2.60	7.58 ± 2.3	9.67 ± 4.09	7.58 ± 1.79
Eosinófilos	0.5 (0.505)	0 (0.082)	0.33 (0)	0 (0.33)
Mastocitos	0.33 (0.33)	0.165 (0.415)	0.33 (0.423)	0 (0.082)

A contagem de neutrófilos sofreu variação significativa entre os dois momentos em ambas as modalidades ($p < 0,001$), no entanto, houve diferença também na comparação entre as duas modalidades após o exercício, em que o incremento no percentual desse tipo celular foi mais acentuado nos animais da modalidade de Marcha ($p = 0,01$) (Figura 5).

Figura 5. Ilustração da variação do número médio de neutrófilos sofrida pelos animais dos dois grupos entre o momento M0 e M1.

Todos os animais apresentaram valores relativos de neutrófilos abaixo de 20% na análise anterior ao exercício (M0), no entanto, após a sua realização (M1), um animal do grupo TT e quatro animais do grupo MA apresentaram valores acima desse índice.

A contagem de hemossideróforos apresentou um cenário semelhante ao descrito para os Neutrófilos. Houve variação significativa nas duas modalidades entre os momentos M0 e M1 ($p<0,01$), com grau de resposta diferente entre as modalidades, sendo que nesse caso, foi o grupo de Três Tambores que apresentou variação mais acentuada após o exercício ($p=0,008$) (Figura 6).

Figura 6. Ilustração da variação do número médio de hemossideróforos observado nos animais dos dois grupos entre o momento M0 e M1.

A contagem de macrófagos também apresentou variação significativa quando comparados os momentos M0 e M1 nas duas modalidades ($p<0,02$), sendo que após o exercício a população desse tipo celular foi menor em ambos os casos.

6.4 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINAS

A concentração das interleucinas nas amostras de Lavado Traqueal foi estabelecida através do teste de Elisa, seguido pela correção da diluição das amostras, utilizando-se o fator de correção obtido pela razão entre os valores de ureia sérica de cada animal e de sua respectiva amostra de lavado. O valor final da concentração das interleucinas está descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Descrição das médias de obtidos pela quantificação em cada momento das Interleucinas nas amostras de Lavado Traqueal nos dois grupos:

Interleucinas	Grupos			
	Marcha (MA)		Três Tambores (TT)	
	M0	M1	M0	M1
IFN-Alpha	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-4	53,12	53,46	50,13	52,50
IFN-Gama	179,98	121,11	95,40	121,98
IL-17	106,72	286,48	89,93	124,84
IL-10	54,66	253,08	181,26	535,16

O Interferon Alfa não foi detectado em nenhuma amostra. Cabe aqui lembrar que a sensibilidade da técnica utilizada é de 12 picogramas por ml, e ainda, as amostras analisadas nesse estudo se tratam de lavado traqueal, que devido a técnica de colheita apresenta diluição da secreção obtida das vias aéreas, dificultando a detecção de interleucinas de baixa concentração.

Já ao observar os valores médios da concentração de IL-10 (Tabela 5), pode-se ter a falsa impressão de que houve diferença relevante entre os momentos de cada grupo, no entanto, esses valores se devem à sua dosagem em apenas dois animais do grupo MA, sendo um na coleta M0 e outro na M1, e dois animais no grupo TT, sendo 1 detectado nos dois momentos e outro apenas

no M1. Dessa maneira, não houve diferença estatística significativa ao analisar a variação de IL-10 nos momentos estudados.

A IL-4 foi detectada em todas as amostras, apresentando valor médio de 53.1 ($\pm$ 31.7) e 53.5 ($\pm$ 31.9) nos momentos M0 e M1 do grupo MA, respectivamente, e 50.1 ($\pm$ 17.5) e 52.5 ($\pm$ 17.2) nos momentos M0 e M1 do grupo TT, respectivamente (Figura 7). Dessa maneira não houve diferença significativa, seja na comparação entre os momentos (teste t pareado) ou entre os grupos (teste t não pareado).

Figura 7. Concentração de IL-4 nos dois momentos de cada grupo.

O Interferon Gama (IFN-Gama) apresentou variação significativa quando comparados os momentos pré e pós-exercício nos dois grupos, utilizando-se o teste T pareado ($p=0.03$). Entre os animais da modalidade de Marcha (MA), os valores médios foram 180,0 ($\pm$ 203,0) no momento M0 e 121,0 ($\pm$ 97,8) no M1. Já entre os praticantes de Três Tambores (TT), os valores foram 95,4 ($\pm$ 40,8) no momento M0 e 122,0 ($\pm$ 44,4) no M1 (Figura 8).

Figura 8. Variação da concentração de Interferon Gama (IFN-Gama) nos dois momentos de cada grupo.

A interleucina 17 apresentou médias de concentração maiores no momento pós-exercício (M1) nos dois grupos, sendo essa diferença mais acentuada no grupo de Marcha (MA) (Tabela 5). O mesmo comportamento se observou na mediana, em que o grupo TT apresentou os valores de 90,3 ($\pm$ 62,9) e 123,7 ($\pm$ 51,9) nos momentos M0 e M1, respectivamente, enquanto que o grupo MA apresentou os valores de 91,0 ($\pm$ 50,6) no momento M0 e 139,5 ($\pm$ 238,0) no momento M1 (Figura 9). Quando avaliados esses valores pelo teste de Wilcoxon constatou-se diferença significativa entre os momentos M0 e M1 no grupo de Marcha ($p=0,02$).

