

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO

**AVALIAÇÃO DO TRATO RESPIRATÓRIO DE
EQUINOS NA MICRORREGIÃO CENTRO-SUL DO
PARANÁ: ASPECTOS CLÍNICOS E
EPIDEMIOLÓGICOS DOS ACHADOS
ENDOSCÓPICOS E CITOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANTONIO SERAFINI FILHO

GUARAUAVA-PR

2019

ANTONIO SERAFINI FILHO

**AVALIAÇÃO DO TRATO RESPIRATÓRIO DE EQUINOS NA
MICRORREGIÃO CENTRO-SUL DO PARANÁ: ASPECTOS CLÍNICOS E
EPIDEMIOLÓGICOS DOS ACHADOS ENDOSCÓPICOS E CITOLÓGICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual do
Centro-Oeste, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias,
área de concentração em Saúde
Animal, para a obtenção do título de
Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Karen Regina Lemos

Co-orientadora: Profa. Dra. Giuliana Gelbcke Kasecker

GUARAUAVA-PR


2019


Antonio Serafini Filho

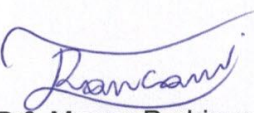
*Avaliação do trato respiratório de equinos na região Centro Sul do Paraná:
Aspectos clínicos e epidemiológicos dos achados endoscópicos e citológicos*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de março de 2019.


Prof^ª. Dr^ª. Karen Regina Lemos
(UNICENTRO)


Prof^ª. Dr^ª. Giuliana G. Kasecker Botelho
(UNICENTRO)


Prof^ª. Dr^ª. Moana Rodrigues França
(FACULDADE CAMPO REAL)

GUARAPUAVA-PR
2019



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 058/2017 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 06 de outubro de 2017.

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: “*Avaliação do trato respiratório de equinos na microrregião Centro- Sul do Paraná: aspectos clínicos e epidemiológicos dos achados endoscópicos e citológicos.*”, protocolo número 031/2017, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição.
2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
 - ~ Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
 - ~ Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
 - ~ **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Profª. Dra. Karen Regina Lemos.
Atenciosamente,

Karen Regina Lemos
Presidente do CEUA

A senhora
Profª. Dra. Karen Regina Lemos.
UNICENTRO-CEDETEG

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força concedida para que mais essa etapa fosse vencida, e por conceder-nos o privilégio de acordar todos os dias em um mundo onde existem CAVALOS.

A minha esposa e companheira Letícia, por me incentivar sempre a seguir em frente, e por fazer parte da minha vida, caminhando ao meu lado.

A meus pais Antonio e Ana, por me darem a oportunidade de seguir meus sonhos, fazendo sempre tudo que estava ao seu alcance para que minha formação pessoal, acadêmica e profissional fosse a melhor possível. Também pelo amor dedicado à minha vida, desde sempre.

A minha irmã Ana Luiza por seu amor e por ser a principal pessoa a compartilhar comigo o amor pelos cavalos.

A Profa. Dra. Karen Regina Lemos, minha querida orientadora, pelo conhecimento cedido, pelas oportunidades dadas, pelo café, pela paciência e pelos ensinamentos de perseverança frente às dificuldades. Inúmeros são os motivos para afirmar que foi um privilégio conviver com a Senhora e ouvi-la durante o decorrer do mestrado.

A Profa. Dra. Sonia Maria Kurchaidt pela disponibilidade de enriquecer nosso trabalho auxiliando nas análises estatísticas.

As colegas de laboratório e de campo Marcia Szymanski Ianoski e Morena Malinowski Mezomo, por toda contribuição prestada, sem a qual não teria sido possível a realização dessa pesquisa.

A Profa. Dra. Giuliana Gelbcke Kasecker por aceitar ser minha co-orientadora e participar da banca, e também aos demais integrantes da banca, Profa. Dra. Moana Rodrigues França, Profa. Dra. Luciana Dalazen Dos Santos e Profa. Dra. Lucia Padilha Cury Thomaz de Aquino por aceitarem acrescentar seu conhecimento ao nosso trabalho.

RESUMO

Antonio Serafini Filho. Avaliação do trato respiratório de equinos na microrregião centro-sul do paraná: aspectos clínicos e epidemiológicos dos achados endoscópicos e citológicos

Esse trabalho mostra que na microrregião de Guarapuava-PR existem equinos utilizados no esporte que apresentam quadros assintomáticos da “Síndrome da asma dos equinos”, podendo resultar em baixo desempenho. Evidencia também que o questionário HOARSI tem correla o com a citologia do lavado traqueal, com a GRADUA O DE MUCO descrita por Gerber et al. (2004) e com o *BREATHING SCORE*, assim como apresenta resultado positivo na identifica o de hemossider fagos através do uso de fita reagente para análise físico-química (fita de urinálise) (BIAVA et al., 2006). Para isso, foram avaliados 20 equinos, através de vídeo-endoscopia do trato respiratório, citologia por meio de citocentrifuga o e posterior colora o pelos métodos de Papanicolaou e Perls, e análise da amostra logo após a colheita por meio de fita de urinálise. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR versão 5.6 (2011), submetidos   análise de variância e compara o de m dias (teste Tukey), sob grau de importância de 5%. Foram utilizadas equa o de regressão para determinar a correla o entre as variáveis, sendo considerada correla o existente quando $R^2 > 70\%$.

Palavras-chave: citologia, HPIE, desempenho, asma.

ABSTRACT

Antonio Serafini Filho. Evaluation of the respiratory tract of horses in the Paraná State's south-central microregion: clinical and epidemiological aspects of the endoscopic and cytological findings

This work introduces that in the Guarapuava-PR microregion there are equines used in sport that present asymptomatic signs of "equine asthma syndrome", which may result in poor performance. It also shows that the HOARSI questionnaire (Lauen et al., 2010) has a correlation with the tracheal lavage cytology, with the MUCO GRADUATION described by Gerber et al. (2004) and the BREATHING SCORE reported by Robinson et al. (2000), as well as a positive result in the identification of hemosiderophages through the use of reagent tape for physicochemical analysis (urinalysis tape) (BIAVA et al., 2006). For this, 20 horses were evaluated through video-endoscopy of the respiratory tract, cytology by means of cytocentrifugation and subsequent staining by the Papanicolaou and Perls methods, and analysis of the sample shortly after collection by means of a urinalysis tape. The data generated were analyzed by the statistical program SISVAR version 5.6 (2011), submitted to analysis of variance and comparison of means (Tukey test), under importance degree of 5%. Regression equations were used to determine the correlation between the variables, being considered a correlation when $R^2 > 70\%$.

Key words: cytology, EIPH, performance, asthma.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aspectos da Síndrome da asma dos Equinos

SUMÁRIO

PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO EM ANIMAIS	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. SÍNDROME DA ASMA DOS EQUINOS.....	11
1.1.1. A INFLAMAÇÃO ASSINTOMÁTICA E O DESEMPENHO.....	11
1.1.2. FISIOPATOLOGIA.....	14
2. ARTIGO SUBMETIDO.....	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAI E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÕES.....	32
3. REFERÊNCIAS.....	33

1.INTRODUÇÃO

A história da humanidade está intimamente relacionada ao cavalo; relatos e achados fósseis sobre essa espécie e seus ancestrais são fartos e nos revelam que desde o período “plioceno”, quando surgiu o gênero *Equus*, esse animal tem servido de fonte de alimento, companhia, transporte, ferramenta de cultivo da terra e aparato bélico, tendo influência incontestável no rumo que nossa sociedade seguiu (CHWAT, 1974).