Figura 9. Variação da concentração de IL-17 nos dois momentos de cada grupo.

7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho apontam para uma resposta positiva em relação à hipótese de que o esforço físico realizado em modalidades esportivas gera resposta inflamatória nas vias aéreas de equinos atletas. No entanto, na análise desses dados observou-se respostas cuja contribuição à medicina equina vão além desse propósito, conforme será discutido nessa seção.

Na avaliação física dos animais, após minucioso exame físico do sistema respiratório, não foram observadas variações perceptíveis na comparação entre os momentos M0 e M1. Isso corrobora com diversos autores que apontam para o fato de que o sistema respiratório dos equinos possui capacidade inata muito desenvolvida, o que faz com que dificilmente sejam detectáveis fisicamente alterações sutis nesse sistema (HOFFMAN, 2002; BACCARIN, 2005; BIAVA et al., 2006; COUETIL et al., 2016).

O índice de Tesarovsky, um importante escore utilizado na medicina equina para tornar objetiva a avaliação do sistema respiratório, permitindo assim a comparação quantitativa a partir de dados subjetivos do exame físico, classifica os resultados obtidos no exame num intervalo entre 0 e 25, sendo considerado com sinais alterações nas vias aéreas quando um animal apresenta escore superior a 10. No presente estudo, o escore mais alto observado foi 4, sendo que a média observada variou entre 1,5 e 2, demonstrando que nenhum dos animais, em ambos os momentos, se aproximou de um nível de alteração nas vias aéreas que pudesse ser considerado significativo perante o que é proposto por (TESAROWSKI; VIEL; MCDONELL, 1996).

O exame endoscópico foi avaliado por três pesquisadores com experiência na interpretação desse tipo de exame. Após o preenchimento individualizado das fichas os resultados foram tabulados e submetidos há uma análise de concordância, na qual foi obtido o índice de 0,92, o que de acordo com o proposto por DOHOO; MARTIN; STRYHN, (2003) representa alta concordância entre os avaliadores, uma vez que índices acima de 0,8 representam uma concordância “quase perfeita”.

Esse resultado aponta para a alta repetibilidade e confiança desse tipo de exame na avaliação de sinais de inflamação nas vias aéreas, corroborando com os resultados obtidos por GERBER et al. (2004), em que após as avaliações por três pesquisadores distintos também foi constatada alta correlação e reprodutibilidade do exame.

A localização ventral do muco observado na traqueia é esperada em animais saudáveis. Variações nesse parâmetro, como localização lateral, dorsal ou dispersa por toda a parede da traqueia, sugerem que o animal tenha apresentado episódios de tosse que justifiquem a dispersão do muco pelo lúmen traqueal (SLOVIS, 2004), o que não foi observado em nenhum dos exames nesse estudo.

Já a coloração de muco esperada em animais saudáveis é a branca, intermediária entre a amarela presente nos casos de processo inflamatório intenso (associado ou não a um agente infeccioso), e a acentuadamente incolor observada nos casos em que há grande volume de saliva presente nas vias aéreas (BARAZAKI, 2007). A graduação intermediária também é sinal de higidez na avaliação da viscosidade, uma vez que secreção muito viscosa sugere processo inflamatório intenso e a muito fluida sugere elevada quantidade de saliva na traqueia (SLOVIS, 2004). Em ambos os momentos nos dois grupos avaliados o escore médio obtido na avaliação desses parâmetros foi o intermediário (3), sugerindo que o esforço físico realizado não foi capaz de intensificar a coloração e viscosidade do muco, e também, que durante a introdução do endoscópio nas vias aéreas não houve a condução de volume significativo de saliva para a traqueia.

O principal parâmetro do exame endoscópico relacionado à inflamação das vias aéreas é o acúmulo de muco na traqueia (GERBER et al., 2004; HOLCOMBE et al., 2006). No presente estudo foi observada significativa variação entre os momentos M0 e M1 nesse parâmetro em ambos os grupos ($p < 0.001$) (Tabela 3), sendo que todos os animais apresentaram visível incremento na quantidade de muco presente nas vias aéreas 24 horas após o exercício (Figuras 2 e 3). Esse dado aponta de maneira notável para a resposta das vias aéreas ao esforço realizado nas modalidades esportivas estudadas.

Essa informação também apresenta relevância no que diz respeito a conduta descrita na literatura e utilizada para a avaliação do sistema respiratório de equinos via endoscopia, uma vez que de acordo com diversos autores (HOLCOMBE et al., 2006; COÜETIL et al., 2016; CARDWELL et al., 2011), escore de acúmulo de muco acima de 2 é indicativo de acometimento do animal por DIVA, no entanto, não são feitas ressalvas quanto ao momento da execução do exame em relação à realização de esforço físico prévio pelo animal. Em livros voltados para o exame endoscópico de equinos, como dos autores BARAZAKI (2007) e SLOVIS (2004), a única condição apontada como possível causador de aumento no acúmulo de muco em animais hípidos é a realização de viagem do animal com a cabeça erguida. Desta feita, cabe aqui a sugestão de que ao realizar a endoscopia das vias aéreas em um intervalo de 24 horas após a submissão do equino a um esforço físico equivalente às modalidades esportivas aqui estudadas, deve-se ter cautela ao utilizar o acúmulo de muco como parâmetro para definir o estado de doença ou não de um animal.

Outra avaliação importante de ser realizada quando se trata de exame endoscópico pós exercício é verificar a presença de sangue nas vias aéreas, decorrente de hemorragia pulmonar induzida pelo esforço. No presente estudo essa alteração foi observada em dois animais (25%) do grupo TT no momento M1, gerando diferença estatística significativa quando comparado ao momento M0 ($p = 0.04$). Esse resultado está abaixo do que o demonstrado por trabalhos na literatura (BARBOSA et al., 2016; LÉGUILLETTE et al., 2016) que apresentam índices de prevalência entre 37 e 68%. No entanto, no presente estudo o exame endoscópico foi realizado 24 horas após a prova, enquanto que na maioria dos trabalhos com o objetivo de avaliar a prevalência de HPIE esse período geralmente é de até 90 minutos, o que pode ter gerado um menor índice nesse estudo.

Essa variação significativa na presença de sangue após o exercício nos equinos submetidos à prova de tambor está em consonância com o que foi observado na citologia do lavado traqueal, em que os dois grupos apresentaram diferença estatística significativa quanto a presença de hemossiderófagos na comparação entre os momentos M0 e M1, no entanto, essa variação foi mais

intensa no grupo TT, gerando uma diferença estatística também quando comparada ao grupo MA.

Levando-se em consideração que a modalidade de Três Tambores é um esporte de explosão quando comparada à de Marcha, a maior prevalência de HPIE nessa modalidade vai de encontro à hipótese de que o extravasamento de sangue ocorra como consequência da falha direta dos capilares alveolares devido a um aumento expressivo da relação entre a pressão arterial positiva e a pressão negativa no interior do alvéolo respiratório, gerando uma sobrecarga na barreira alvéolo-capilar que acaba por se romper (REED; BAYLY; SELLON, 2004; HINCHCLIFF et al., 2005).

Outro resultado importante observado na citologia das amostras de lavado traqueal foi o aumento significativo do número de neutrófilos no momento M1 em comparação ao M0 tanto na modalidade de Marcha ($p=0,001$) quanto na de Três Tambores ($p=0,002$), e também diferença quando comparadas as duas modalidades entre si no momento pós exercício ($p=0,01$), demonstrando que esse aumento foi mais intenso nos animais da prova de longa duração.

A primeira informação que pode ser extraída desse resultado é que o exercício provoca significativo aumento no número de neutrófilos presentes na via aérea, indicando a ocorrência de resposta inflamatória em decorrência do esforço físico provocado pela prática das modalidades esportivas aqui estudadas. Esse dado corrobora com o que foi observado pelos pesquisadores HOLCOMBE (2006) e SALZ (2016) que relatam comportamento semelhante em animais na modalidade de corrida.

Uma questão importante que pode ser levantada a partir dessa informação é quanto ao diagnóstico da Doença Inflamatória das Vias Aéreas, que de acordo com a literatura científica, é considerado positivo quando o animal apresenta contagem de neutrófilos no lavado traqueal acima de 20% (ROBINSON, et. Al., 2003; ROSSI, et. al., 2018). No entanto, neste estudo os dezesseis animais apresentaram valores abaixo desse índice no momento M0, enquanto que cinco deles (quatro do grupo MA e um do grupo TT) apresentaram valores superiores à linha de corte no momento M1. Dessa forma pode-se inferir que para interpretação

da citologia do lavado traqueal deve-se levar em consideração a relação entre o momento em que foi feita a coleta e a realização de esforço físico prévio.

A partir desse dado também pode-se inferir que provas de longa duração, como é o caso da Marcha, geram uma resposta inflamatória mais intensa do que as modalidades de curta duração como a Três Tambores. Essa informação vai de encontro ao que é observado em atletas humanos, nos quais a prevalência de Broncoconstrição Induzida pelo Exercício (BIE), por consequência a resposta inflamatória local, é maior em modalidades esportivas consideradas de alta ventilação (RUNDEL, 2002), sendo particularmente mais prevalente nos atletas maratonistas, pois essa atividade promove aumento na ventilação por longos períodos de tempo durante os treinamentos e competições, permitindo relativamente uma maior perda de água pela evaporação e subsequente inflamação das vias aéreas (PARSON, 2005).

São escassos na literatura trabalhos com esse direcionamento para equinos, mas BELING et. al. (2021) chegaram à conclusão semelhante ao constatar que animais das raças Mangalarga Marchador e Campolina utilizados em provas de Marcha, apresentaram alta prevalência de sinais compatíveis com Doença Inflamatória das Vias aéreas, que foi caracterizada em 56% dos animais.

Outra população celular que sofreu variação significativa estatisticamente entre os momentos M0 e M1 em ambas as modalidades foi a de Macrófagos ($p < 0.002$). No entanto, essa informação é considerada de baixa relevância para o estudo pois isso se deve principalmente ao aumento das populações de neutrófilos e de hemossiderófagos e não necessariamente pela diminuição da população global de macrófagos, uma vez que essa contagem se trata de uma avaliação relativa e não absoluta do número de cada tipo celular.

Dentre as Interleucinas avaliadas pelo ensaio “Horse 5-Plex Assay”, aquelas cuja ação tem maior relação direta com o objetivo desse estudo são as Interleucinas IL-17 e IL-10, consideradas importantes mediadores da resposta inflamatória (MORE et al, 2001; ACOSTA-RODRIGUE et al, 2007).

A Interleucina IL-4 e os Interferons Alfa e Gama apresentam ação principal voltada à resposta do sistema imune à antígenos, agindo contra infecções virais (IFN-Alfa), patógenos intracelulares (IFN-Gama) e induzindo a produção de

anticorpos (IL-4) (MOSMAN, 1989). No presente estudo essas citocinas foram avaliadas com a finalidade de verificar a ocorrência de processos crônicos ou infecciosos nas vias aéreas dos animais utilizados, o que comprometeria os resultados referente a resposta inflamatória ao exercício. Em todas as amostras analisadas os resultados obtidos na quantificação dessas citocinas apontam para a ausência dos referidos processos.