Dos 113.473.522 equídeos existentes no mundo 58.770.171 são da espécie equina, dos quais 33.594.119 (57,2%) estão nas Américas, sendo motivo de destaque a grande concentração de sua produção e utilização nesse continente em relação aos demais (FAO, 2008). Com aproximadamente 5.600.000 indivíduos, o Brasil possui a quarta maior população equina do mundo (IBGE, 2008) e gera 3,2 milhões de empregos, movimentando por ano mais de 7 bilhões de reais.

Movimentada por esse mercado, a equinocultura passou por um processo de evolução e, visando intensificar a utilização dos animais no esporte, eles são submetidos a sistemas de manejo antinaturais ao seu organismo, expondo-os a desafios fisiológicos constantes, decorrentes da alimentação, do ambiente e do exercício (DITTRICH et al., 2010). Dentre os distúrbios decorrentes desta condução, os que envolvem o trato respiratório estão entre os principais problemas encontrados por clínicos de equinos (ROY e LAVOIE, 2003). Investigações nesse sentido geralmente são motivadas por baixo desempenho, e podem utilizar diversos métodos, como questionários, videoendoscopia e coleta de amostras para análises laboratoriais através de lavados, principalmente em traqueia e brônquios (HOBO et al., 1995; KAISELER et al., 2012; LAUMEN et al., 2010; LANE et al., 2006; MARTIN JR. et al., 1999).

Sabe-se que nos ambientes de estábulo, principalmente onde existe maior quantidade de poeira, a viscosidade e quantidade do muco presente nas vias aéreas podem aumentar. Assim como em humanos, isso pode ser relacionado com a migração de uma grande quantidade de células inflamatórias para o tecido pulmonar, principalmente neutrófilos. Essas células produzem substâncias chamadas secretagogos, como por exemplo, a elastase

e radicais oxidantes, o que justifica o acúmulo de muco (McGORUM et al., 1998; NADEL et al., 1999).

Tanto o acúmulo de muco, quanto a inflamação neutrofílica das vias aéreas são encontrados em animais com obstrução recorrente das vias aéreas – ORVA - (ROBINSON et al., 2000), afecção de caráter crônico, que ocorre geralmente em equinos de idade avançada e cujos sinais clínicos são recorrentes e aparecem mesmo com o animal em repouso (COUETIL et al., 2007).

De natureza mais aguda que a ORVA, a doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) pode acometer animais de qualquer idade, e seus sinais clínicos em repouso são geralmente sutis. Em ambos os casos, o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas devido a um estímulo antigênico parece ocorrer por volta de sete horas após a entrada do animal em um ambiente desfavorável, caracterizando assim um quadro inflamatório nos tecidos pulmonares (FAIRBAIRN et al., 1993).

Ao buscar relação entre a inflamação pulmonar e a hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) pode-se dizer que ambas limitam o desempenho, mas a associação entre uma e outra por vezes é controversa. Queda de desempenho em cavalos de salto, corrida e adestramento parece ter uma ligação a esses problemas, porém, evidências citológicas de inflamação e hemorragia não aparecem concomitantemente todas as vezes que se avalia o material de um aspirado de vias aéreas (COUETIL et al., 2016)

A detecção precoce de problemas respiratórios é essencial para o rápido retorno dos animais ao treinamento, torneios e competições (SANTOS, et al; 2007). Em virtude disso, um exame físico completo, histórico detalhado e técnicas diagnósticas adicionais são importantes para a prevenção da evolução das doenças respiratórias que progridem de forma assintomática (VISCARDI, 2012). Um dos exames diagnósticos eficazes para análise precoce dos distúrbios respiratórios é a endoscopia.

O exame endoscópico é uma ferramenta muito útil na avaliação do trato respiratório dos equinos, sendo rotineiro na vida do cavalo atleta nos últimos tempos. Sua utilização auxilia na determinação da origem de ruídos respiratórios que acompanham, por exemplo, a hemiplegia laríngea e, principalmente, o deslocamento dorsal do palato mole e também auxilia na

localização do ponto de formação de exsudado e hemorragia (SANTOS, et al. 2007). Na avaliação clínica do trato respiratório do equino a endoscopia é um procedimento fundamental para a detecção de alterações morfológicas e/ou funcionais. O exame endoscópico é muito mais eficaz na detecção de processos inflamatórios pulmonares do que o exame físico rotineiro, além de constituir-se ferramenta segura para a investigação clínica e para a pesquisa. No que tange ao trato respiratório posterior, já foram descritas várias classificações que permitem avaliar a presença de exsudado traqueobrônquico de modo semiquantitativo, por meio do exame endoscópico (SAD, et al. 2012).

Outra interessante ferramenta, que permite uma apuração relativamente simples desses problemas, é o questionário epidemiológico HOARSI (horse owner assessed respiratory signs index). Esse método consiste em graduar de 1-4 a severidade do quadro clínico dos animais, através de uma série de perguntas feitas ao proprietário, treinador ou tratador do cavalo (LAUMEN et al., 2010).

1.1. Síndrome da Asma dos Equinos

1.1.1. A inflamação assintomática e o desempenho

Doenças respiratórias são tidas como a segunda maior causa de perda de desempenho atlético em equinos, trazendo consigo o prejuízo econômico. Dentre elas se destacam as doenças inflamatórias que acometem as vias respiratórias posteriores, as quais têm diferentes manifestações, desde uma maneira branda e breve até casos crônicos que comprometem de maneira definitiva a carreira esportiva do animal (BAILEY et al., 1999; ROSSDALE et al., 1985).

É importante levar em consideração que animais atletas comumente apresentam algum grau de inflamação pulmonar, mesmo que sem sintomas. Cerca de 50% dos animais, aparentemente saudáveis e com desempenho atlético satisfatório, podem apresentar sinais de inflamação pulmonar, baseados em achados endoscópicos. Além disso, evidências citológicas como presença de eosinófilos, mastócitos e aumento da quantidade de neutrófilos aparecem nos

lavados traqueobrônquicos de grande parte dos animais que não apresentam nenhuma alteração clínica nem queda de desempenho (BURREL, 1985; SWEENEY et al., 1992).

Um trabalho de revisão realizado por Hodgson e Hodgson (2002) mostra que 65% dos animais sem sinais clínicos, porém com baixo desempenho, apresentam sinais de inflamação na citologia do lavado traqueal. O ponto que separa casos assintomáticos daqueles onde existe doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) é de difícil definição, assim como a relação entre essa afecção e a obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA). Isso torna indispensável o uso de ferramentas diagnósticas específicas na rotina clínica desportiva, antes mesmo que sinais clínicos sejam notados.