Cabe aqui também discutir brevemente o comportamento dos valores observados na quantificação dessas citocinas nos dois momentos analisados. O IFN-Alfa não foi detectado em nenhuma das amostras, a concentração da IL-4 apresentou valores semelhantes em todos os animais em ambos os momentos, enquanto que o IFN-Gama apresentou variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois momentos em ambos os grupos avaliados. No entanto, enquanto que a sua concentração foi maior após o exercício (M1) nos animais de Três Tambores (TT), no grupo de Marcha (MA) essa variação ocorreu em sentido oposto, apresentando diminuição dos seus valores após o exercício (Figura 8). Desta feita, levando-se em consideração também a sua ação voltada ao combate a patógenos intracelulares, possivelmente a variação observada nesse trabalho não possui relação direta com a reposta inflamatória ao exercício, o que corrobora com AINSWORTH et al (2003), que demonstraram que o exercício extenuante em esteira não exerce efeitos deletérios sobre a expressão gênica de IL-4 e IFN-Gama 24 horas após atividade física intensa. Um estudo demonstrou haver mudanças significativas no Lavado Broncoalveolar das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10, sugerindo que exercícios em climas frios podem levar a doenças semelhantes às das vias aéreas por meio da indução local de citocinas típicas do fenótipo TH2 (DAVIS et al, 2005)

A Interleucina-10 é uma citocina cuja presença em elevadas concentrações está atrelada à ocorrência de processo inflamatório (MORE et al, 2001; BOND et al., 2019), tendo sido detectada em níveis elevados nos animais com grau severo da síndrome asma (WILSON, et. al., 2020). No trabalho desenvolvido por KARAGIANNI et al., 2019, onde avaliou-se o efeito do treino em cavalos de corrida, concluiu-se que o efeito do treino não alterou significativamente a liberação de IL-10 e IFN-Alfa antes (6 a 7 horas) e após 24 horas do exercício. RIIHIMAKI et al., (2008), objetivando a contribuição da avaliação do epitélio

bronquial nas inflamações de vias aéreas de animais com ORVA durante a exarcebação e remissão de crise, também não encontraram variação da IL-10 entre ambos os grupos. No presente estudo, a IL-10 foi detectada em 4 animais, dois em cada grupo, de tal forma que no grupo de MA foi detectada em um animal no momento M0 e outro no momento M1, enquanto no grupo TT foi detectada em um animal no momento M1 e no outro animal foi detectada nos dois momentos. Dessa forma, como foi detectada em um número reduzido de animais e aparentemente sem um comportamento padrão de resposta, não foi possível extrair conclusões quanto ao seu papel na resposta inflamatória ao exercício no presente estudo.

A Interleucina 17, um importante mediador pró-inflamatório atuante no recrutamento de neutrófilos (LINDEN et al., 2000; MOSELEY et al., 2003), foi detectada em todas as amostras e apresentou valores médios maiores após o exercício em ambos os grupos, o que ocorreu de maneira mais acentuada nos animais da modalidade de Marcha, gerando diferença estatística significativa ($p=0,02$) (Figura 9). Sabendo que DEBRUE et al., (2005) e, mais tarde, BEEKMAN; TOHVER; LÉGUILLETTE, (2012) notaram alta correlação entre o aumento na expressão da IL-17 em vias aéreas e o agravamento do quadro inflamatório de animais com ORVA, o resultado obtido no presente estudo aponta para a maior atividade inflamatória nas vias aéreas dos animais após o exercício, principalmente naqueles submetidos à prova de Marcha, o que possivelmente esteja relacionado ao maior tempo de duração do exercício e exposição das vias aéreas à hiperventilação e desidratação dos seus tecidos, corroborando novamente com trabalhos que demonstram a maior prevalência de alterações inflamatórias nas vias aéreas de atletas humanos em modalidades de resistência (RUNDEL, 2002; PARSON, 2005).

Na análise comparativa entre os momentos M0 e M1, percebe-se que houve correlação positiva entre os principais marcadores de resposta inflamatória avaliados, como a concentração de IL-17, a população de neutrófilos no lavado traqueal e o acúmulo de muco na traqueia, que em geral apresentaram índices mais elevados após o exercício em ambas as modalidades, demonstrando a ocorrência de reação inflamatória nas vias aéreas devido ao esforço físico realizado nas modalidades esportivas de Marcha e Três Tambores.

Ao analisar as respostas geradas em cada modalidade individualmente, observa-se que nos animais de Marcha são mais intensas as respostas relacionadas ao processo inflamatório propriamente dito, demonstrando grau maior de inflamação nos animais dessa modalidade, enquanto que nos animais de Três Tambores apesar de os sinais de inflamação serem mais discretos, estão mais evidentes sinais que demonstram a ocorrência de sangramento nas vias aéreas, representados pela maior quantidade de hemossiderófagos no lavado traqueal e pela presença de sangue na traqueia. A partir disso pode-se inferir que as duas modalidades promovem estresse diferente nas vias aéreas, uma vez que o esforço explosivo da modalidade de Três Tambores aumenta a chance do animal apresentar algum grau de hemorragia pulmonar, enquanto que o exercício de longa duração realizado na modalidade de Marcha promove uma resposta inflamatória nas vias aéreas mais intensa.