Visto que, em boa parte dos casos, as doenças inflamatórias que acometem o trato respiratório posterior apresentam pequena magnitude, identificar corretamente seus sinais clínicos torna-se primordial para um diagnóstico preciso. Tais enfermidades são geralmente divididas de maneira pontual em DIVA e ORVA (HOFFMAN, 1995). Dividindo-se dessa maneira, ORVA define a apresentação clínica de marcada inflamação das vias aéreas posteriores, obstrução, tosse ocasional, dificuldade respiratória em repouso e intolerância ao exercício, sinais esses geralmente reversíveis mediante aplicação de corticosteroides, broncodilatadores ou mudança de ambiente. Essa apresentação, de caráter crônico e recidivante, tende a acometer animais com idade superior a sete anos. Já nos casos de DIVA, que ocorre em animais de qualquer idade, principalmente nos mais jovens, a inflamação e consequente obstrução são menos severas, dificuldade respiratória não é notada em repouso e a capacidade de realizar trabalho não é totalmente afetada como na ORVA (COUETIL et al., 2007, ROBINSON et al., 2003).

Apesar de muitos trabalhos discutirem esse tema baseados nessa divisão, recentemente uma nova analogia começa a ser consenso entre os pesquisadores da área. Devido ao compartilhamento dos sinais clínicos, tendo suas principais diferenças na severidade do acometimento, passa-se a abordá-las como casos variados de uma mesma síndrome. Nos humanos, a “asma” determina casos de inflamação crônica das vias aéreas em pacientes com sintomas respiratórios, tais como tosse, sensação de compressão no peito, amplitude respiratória diminuída e dificuldade expiratória, todos com variável

gravidade. Sendo assim, o termo “síndrome da asma dos equinos” foi sugerido ao descrever a DIVA e a ORVA, retratando os casos brandos e graves segundo o quadro 1.

Quadro 1. Aspectos da Síndrome da asma dos Equinos (COUETIL et al., 2016)

	Síndrome da asma dos equinos	
Parâmetro	DIVA (Casos brandos)	ORVA (Casos graves)
Idade	Animais jovens, mas pode acometer qualquer idade	Usualmente animais com mais de 7 anos
Sinais	Baixa performance, tosse ocasional, sem dispneia em repouso	Intolerância ao exercício, tosse frequente, dispneia em repouso
Tempo de recorrência	Pode se extinguir espontaneamente ou mediante tratamento, decorrendo 4 semanas em média, baixo risco de recorrência	Os sinais duram de semanas a meses após início do tratamento, necessitando mudanças estritas na ambientação para obter melhora, altamente recidivante
Histórico	Animais estabulados, alimentação com feno, casos isolados durante a vida do animal	Animais estabulados, ambiente com muita poeira, alimentação com feno, pode ser sazonal e apresentar predisposição genética
Citologia	Leve aumento de neutrófilos, eosinófilos e ou mastócitos	Severo aumento de neutrófilos

A nova classificação implica que, equinos com os mesmos sinais, como tosse crônica, por exemplo, podem diferir muito com relação à gravidade.

Porém, esses diferentes casos da síndrome não devem ser analisados como uma doença discorrendo continuamente, como se os animais com DIVA desenvolvessem necessariamente ORVA. Muito embora animais com sinais brandos de inflamação pulmonar tenham maiores chances de desenvolver ORVA, um mecanismo fisiopatológico que defina essa transição ainda não foi descrito na literatura. Sabe-se que o tempo de decorrência tem relação positiva com as consequências da ORVA, como por exemplo o remodelamento das vias aéreas e o aumento do tônus da musculatura constritora, mas, mesmo assim, a duração da exposição à situação de estresse isoladamente não converte DIVA em ORVA (BOSSHARD e GERBER, 2014).

1.1.2 Fisiopatologia

A inflamação das vias aéreas posteriores mostra-se como o fator central da síndrome da asma dos equinos, porém o mecanismo pelo qual ela é induzida ainda é pouco estudado. Há evidências de que ela decorra de uma reação não específica, causada pela exposição a agentes pró-inflamatórios provenientes de bactérias, fungos, ácaros, partículas de forragem, componentes inorgânicos da poeira e gases nocivos, inerentes de ambientes de estábulo. Porém poucos animais expostos a tais desafios apresentam a síndrome, por esse motivo a hipótese de que a causa da inflamação seja antígeno-específica, dependendo de um processo alérgico, baseado em fatores intrínsecos do animal não pode ser descartada (SEAHORN et al., 1997). Alguns dos principais eventos que fazem parte desse processo seguem descritos.

Os primeiros a ocorrer são as reações de hipersensibilidade, a reação de hipersensibilidade do tipo I (RH1), tem sua fase inicial ocorrendo por volta de 45 minutos a uma após a inalação do alérgeno, ela começa com a ligação de imunoglobulinas-E (IgE) específicas ao antígeno. Esses complexos se ligam aos mastócitos, através dos receptores FcεRI, ativando-os. A degranulação dos mastócitos leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios, que causam aumento da secreção de muco, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. Esses acontecimentos, de maneira

conjunta, resultam no estreitamento do lúmen das vias aéreas (EDER et al., 2000).

Entretanto, essa resposta inicial não caracteriza um evento clínico, visto que os sinais clínicos da obstrução demoram horas ou até mesmo dias para aparecer. Isso sugere que a resposta dos mastócitos mediada pelas IgE não é o fator predisponente principal (SEAHORN et al., 1997).

Na RH1 também há uma resposta tardia, chamada assim por levar cerca de 6-9 horas para acontecer. Nesse momento, as interleucinas, principalmente IL-4 produzidas pelos mastócitos e pelas células T CD4⁺ promovem a ativação de células do tipo T helper 2 (Th2) cujas citocinas geram aumento da resposta inflamatória e quimiotaxia de neutrófilos. A reação de hipersensibilidade do tipo III (RH3) se deve à deposição de complexos antígeno-anticorpo (IgG ou IgM) nos tecidos pulmonares, e respectiva ativação do sistema complemento pela sua via clássica. O resultado final desse processo (produção do complexo de ataque à membrana) acaba por liberar mais mediadores inflamatórios e potencializar os sintomas (FAIRBAIRN et al., 1993).

A inflamação subsequente tem como característica principal a infiltração de neutrófilos, que se acumulam nos tecidos pulmonares e nas vias aéreas e, assim como os circulantes, são ativados além do normal em casos de ORVA, contribuindo para a broncoespasmo, o acúmulo de muco e o remodelamento (PIRIE et al., 2001; PELIEGRINI et al., 1998).

Algumas citocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos parecem ter papel importante nos animais com asma, a proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e 8 (IL-8) tem nitidamente sua expressão aumentada em animais com asma. Dentre elas, a IL-8 se destaca por ser um fator quimiotático que pode ser produzido por diversas células no pulmão, como os próprios neutrófilos, os macrófagos, as células epiteliais, as células endoteliais e as células da musculatura lisa. Além disso, em humanos a sua presença tem relação direta e positiva tanto com a neutrofilia quanto com o grau de acometimento pulmonar (FRANCHINI et al., 2000; GIGUERE et al., 2000).