8 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o esforço físico realizado durante o exercício das modalidades esportivas de Marcha e Três Tambores provoca resposta inflamatória nas vias aéreas de equinos atletas.

Conclui-se também que essa resposta apresenta variação de acordo com a modalidade esportiva e o padrão de esforço realizado pelo animal.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Interleukins 1 β and 6 not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin-17 producing human T helper cells. **Nat. Immunol.** v. 8, p. 630-638, 2007.
- ADEVA-ANDANY, M.; LÓPEZ-OJÉN, M.; FUNCASTA-CALDERÓN, R.; AMENEIROS-RODRÍGUEZ, E.; DONAPETRY-GARCÍA, C.; VILA-ALTESOR, M.; RODRÍGUEZ-SEIJAS, J. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. **Mitochondrion**, v. 17, p. 76–100, 2014.
- AINSWORTH, D. M.; APPLETON, J. A.; EICKER, S. W.; LUCE, R.; FLAMINIO, M. J.; ANTCZAK, D. F. The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 1, p. 61–71, 2003.
- ALONSO, J. de M.; WATANABE, M. J.; HUSSNI, C. A.; MANTOVANI, C. de F.; FERNANDES, V. S.; MACHADO, L. P.; YONEZAWA, L. A.; KOHAYAGAWA, A.; THOMASSIAN, A. O treinamento nos valores da V200, FCpico e distância percorrida de cavalos da raça Árabe e Crioula. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 722–728, 2013.
- ANDERSON, S. D.; KIPPELEN, P.; Assessment and prevention of exercise-induced bronchoconstriction. **Br J Sports Med** v. 46, n. 6, p. 391-396, Jan, 2012
- ART, T.; ANDERSON, L.; WOAKES, A. J.; ROBERTS, C.; BUTLER, P. J.; S, D. H.; LEKEUX, P. Mechanics of breathing during strenuous exercise in thoroughbred horses. **Respiration Physiology**, v. 82, p. 279–294, 1990.
- ART, T.; BAYLY, W.; LEKEUX, P. Pulmonary Function in the Exercising Horse. **International Veterinary Information Service**, v. 1, n. 2, 2002. Disponível em: <www.ivis.org>.
- BACCARIN, R. Y. A. **Diagnóstico e tratamento das pneumopatias de esforço**. [In: II Simpósio Internacional do Cavalo Atleta e IV Semana do Cavalo – SIMCAV. 2005, Belo Horizonte, Anais II Simpósio Internacional do Cavalo Atleta. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005, p. 12-28..].
- BARAZAKI, S. **Handbook of equine respiratory endoscopy**. 1. ed. [s.l.] Saunders, 2007.
- BARBOSA, J. P. B. et al. Avaliação endoscópica das vias aéreas, do perfil de gases, dos eletrólitos e do equilíbrio ácido-base em equinos submetidos ao treinamento de três tambores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1152–1158, 2016.
- BEDENICE, D.; MAZAN, M. R.; HOFFMAN, A. M. Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses

diagnosed with inflammatory airway disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 1022–1028, 2008.

BEEKMAN, L.; TOHVER, T.; LÉGUILLETTE, R. Comparison of Cytokine mRNA Expression in the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Horses with Inflammatory Airway Disease and Bronchoalveolar Lavage Mastocytosis or Neutrophilia Using REST Software Analysis. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine vet internal medicine**, v. 26, p. 153–161, 2012.

BELING, J. C. F. et al. Post-exercise endoscopic and cytologic diagnosis of equine asthma syndrome in asymptomatic Brazilian pacers. **Equine Veterinary Education**, p. 1–7, 2021.

BIAVA, J. S. et al. Avaliação Clínica E Citológica Do Trato Respiratório De Cavalos Da Raça Quarto De Milha, Após O Exercício. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 60–65, 2006.

BOND, S. L.; HUNDT, J.; LÉGUILLETTE, R. Effect of injected dexamethasone on relative cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage fluid in horses with mild asthma. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2019.

BOSSHARD, S.; GERBER, V. Evaluation of coughing and nasal discharge as early indicators for an increased risk to develop equine recurrent airway obstruction (RAO). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 618–623, 2014.

BRANNAN, J. D.; TURTON, J. A.; The inflammatory basis of Exercise-Induces Brinchoconstriction. **The Physician and sportsmedicine**. v. 38, n. 4, p. 67-73, Dez. 2010.

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.

BUTLER, P. J.; WOAKES, a J.; SMALE, K.; ROBERTS, C. a; HILLIDGE, C. J.; SNOW, D. H.; MARLIN, D. J. Respiratory and cardiovascular adjustments during exercise of increasing intensity and during recovery in thoroughbred racehorses. **The Journal of experimental biology**, v. 179, p. 159–80, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8340728>>.

CARDWELL, J. M.; CHRISTLEY, R. M.; GERBER, V.; MALIKIDES, N.; WOOD, J. L. N.; NEWTON, J. R.; HODGSON, J. L. What's in a name? Inflammatory airway disease in racehorses in training. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 6, p. 756–758, 2011.

CHAMARI, K.; PADULO, J. 'Aerobic' and 'Anaerobic' terms used in exercise physiology: a critical terminology reflection. **Sports Medicine - Open**, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2015.

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.

COTTIN, F.; METAYER, N.; GOACHET, A. G.; JULLIAND, V.; SLAWINSKI, J.; BILLAT, V.; BARREY, E. Oxygen consumption and gait variables of Arabian endurance horses measured during a field exercise test. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. SUPPL. 38, p. 1–5, 2010.