Mais de 50 histotoxinas são produzidas pelos neutrófilos, tais como óxido nítrico, substâncias microbidas (mieloperoxidase, lisozima, lactoferrina),

mediadores lipídicos (LTB-4, LTA-4, fator ativador de plaquetas, tromboxano), proteases (elastase, collagenase, metaloproteinase) e espécies reativas de oxigênio, muitas dessas substâncias tem sua síntese exacerbada em animais com ORVA. Os danos tissulares produzidos por elas parecem ter importante relação com a hiperplasia das células epiteliais, bem como a fibrose peribronquial (JOUBERT et al., 2001).

Também são produzidas por eles substâncias pró-inflamatórias potentes, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e MIP-2, retroalimentando o ciclo inflamatório, contribuindo assim para que mais neutrófilos sejam recrutados. Os eventos envolvendo os neutrófilos descritos acima acontecem em qualquer animal exposto ao ambiente impróprio, porém os neutrófilos de animais afetados têm seu nível de ativação maior, assim como sua apoptose atrasada (OLSZEWSKI et al., 1999; TREMBLAY et al., 1993; HOLCOMBE et al., 2001).

Muitas células pulmonares, incluindo as estruturais, participam da modulação inflamatória do pulmão, juntamente com os granulócitos. Destes, as células T (CD4⁺, mais especificamente as células Th2) fazem um importante papel na inflamação, através da produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, assim como as Th1 atuam significativamente na resposta imune celular, através da produção de IL-2 e intérféron- γ (IFN- γ). Cada um desses linfócitos atua mediante estímulos específicos, promovendo o crescimento do seu próprio tipo celular. Sendo assim, logo que uma via de estímulo acontece, a resposta decorrente se inclinará para aquele tipo específico de célula. Todavia, uma grande polarização dificilmente acontece na vida do animal. O que se acredita, é que a proporção balanceada entre Th1 e Th2, ao invés da polarização para um dos lados é um fator importante para a modulação da resposta imune (AGGARWAL e HOLMES, 1999).

Tal polarização indesejada é resultado de uma complexa interação entre as células de defesa e particularidades específicas dos antígenos. Ainda que esse mecanismo não esteja completamente descrito para o pulmão equino, pesquisas realizadas através da cultura *in vitro* de células T CD4⁺, seguida de estimulação alérgica prolongada, resultaram em uma expressão aumentada de mRNA de IL-4 e menos significativa de IL-2. Isso pode significar que, à partir de células Th0, mais células Th2 seriam produzidas em detrimento às do tipo Th1. A expressão do mRNA de citocinas relacionadas às células Th2 também

predominaram em relação às do tipo Th1 quando esse fator foi investigado no lavado bronco-alveolar de pôneis, submetidos à inalação de ovalbumina (BOWLES et al., 2002).

Inflamação das vias aéreas, hipersensibilidade bronquial e obstrução reversível das vias aéreas são características de ORVA em equinos e da asma em humanos. Pesquisas relacionam a asma com perfis predominantes de citocinas correspondentes às células Th2 nas células de lavados bronco-alveolares humanos. Acredita-se que nos casos da síndrome da asma dos equinos aconteça da mesma forma, visto que informações consoantes com isso foram encontradas em pesquisa realizada comparando equinos com ORVA, encerrados por alguns meses, com animais controle. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para afirmar que a polarização na diferenciação dessas células seja uma causa central da asma dos equinos (LAVOIE et al., 2001).

Os macrófagos são uma família de células apresentadoras de antígenos que realizam dano e reparação tissular em vários processos inflamatórios conhecidos através da fagocitose e da produção de numerosas substâncias. No pulmão, eles se dividem em quatro grupos, essa divisão é baseada principalmente na sua localização anatômica, assim, somente os macrófagos alveolares, os quais se encontram presentes nos lavados coletados das vias aéreas têm sido estudados em casos de asma. O macrófagos encontrados nos lavados traqueobrônquicos de animais com asma são mais densos que o normal, isso indica um elevado estado de ativação (TREMBLAY et al., 1993).

O aumento na ativação de uma célula significa que suas atividades metabólicas estão intensificadas, no caso dos macrófagos presentes no pulmão de animais acometidos o resultado disso é a maior produção de IL-1, ânion superóxido, tromboxano B₂, TNF- α , entre outras substâncias que o tornam mais citotóxicos e aumentam a quimiotaxia de neutrófilos para as vias aéreas (JOUBERT et al., 2002).

Os efeitos desses eventos celulares vão, por fim, resultar nas alterações clínicas presentes nos animais doentes. Uma delas é o broncoespasmo, resultado da contração da musculatura lisa das vias aéreas. Quando ocorre expressiva melhora nesse sentido em apenas alguns minutos, mediante

aplicação de broncodilatadores, essa manifestação clínica pode ser considerada como um dos sinais chave da asma. A contração da musculatura lisa dos brônquios é coordenada centralmente pelo sistema nervoso autônomo, por via dos reflexos dos axônios locais, além dessa via, pode ser induzida ou inibida através de receptores presentes nas membranas das suas células, que são sensíveis à vários mediadores inflamatórios. Agentes anticolinérgicos e β -adrenérgicos têm potência de broncodilatação similar, o que leva a crer que o broncoespasmo é coordenado principalmente pelos receptores muscarínicos (ROBINSON, 2002).

Outro achado clínico dessa síndrome é o acúmulo de muco nas vias aéreas, o qual tem relação positiva com a tosse e inflamação neutrofílica. Mesmo várias semanas após a mudança de ambiente, quando os demais sinais clínicos, incluindo inflamação e broncoespasmo, já desapareceram, a graduação de muco permanece mais elevada em animais acometidos de asma do que em animais saudáveis. Essa persistência pode ser um dos motivos pelo qual animais doentes continuam com a capacidade respiratória reduzida quando estão em remissão do quadro clínico (JEFCOAT, 2001).

Tanto quando a doença esta se decorrendo, quanto na fase de remissão, alterações qualitativas e quantitativas ocorrem nos componentes sólidos do muco, aumentando sua liberação e causando espessamento na sua consistência. A consequência é que o acúmulo se agrave pela dificuldade de movimentação do muco nas vias aéreas (GERBER et al., 2000).

Sabe-se que as células epiteliais e musculares sofrem hiperplasia, além disso, os danos teciduais causados pela inflamação geram a substituição dos tecidos que circundam os brônquios por tecido fibroso. Tais fatores, em conjunto, causam a diminuição do lúmen das vias aéreas. O aumento do tônus e da massa da musculatura lisa acentuam a diminuição do lúmen de maneira passiva, pela pressão exercida pelo músculo mais volumoso, e de maneira ativa devido à maior força de contração (ROBINSON, 2002).

Os equinos não necessariamente compartilham todos os atributos dos diferentes estágios da asma humana, mas se tornam um excelente modelo de estudo no processo de remodelamento e principalmente na associação das

respostas celulares e moleculares da asma, partilhando fatores imunológicos e de remodelamento tecidual (BULLONE e LAVOIE, 2015).

2. ARTIGO SUBMETIDO

CORRELAÇÃO DO QUESTIONÁRIO HOARSI (HORSE OWNER ASSESSED RESPIRATORY SIGNS INDEX) E CITOLOGIA TRAQUEAL EM EQUINOS ATLETAS

Serafini Filho, A.; Mezzomo, M.M.; Kasecker, G.K.; Kurchaidt, S.; Lemos, K.R.

RESUMO. O questionário HOARSI (horse owner assessed respiratory signs index) é baseado em respostas dos proprietários sobre performance, presença de tosse, descarga nasal e padrão respiratório dos equinos atletas e varia de grau 1 a 4 e, tem sido utilizado para determinar um diagnóstico presuntivo de doença inflamatória das vias aéreas, síndrome de asma equina em seus variados fenótipos. O lavado traqueal (LT) demonstrou ser uma metodologia adequada para esta correlação e fase inicial da pesquisa, além de facilitar a participação dos proprietários. O sistema de escore HOARSI permitiu classificar 11 equinos controles saudáveis (HOARSI 1), enquanto registros de 4 indivíduos HOARSI 3 e 4 foram consistentes com cavalos afetados pela asma severa. Equinos com sinais clínicos leves e pouco claros de doença respiratória, HOARSI 2 foram 5. Correlação positiva foi estabelecida entre HOARSI e escore de esforço respiratório, bem como presença de neutrófilos e quantificação de muco traqueal.

Palavras-chave: equino, lavado traqueal, citologia, trato respiratório

CORRELATION OF THE HOARSI QUESTIONNAIRE AND TRACHEAL CYTOLOGY IN ATHLETES

Arrumar conforme novo resumo

ABSTRACT. The HOARSI (horse owner assessed respiratory signs index) questionnaire is based on answers about performance, coughing, nasal discharge and respiratory pattern of equine athletes and varies from grade 1 to 4 and has been used to determine a presumptive diagnosis of inflammatory disease of the airways, equine asthma syndrome in its varied phenotypes.

Tracheal lavage (LT) facilitated the adherence of the owners to the project and demonstrated an adequate methodology for this correlation and the initial phase of the epidemiological survey. We obtained consistent results, classifying 11 equines as HOARSI 1, being called healthy controls, whereas HOARSI 3 and 4 consistent with horses affected by severe asthma were in number of 4 individuals. Equine with mild and unclear clinical signs of respiratory disease, HOARSI 2 were 5. Positive correlation was established between HOARSI and respiratory effort, as well as presence of neutrophils and quantification of tracheal mucus.

Key words: horse; tracheal wash; cytology; respiratory tract

Introdução

O questionário HOARSI (horse owner assessed respiratory signs index) é baseado no histórico clínico reportado pelos proprietários e foi desenvolvido como uma caracterização fenotípica para a investigação da genética da obstrução das vias aéreas recorrentes (ORVA), sendo que uma forte predisposição genética foi estabelecida com a manifestação de sinais de doença respiratória crônica das vias aéreas de moderados a severos em associação com o consumo de feno e a idade (JOST et al.2007; RAMSEYER et al.2007; GERBER et al.2009). O questionário HOARSI é baseado em respostas sobre performance, presença de tosse, descarga nasal e padrão respiratório e varia de grau 1 a 4. Sendo que estes representam desde um animal historicamente saudável (grau 1) até um animal de grau 4, severamente afetado (RAMSEYER et al.,2007).

Hotchkiss et al (2006) e Ramseyer et al.(2007) determinaram que questionários para triagem positiva de afecções crônicas de vias aéreas de alto risco apresentam um valor e contexto específico e, tanto o HOARSI como o questionário de rastreio de risco (RSQ) incorporam os dados da história e da apresentação clínica dos animais, sendo a forma de determinar um diagnóstico presuntivo de doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) e ORVA. Estas ferramentas de triagem têm excelente sensibilidade e uma previsão negativa de valores para a detecção de asma severa , porém elas falham na

diferenciação de animal saudável e asma leve (RETTMER et al. 2015; WASKO et al. 2011).

O termo asma eqüina foi proposto como um unificador descritivo de doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas (BOND et al. 2018). Incluindo a doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) como leve a moderada e obstrução das vias aéreas recorrentes (ORVA) como asma equina severa (BARTON;GEHLEN, 2016). Os critérios mínimos de inclusão para participar desta nova nomenclatura são semelhantes aos descritos em humanos; remodelamento das vias aéreas associado a incremento da produção de muco, broncoconstrição, espessamento da parede das vias aéreas e clinicamente incremento de esforço respiratório (GERBER et al. 2004; BULLONE et al. 2017) . Alterações da função pulmonar estão diretamente correlacionadas com o incremento da musculatura lisa, de fibras elásticas e colágeno nas vias aéreas periféricas de equinos com ORVA (Herszberg et al., 2006; Setlakwe et al., 2014)

O aspirado traqueal ou lavado traqueal (LT) é frequentemente obtido pelos veterinários de equinos na investigação de doenças envolvendo o trato respiratório inferior em cavalos de corrida com queda de desempenho (Malikides et al. 2007). LTs são originados das grandes vias áereas, incluindo traqueia, bronquios e porções distais das vias aéreas que alcançaram a traqueia via “clearance” mucociliar (HODGSON,2006).A praticidade da coleta de material via traqueal está diretamente associada ao fato de poder ser executado durante a endoscopia e ser muito bem tolerado pelos animais (Michelotto el al, 2013). Independente da metodologia estabelecida pelo pesquisador ou clínico a importância do resultado da citologia do LT ou LBA para a acurácia do diagnóstico final sempre será determinada pela combinação de histórico, exame clínico, endoscopia das vias aéreas (ROSSI et al. 2018).

A determinação da prevalência de fenótipos de asma nas diferentes populações de equinos, bem como a correlação de tosse, inflamação traqueal, presença e quantificação de muco das vias aéreas, obstrução de vias aéreas distais fazem parte das futuras direções de pesquisa apontadas nas Declarações de Consenso do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) (Couetil et al.2016), sendo assim o principal objetivo deste estudo foi comparar os achados do lavado traqueal de equinos atletas sem

qualquer sinal clínico de doença respiratória com animais descritos pelos proprietários com sinais de tosse ou descarga nasal caracterizadas no HOARSI (1-4).

Material e Métodos

Foram selecionados aleatoriamente 19 equinos atletas de diferentes modalidades, sendo 8 machos e 11 fêmeas, com idade média de 5 anos, variando entre 3 a 16 anos, todos eles em regime estabulado e com alimentação baseada em parte ou totalmente em forragem desidratada (feno). Dos 19 animais avaliados, 17 eram da raça Crioula, 1 Quarto de milha e 1 mestiço. Os animais se encontravam em propriedades de Guarapuava, na microregião centro-sul do Paraná e foram avaliados no período de fevereiro a novembro de 2018. Todos os cavalos foram examinados em seus estábulos.

Foi aplicado, em todas as abordagens, o questionário HOARSI (Tabela 1), segundo metodologia utilizada por Ramseyer et al. (2007) e Josh et al. (2007). As entrevistas foram conduzidas após rigoroso treinamento para dar coerência aos questionamentos. Os escores foram estabelecidos conforme índices descritos na tabela 2. Testes de correlação foram estabelecidos entre os resultados do questionários, sinais clínicos e citologia traqueal.