COUETIL, L. L.; CARDWELL, J. M.; GERBER, V.; LAVOIE, J.-P.; EGUILLETTE, R. L.; RICHARD, E. A. Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2016.

COUROUCÉ, a; CHATARD, J. C.; AUVINET, B. Estimation of performance potential of standardbred trotters from blood lactate concentrations measured in field conditions. **Equine veterinary journal**, v. 29, n. 5, p. 365–369, 1997.

COUTO, M.; SILVA, D.; DELGADO, L.; MOREIRA, A.; Exercise and Airway Injury in Athletes. **Acta Médica Portuguesa**. v. 26, n. 1, p 56-60, Jan-Fev. 2013.

DAVIDSON, E. J.; MARTIN, B. B. Diagnosis of upper respiratory tract diseases in the performance horse. **The veterinary clinics**, v. 19, p. 51–62, 2003.

DAVIS, E.; RUSH, B. R. Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis, and patient management. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 18, n. 3, p. 453–467, 2002.

DAVIS, M. S. et al. Cold weather exercise and airway cytokine expression. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 98, n. February 2005, p. 2132–2136, 2005.

DEBRUE, M.; HAMILTON, E.; JOUBERT, P.; LAJOIE-KADOCH, S.; LAVOIE, J. P. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, n. 1–2, p. 25–31, 2005.

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.

DERKSEN, F. J.; ROBINSON, N. E. Overview of the Equine Respiratory System. **International Veterinary Information Service**, 2002. Disponível em: <www.ivis.org>.

DERMAN, K.D.; NOAKES, T.D. Comparative aspects of exercise physiology. In: HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. **The Athletic Horse**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. p. 15-25

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research**. 2. ed. [s.l.] Charlottetown, PEI, 2003.

ENOMOTO, K.; SHIMIZU, R.; KUDO, H. Real-Time Skin Lactic Acid Monitoring

System for Assessment of Training Intensity. **Electronics and Communications in Japan**, v. 101, n. 5, p. 41–46, 2018.

EVANS, D.L.. Training and fitness in athletic horses. Kingston: **Rural Industries Research and Development Corporation**, 2000, 87p.

EVANS, D. L. Physiology of equine performance and associated tests of function. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 4, p. 373–383, 2007.

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

FERNANDES, W.R. **Estudo clínico e da dinâmica de imunoglobulinas séricas e no lavado bronco-alveolar de equinos experimentalmente infectados com herpesvírus equino tipo 1**. Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo. 92p. 2001.

FRANKLIN, S. H.; VAN ERCK-WESTERGREN, E.; BAYLY, W. M. Respiratory responses to exercise in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 6, p. 726–732, 2012.

GERBER, V. et al. Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 491–495, 2003.

GERBER, V.; STRAUB, R.; MARTI, E.; HAUPTMAN, J.; HERHOLZ, C.; KING, M.; IMHOF, A.; TAHON, L.; ROBINSON, N. E. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality : observer and horse variance and relationship to inflammation , mucus viscoelasticity and volume. **Equine veterinary journal**, v. 36, n. 7, p. 576–582, 2004.

HEGEDUS, R. M.; MICHIMA, L. E. S.; SOUZA, V. R. C.; DUTRA, G. H. P.; FERNANDES, W. R.; COELHO, C. S. Evaluation of tracheal wash of horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage treated with furosemide. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 527–529, 2007.

HILLIDGE, C. J.; LANE, T. J.; JOHNSON, E. L.; ASQUITH, R. L. Preliminary investigations of exercise-induced pulmonary hemorrhage in racing quarter horses. **Equine Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 21–23, 1984.

HINCHCLIFF, K. W.; JACKSON, M. A.; BROWN, J. A.; CALLAGHAN, P. A. O.; MCCAFFREY, J. P.; MORLEY, P. S.; RONALD, F.; ANDREW, F. Tracheobronchoscopic assessment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in horses. **AJVR**, v. 66, n. 4, p. 596–598, 2005.

HIRAGA, A.; SUGANO, S. Studies on the exercise physiology of draft horses performed in Japan during the 1950s and 1960s. **Journal of equine science**, v. 28, n. 1, p. 1–12, 2017.

HOFFMAN, A. M. Clinical application of pulmonary function testing in horses.

Lung, p. 29, 2002. Disponível em:

<http://www.ivis.org/special_books/lekeux/hoffman/ivis.pdf?origin=publication_detail>.

HOLCOMBE, S. J. et al. Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. **Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution**, v. 38, n. 4, p. 300–304, 2006.

IVESTER, K. M.; COUETIL, L. L.; ZIMMERMAN, N. J. Investigating the Link between Particulate Exposure and Airway Inflammation in the Horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1653–1665, 2014.

JOUBERT, P.; CORDEAU, M. E.; LAVOIE, J. P. Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages varies with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, n. 3–4, p. 236–242, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.022>>.

KARAGIANNI, A. E. et al. The Effect of Race Training on the Basal Gene Expression of Alveolar Macrophages Derived From Standardbred Racehorses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 75, p. 48–54, 2019.

KOBLINGER, K.; NICOL, J.; MCDONALD, K.; WASKO, A.; LOGIE, N.; WEISS, M.; LÉGUILLETTE, R. Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 5, p. 1118–1126, 2011.

KUKAFKA, D.S.; CICCOLELLA, D.; D'ALONZO, G.E.; et al.; Exercise-Induced Bronchospasm In High School Athletes Via A Free Running Test: **Incidence And Epidemiology. Chest**. v. 114, n. 6, p. 1613-1622, 1998.