Todas as avaliações foram realizadas mediante autorização legal assinada pelos proprietários e aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso de Animais da UNICENTRO, sob o protocolo de número 31/2017.

Tabela 1- Questionário HOARSI- Horse owner assessed respiratory signs index

Nome do animal :	Propriedade/Proprietário		
Idade (meses) :	raça	sexo:	tempo na propriedade :
Histórico de vacinação			
Histórico de vermifugação :			
Performance atlética : excelente (4) boa (3) satisfatória (2) pobre (1)			
Tipo de esporte:			
AVALIAÇÃO CLÍNICA			
Escore corporal (0-9):			
Temp.°C :	Mucosas coloração :		
FC :	FR :	Pulso :	
Descarga nasal	Ausente (2)	Presente (1)	
Frequencia de tosse Ausência(4) ocasional (3) regular(2) frequente (1)			

Auscultação respiratória (D)	(E)
Respiração anormal em repouso, durante ou após exercício : ausente (2) presente (1)	
Ocorrência dos sintomas sazonais e combinação de estações possíveis: Não sazonal, primavera, verão, outono, inverno	
Tipo de pastagem:	
Tipo de forragem (CAMA): feno (1) pellets, fibras (2) feno umedecido (3) silagem, capim cortado (4)	
Ambiente interno :Insolação período da manhã (M) tarde (T) adequada (A) inadequada (I)	
Ventilação : adequada (A) inadequada (I)	
Disponibilidade de água: adequada (A) inadequada (I)	
Tempo exterior (pista/pastagem) Nunca/infrequente (1) Frequente/diariamente (2) Constante(3)	
Faz uso de medicamentos (últimas semanas): qual ? quantidade	
Outras observações pertinentes :	
Veterinário coletor dos dados (iniciais)	

Ramseyer et al. (2007) e Josh et al. (2007)

Tabela 2: Índice de sinais respiratórios (HOARSI): sistema de pontuação classificatório para equinos, de acordo com seus sinais clínicos de doença das vias aéreas inferiores.

HOARSI	Sinais Clínicos	Severidade
1	Sem tosse ou descarga nasal	Sem evidências de doença respiratória
2	Descarga nasa, tosse ocasional, ou ambos	Acometimento brando
3	Respiração anormal, tosse regular ou frequente, ou ambos	Problema respiratório moderado
4	Respiração anormal, tosse frequente, acompanhados por baixo desempenho	Doença pulmonar grave

Ramseyer et al. (2007) e Josh et al. (2007)

Exame físico e clínico foram realizados, e com exceção do padrão respiratório, os dados não foram incluídos nos resultados pois foram utilizados somente para exclusão de doenças infecciosas. Os dados de frequência respiratória e cardíaca, pulso, temperatura retal, tempo de preenchimento capilar, coloração de mucosas e palpação dos linfonodos submandibulares foram devidamente registradas em fichas padrão.

O índice de esforço respiratório (ER) é um índice clínico de avaliação que indica o nível de esforço necessário para a respiração e foram atribuídos valores que variaram de 2 a 8, respectivamente caracterizando ausência de sinais a sinais graves. Para o escore de respiração associa-se o componente abdominal da respiração (valores de 1 a 4) e a abertura das aletas nasais em repouso (valores de 1 a 4) (ROBINSON et al. 2000).

Detomidina foi administrada na dose de 0,005 a 0,01 mg/kg IV e após sedação foi feita uma avaliação morfológica visual do trato respiratório, dados não inclusos neste estudo. O aspirado traqueal (AT) foi obtido na porção média da traquéia, durante a avaliação endoscópica das vias aéreas através do canal de biópsia do endoscópio, sem cateter. Foram infundidos 60 mL de solução fisiológica estéril, seguindo-se de sucção com uma seringa descartável e posteriormente transferido para tubos estéreis e acondicionado em caixas de isopor com gelo (0-4°C) e, conduzido imediatamente para as análises no Laboratório.

A avaliação da quantidade de muco seguiu o escore definido por Gerber et al. (2004), figura 1:

- Escore 1: ausência de muco
- Escore 2: pequenas gotas de muco
- Escore 3: gotas de muco maiores e confluentes
- Escore 4: fluxos de muco
- Escore 5: grandes quantidades ou poças de cobertura de muco em todo o diâmetro traqueal

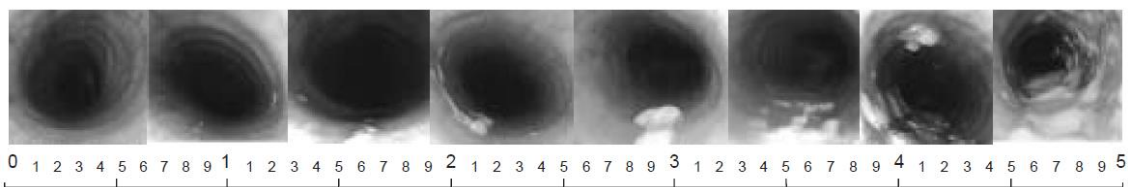


Figura 1. Graduação de muco de grau 1-5 (GERBER et al., 2004).

Para contagem total de células inflamatórias utilizou-se a câmara de Neubauer, sendo o resultado obtido da contagem igual ao número de células x10000/ml. Para citologia, amostras foram submetidas a citocentrifugação (INBRAS ALB 12 CC) a uma velocidade de 1000 rpm/10 min. Coloração pelo método May-Grünwald-Giemsa e Azul da Prússia (Perls) foram realizadas nos esfregaços. Os dados foram expressados em porcentagem do total de células pela contagem de 200 células usando critérios morfológicos padrão (COWELL e TYLER, 2002).

Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR versão 5.6 (2011), submetidos à análise de variância e comparação de médias (teste Tukey), sob grau de importância de 5%. Foram utilizadas equações de regressão para determinar a correlação entre as variáveis (muco, citologia, escore de esforço respiratório versus HOARSI), sendo considerada correlação existente quando $R^2 > 70\%$.

Resultados e Discussão

Este é o primeiro estudo com uma maioria de equinos da raça Crioula, a avaliar criticamente a associação entre sinais relatados pelo proprietário através de um questionário padrão internacional e dados diagnósticos mais objetivos, baseados em citologia traqueal. Diferentes performances de coleta tem sido avaliadas em equinos de corrida (Almeida et al.2018;Michelotto et al, 2013; Rossi et al. 2018), porém poucos estudos de equinos susceptíveis, oriundos desta ferramenta de triagem têm sido desenvolvidos (Ribas et al. 2012; Rettmer et al.;2014; Wasko et al.,2011).