KUSANO, K.; CURTIS, R. A.; GOLDMAN, C. A.; EVANS, D. L. Relative Flow-Time Relationships in Single Breaths Recorded After Treadmill Exercise in Thoroughbred Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 8, p. 362–368, 2007.

KUSANO, K.; ISHIKAWA, Y.; SEKI, K.; KUSUNOSE, R. Characteristic of Inflammatory Airway Disease in Japanese. **Journal Equine Science**, v. 19, n. 2, p. 25–29, 2008.

LAVOIE, J.-P.; CESARINI, C.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; MORAN, K.; LUTZ, S.; PICANDET, V.; JEAN, D.; MARCOUX, M. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic Acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 2, p. 322–9, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281348>>.

LECLERE, M.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; LAVOIE, J. P. Heaves, an asthma-like disease of horses. **Respirology**, v. 16, n. 7, p. 1027–1046, 2011.

LÉGUILLETTE, R. et al. Tracheobronchoscopic Assessment of Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage and Airway Inflammation in Barrel Racing Horses. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 30, n. 4, p. 1327–1332, 2016.

LESSA, D. A. B. .; VIANA, E. B. .; ABRAMOVITC, G. .; PAIVA, V. S. .; FERNANDES, W. R. Aspectos citológicos do lavado bronco-alveolar de equinos da polícia militar do estado do rio de janeiro. **Livro de resumos CONBRAVET**, 2002. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/conbravet2002/1444.htm>>.

LESSA, D. A. B.; MORI, E.; VIANA, E. B.; ORLEI, J. dos S.; MOREIRA, J. F. E.; FERNANDES, W. R. Lavado Broncoalveolar Em Eqüinos : Revisão De Literatura Parte 1 : Técnicas de colheita. **Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar**, v. 8, n. 2, p. 213–217, 2005.

LESSA, D. A. B.; MORI, E.; VIANA, E. B.; ORLEI, J. dos S.; MOREIRA, J. F. E.; FERNANDES, W. R. Lavado Broncoalveolar Em Eqüinos : Revisão De Literatura Parte 2 : Achados Citológicos. **Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar**, v. 10, n. 1, p. 31–38, 2007.

MARLIN, J.; ROBERTS, C. A. Qualitative and quantitative assessment of respiratory airflow and pattern of breathing in exercising horses. **Equine Veterinary Education**, v. 10, n. 4, p. 178–186, 1998.

MASON, B. J.; RIGGS, C. M.; COGGER, N. Cohort study examining long-term respiratory health, career duration and racing performance in racehorses that undergo left-sided prosthetic laryngoplasty and ventriculocordectomy surgery for treatment of left-sided laryngeal hemiplegia. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 2, p. 229–234, 2013.

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J.A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERNST, D.; GAUR, A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clin. Immunol.** 110: 252-266. 2004.

MOORE, K.W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.L., O'GARRA, A., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** 19, 683-765. 2001

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.** 7: 145-173. 1989.

PARSON, J.P.; MASTRONARDE, J. G.; Exercise-Induced Bronchoconstriction in Athletes. **Chest.** v. 128, p 3966-3974, 2005.

PADOAN, E.; FERRARESSO, S.; PEGOLO, S.; CASTAGNARO, M.; BARNINI, C.; BARGELLONI, L. Real time RT-PCR analysis of inflammatory mediator expression in recurrent airway obstruction-affected horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 156, n. 3–4, p. 190–199, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.020>>.

PIRIE, R. S. Recurrent airway obstruction: A review. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 3, p. 276–288, 2014.

PORTO, A. C. R. C. et al. Ureia como marcador de diluição em amostras de lavado traqueobrônquico de potros com rodococose 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,

v. 30, n. 9, p. 749–753, 2010.

PRINCE, A.; GEOR, R.; HARRIS, P.; et al. Compararison of the metabolic responses of trained Arabians and Thoroughbreds during high-and low-intensity exercise. **Equine Veterinary Journal** - Equine Exercise Physiology 6, London, v.34, suppl., p.95-99, 2002.

RAPHEL, C. F.; SOMA, L. R. Exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbreds after racing and breezing. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 7, p. 1123–1127, 1982.

REED, S.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. **Equine internal medicine**. second edi ed. [s.l.] Elsevier, 2004.

RIIHIMÄKI, M. et al. Clinical alterations and mRNA levels of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar cells of horses with transient pulmonary eosinophilia. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 52–55, 2008.

RINGMARK, S.; LINDHOLM, A.; HEDENSTRÖM, U.; LINDINGER, M.; DAHLBORN, K.; KVART, C.; JANSSON, A. Reduced high intensity training distance had no effect on VLa4 but attenuated heart rate response in 2-3-year-old Standardbred horses. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 1–13, 2015.

ROBINSON, E. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 5–19, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2746/042516401776767412>>.

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

ROSSI, H. et al. Comparison of Tracheal Wash and Bronchoalveolar Lavage Cytology in 154 Horses With and Without Respiratory Signs in a Referral Hospital Over 2009-2015. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, n. March, p. 61, 2018.

RUNDEL K. W., JENKINSON, D. M.; Exercise induced bronchospasm in the elite athlete. **Sports Med**; v. 32, p. 583–600, 2002

SAD, E. P.; VISCARDI, V.; HESS, T. M.; AUGUSTO, D.; MICHELOTTO, P. V. J.; LESSA, D. A. B. Avaliação endoscópica semiquantitativa de exsudato traqueobrônquico em equinos de equitação. **Revista Acadêmica Ciências Agrarias Ambientais**, v. 10, n. 3, p. 237–241, 2012.