O questionário HOARSI demonstra os sinais clínicos desenvolvidos pelos animais nos piores momentos das observações dos proprietários, variando de 1 a 4, sendo respectivamente, história de ausência de sinais, grau leve, moderado e grave. Nossa população avaliada apresentou resultados que variaram dentro do perfil clínico e ambiental de 1 a 4, sendo HOARSI 1 classificada como controles saudáveis (n = 11), enquanto HOARSI 3 e 4 consistentes com cavalos afetados pela asma severa (n = 4). Indivíduos classificados HOARSI 2 (sinais clínicos leves e pouco claros de doença respiratória) foram 5. O grupo controle consistiu de 06 éguas e 05 machos. O grupo asma severa apresentou 03 éguas e um garanhão. Esta triagem de uma

afecção de alto risco determina a possibilidade de utilizar esta investigação para determinar um valor preditivo deste questionário, como observado por RETTMER et al. (2015); WASKO et al. (2011) pois ele acessa fatores como; manifestações clínicas e desempenho atlético e, tem a possibilidade de uma previsão positiva de valores para a síndrome severa de asma equina. Kawamura (2002) determinou que para isso, seria necessário estabelecer a eficiência deste teste, pois Valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo ser realmente normal. Esta ferramenta ainda não está disponível pois necessitaríamos dos cálculos de sensibilidade, especificidade e prevalência da asma equina em nosso território ou na região Sul pelo menos, para avaliarmos o grau de confiabilidade e eficiência deste questionário em termos epidemiológicos, e dados que não dispomos no Brasil.

O índice de esforço respiratório (ER) determina no HOARSI se a respiração esta normal ou não. Este apresentou correlação positiva ($R^2=0,955$), conforme mostra o gráfico 1. Apresentando valores de 2/8 para equinos HOARSI 1; 3/8 para HOARSI 2, 5/8 para HOARSI 3 e 7/8 para HOARSI 4, determinando que o padrão respiratório anormal em repouso é uma característica da doença ativa e valida a confiabilidade do HOARSI como instrumento epidemiológico.

Nossos animais controles ($n=11$) apresentaram grau 1 de muco, enquanto que os equinos HOARSI 4 demonstraram um acúmulo grau 3. Apesar de não ter sido possível a observação de rinorréia em nenhum dos animais avaliados, durante a videoendoscopia alguns animais apresentaram acúmulo de muco na traqueia, estabelecendo uma correlação positiva com HOARSI, sendo $R^2=0,8973$ (gráfico 2). Segundo Jeffcoat (2001) esse parâmetro tem relação direta com desempenho, e pode estar presente mesmo em fase de remissão da doença. O acúmulo de muco é o mais confiável sistema de escore de doença do aparelho respiratório inferior (Dixon et al.1995) não estando obrigatoriamente vinculada a asma equina, porém Dixon et al. (1995); Christley et al. (2001); Robinson et al. (2003) e McNamara et al. (1990) já descreveram a associação entre pobre performance esportiva e tosse com o acúmulo de muco.

Gerber et al. (2004) afirmaram que uma relação positiva é encontrada entre quantidades excessivas de muco e o aumento da contagem de neutrófilos. Os neutrófilos são responsáveis pela produção e liberação, dentre outras coisas, de substâncias chamadas secretagogos, como por exemplo, a elastase e radicais oxidantes. Esse fato parece justificar o acúmulo de muco em animais afetados (McGORUM et al., 1998; NADEL et al., 1999).

Laumen et al. (2010) desenvolveram um trabalho de pesquisa observando a interação do exame citológico do lavado bronco alveolar com o questionário HOARSI, onde apareceram valores crescentes de porcentagem de neutrófilos para os diferentes graus de acometimento. Os valores encontrados por eles foram de 13,8; 14,3; 17,07 e 41,25, % para HOARSI 1, 2, 3 e 4, respectivamente, enquanto os do presente trabalho foram 8,2; 10,1; 15,7 e 38,2 %. Em nosso estudo, houve diferença estatística entre os valores obtidos para contagem de neutrófilos, os quais também se correlacionaram positivamente com HOARSI (gráfico 3), sua distribuição não foi exatamente linear, por isso R² foi maior em um modelo de regressão polinomial.

O fenótipo celular na DIVA está associada a idade, sendo a eosinofilia mais comum em animais menores de 5 anos de idade, enquanto a neutrofilia é mais frequente em pacientes com mais de 7 anos (COUETIL et al. 2016). Porém em equinos diagnosticados com ORVA, tanto em fase aguda como crônica, a resposta imune é tipicamente Th2, com predomínio de neutrofilia das vias aéreas (Lavoie et al., 2001; BULLONE e LAVOIE, 2014). O aumento do número absoluto de neutrófilos de maneira absoluta resulta em diminuição das porcentagens dos demais integrantes da contagem. Dessa maneira, a porcentagem de macrófagos, mastócitos e eosinófilos foram menores em contraste com o grau de acometimento (dados não demonstrados).

A neutrofilia pulmonar nos equinos se desenvolve entre 5 a 6 horas após exposição aos antígenos e precede o desenvolvimento de obstrução das vias aéreas (Brazil et al., 2005; Fairbairn et al., 1993). Apesar de não termos estabelecidos métodos de correlação entre o tempo no meio ambiente externo e o grau de HOARSI, os dados demonstram que tanto animais estabulados quanto animais diariamente com acesso ao campo ou pista variaram entre 1 e 4 no questionário, porém a grande maioria dos animais tinha o feno como fonte de alimentação. Riihimäki et al (2008) demonstraram que o feno e palha de

baixa qualidade são indutores potentes de inflamação. ito dos 19 animais deste estudo não tinham acesso diariamente ao meio ambiente externo, porém quase todosos estábulos apresentavam condições de insolação e ventilação adequados., . destes oito animais, 5 apresentaram HOARSI 1, 2 foram HOARSI 2 e somente 2 foram HOARSI 3que sendo assim, podemos definir que há fatores adicionais do ambiente que podem contribuir para a inflamação das vias aéreas.

Descarga nasal e tosse ocasional podem representar um risco de desenvolvimento de ORVA e medidas profiláticas como mudanças de ambiente se fazem necessárias para diminuir esta possibilidade, pois um equino com sinais leves, mas persistentes de tosse, deve ser considerado para exame clínicos e exames auxiliares complementares (BOSSHARD: GERBER, 2014).

BOND et al (2017) descreveram que o “fenótipo da asma” tanto humana quanto equina se baseia num grupo de informações clínica, fisiopatológicas, demográficas entre outras, porém não estabeleceram correlação obrigatória entre processos patológicos específicos, mas sugerem que gatilhos antigênicos como poeira, fungo estejam associados ao incremento de neutrófilos e mastócitos no lavado broncoalveolar de equinos com DIVA, assim como lipopolissacarídeos (LPS) e fungos são responsáveis pelo incremento da porcentagem de neutrófilos em pacientes com ORVA, ainda associados com incremento de esforço respiratório.