SIDES, R. H.; KIRKPATRICK, R.; RENNER, E.; GOUGH, K.; KATZ, L. M.; EVANS, D. L.; BAYLY, W. M. Validation of masks for determination of $\dot{V}O_{2\max}$ in horses exercising at high intensity. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, n. 1, p. 91–97, 2018.

SILVA, K. M.; OTAKA, J. N. P.; GONÇALVES, A. C. P.; GROSSI, E.; SILVA, A.; ALENCAR, N. X. De; AUGUSTO, D.; LESSA, B. Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage and inflammatory airway disease in polo ponies. **Japanese Society of Equine Science**, v. 28, n. 2, p. 55–59, 2017.

SLOVIS, N. M. **Atlas of equine endoscopy**. 1. ed. St. Louis: mosby, 2004.

SULLIVAN, S. L.; ANDERSON, G. A.; MORLEY, P. S.; HINCHCLIFF, K. W. Prospective study of the association between exercise-induced pulmonary haemorrhage and long-term performance in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 3, p. 350–357, 2015a.

SULLIVAN, S. L.; WHITTEM, T.; MORLEY, P. S.; HINCHCLIFF, K. W. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of furosemide for exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred and Standardbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 3, 2015b.

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, 1992.

SWEENEY, C. R.; SOMA, L. R.; MAXSON A; THOMPSON J; HOLCOMBE, S. J.; SPENCER, P. A. Effects of furosemide on the racing times of Thoroughbreds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 5, p. 772–778, 1990.

TESAROWSKI, D. B.; VIEL, L.; MCDONELL, W. N. Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 8, p. 1214–1219, 1996.

VICCINO, C. **Ocorrência de hemorragia pulmonar induzida por esforço em cavalos de salto no Estado de São Paulo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. doi:10.11606/D.10.2007.tde-27092007-134947. Acesso em: 2021-03-03.

WASKO, A. J.; BARKEMA, H. W.; NICOL, J.; FERNANDEZ, N.; LOGIE, N.; LÉGUILLETTE, R. Evaluation of a risk-screening questionnaire to detect equine lung inflammation: Results of a large field study. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 145–152, 2011.

WOOD, J. L. N.; et.al.,. A longitudinal epidemiological study of respiratory disease in racehorses: disease definition, prevalence and incidence. **Equine infectious diseases VIII**, p. 64–70, 1999.

WOOD, J. L. N.; NEWTON, J. R.; CHANTER, N.; MUMFORD, J. a. Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 236–242, 2005.

Apêndice 1 – Ficha utilizada para o exame físico dos animais

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

Exame geral

Comportamento () normal () deprimido () agitado	Posição () estação () decúbito _____	Assimetria facial () Não () Direita () Esquerda
Escore corporal () 1 a 5	FC _____ bpm FR _____ rpm TPC _____ s	Vacinas: ____ / ____ Herpes 1 Herpes 4 Influenza Outros _____
Pele () urticária () outros _____	Temperatura retal _____ °C	Vermifugo: ____ / ____ -

Alimentação

() ração _____	() feno _____	Ingestão () normal () inapetência () anorexia
() aveia _____	() verde fresco	
() outros _____		

Ambiente

() Pasto	() Cocheira	Odor de urina () ausente () presente () fortemente presente	Poeira () limpa () pouca () muita
	() cama de serragem		
	() outros _____		

Exame respiratório em repouso

Amplitude respiratória	Tipo	Modo	Ruído respiratório
() Normal () Superficial () Profunda	() Normal () Predominância costal () Predominância abdominal	() Eupneia () Dispneia () Inspiratória () Expiratória	() Ausente () Inspiratório () Expiratório () Misto

Mucosa nasal	Muco	Secreção nasal
DIREITA ESQUERDA () Normocorada () Normocorada () Hiperêmica () Hiperêmica	() Normal () Ressecado () Fissuras	DIREITA ESQUERDA () Ausente () Ausente () Serosa () Serosa () Mucosa () Mucosa () Mucopurulenta () Mucopurulenta () Presença de sangue () Presença de sangue () Odor fétido () Odor fétido

Tosse

Espontânea () Presente () Ausente	Reflexo de tosse () Presente () Ausente
Tipo de tosse () Seca () Produtiva () Superficial () Profunda	

Linfonodos

Submandibulares (D) (E) () () Inalterados () () Linfomegalia () () Abcedados	Retrofaríngeos (D) (E) () () Inalterados () () Linfomegalia () () Abcedados
---	--

Exame respiratório em exercício

Ruído respiratório	Secreção nasal	Recuperação após exercício
() Ausente () Inspiratório () Expiratório () Misto	DIREITA ESQUERDA () Ausente () Ausente () Serosa () Serosa () Mucosa () Mucosa () Mucopurulenta () Mucopurulenta () Presença de sangue () Presença de sangue	Tempo de repouso _____ min FC _____ bpm FR _____ rpm () Rápida () Demorada

Ausculata Traqueal	Ausculata Pulmonar	Observações:
() Normal () Aumentada () Crepitação () Sibilo	Crepitação grossa () ausente () presente () direito () esquerdo	<div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; width: 100%;"></div>
	Crepitação fina () ausente () presente () direito () esquerdo
	Sibilo () ausente () presente () direito () esquerdo
	Propagação cardíaca () normal () direito () esquerdo

Percussão

direito esquerdo	() normal () normal () timpânico () timpânico () macio () macio
---	---

Apêndice 2 – Escore clínico proposto por TESAROWSKI et. al. (1996)

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