COUETIL et al (2016) e LAVOIE (2017) propuseram que o termo asma leve ou moderada equina substitua o termo DIVA, bem como asma severa seja utilizado no lugar de ORVA. Estes fenótipos de asma equina são categorizadas ainda como asma alérgica e não alérgica, havendo desta forma, vários fatores a serem considerados para esta subcategorização. Por exemplo, no caso específico dos eosinófilos no LT, um único animal apresentou padrão discrepante de todos os outros. Esse animal era o único dos avaliados a receber alfafa, sendo esse o possível motivo dessa apresentação fora do padrão. Sua contagem de eosinófilos foi de 25%, superando em mais de duas vezes o valor observado em outros animais. Eosinófilos são menos comumente detectados no LBA de equinos, com a exceção de um subgrupo de equinos jovens com DIVA (MCGORUM , DIXON, 1994; HUGHES AL. 2011)

A prevalência de um perfil normal na maioria dos animais avaliados demonstra uma influência do ambiente na população estudada bem como o efeito da alimentação com feno, sendo assim o questionário deve ser utilizado para recomendações práticas do manejo. Opção de coleta de amostras das vias aéreas na traquéia está diretamente associada com a facilidade de acesso, via endoscopia e com a maior colaboração e interesse dos proprietários em realizar uma avaliação do trato respiratório em seus animais. COUETIL et al (2016) estabeleceram que há relação entre neutrofilia e tosse, porém há uma pobre correlação entre performance e citologia traqueal. ALMEIDA et al (2018) consideram que a citologia a partir do lavado traqueal não é específica e que a despeito da facilidade do procedimento, há uma demanda de avaliação complementar, porém ROSSI et al (2018) estabeleceram, em um estudo retrospectivo de 154 equinos com e sem problemas respiratórios, que há uma correlação entre a porcentagem de neutrófilos do LT e LBA et al . Considerando que a neutrofilia das vias aéreas está presente na maioria dos equinos com doença respiratória das vias inferiores e que tanto LT quanto LBA podem detectar esta neutrofilia, Rossi et al (2018) concluíram que o LT é a mais sensível e específica metodologia para estudos nesta população. Santos et al. (1988) e Kohn (2004) citaram inúmeras vezes o lavado traqueal como metodologia na abordagem de paciente equino com tosse, sendo desta foram considerado uma alternativa para nossa realidade et al.

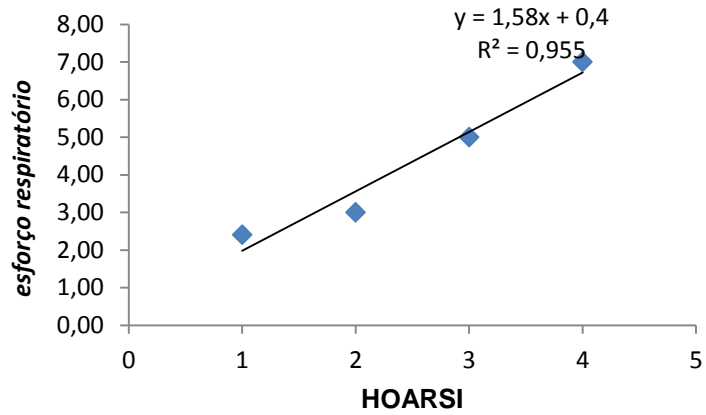


Gráfico 1. Correlação entre esforço respiratório e HOARSI

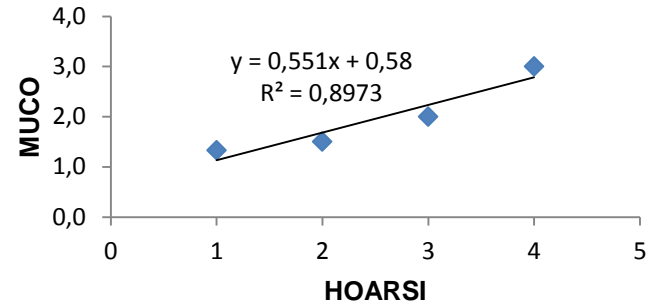


Gráfico 2. Correlação entre gradiente de muco e HOARSI.

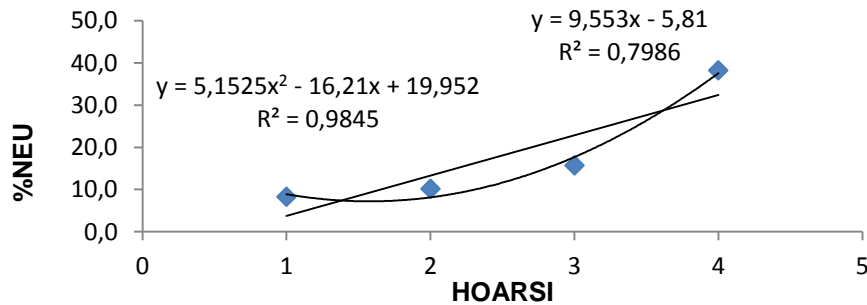


Gráfico 3. Correlação entre % de neutrófilos e HOARSI.

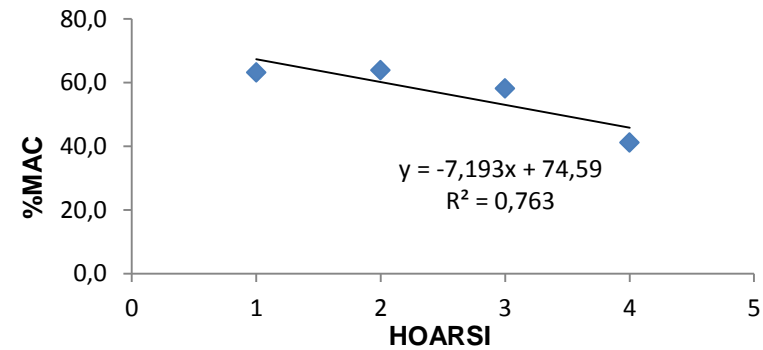


Gráfico 4. Correlação entre % de macrófagos e HOARSI.

Conclusões: Nossos dados demonstraram uma correlação positiva entre a presença de muco e citologia traqueal, especialmente no que se refere a neutrófilos e o grau de comprometimento dos animais determinado no questionário HOARSI. Pesquisa básica epidemiológica estabelecendo a prevalência destas doenças na região e no Brasil, nos diferentes circuitos esportivos seriam importantes para estabelecer este método de coleta de informações como uma ferramenta de valor preditivo negativo.

3. Referências:

AGGARWAL, N.; HOLMES, M. A. Characterisation of equine T helper cells: demonstration of Th1- and Th2 like cells in long- term equine T- cell cultures. **Research in Veterinary Science**, v.66, n. 3, p. 277- 279, 1999.

ALMEIDA, S. R. P.; BASTOS, F. Z.; BARUSSI, F. C. M.; LESSA, D. A. B.; ALENCAR, N. X.; MICHELOTTO, P. V. Airway endoscopy and tracheal cytology of two-year-old Thoroughbred horses during the first year of race training. **Comparative exercise physiology** , v. 14, p. 1-6, 2018

BAILEY, C. J.; REID, S. W. J.; HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. Impact of injuries and disease on a cohort of two- and three-year-old Thoroughbreds in training. **The Veterinary Record**, v. 145, n. 17, p.487-493, 1999

BECVAROVA, I.; PLEASANT, S. R. Clinical Assessment of Nutritional Status and Feeding Programs in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.25, n. 1, p. 1-21, 2009.

BIAVA, J.S.; GONÇALVES, R.C.; DORNBUSCH, P.T.; MICHELOTTO JÚNIOR, P.V.; BIONDO, A.W.; CASSOU, F; ZANOTTO, G.M.; TELLES, J.E.Q. 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.; LÉGUILLETTE, R.; RICHARD, E. A.; COUETIL, L. LAVOIE, JP.; MARTIN, J. G.; SCOTT PIRIE, R. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. **J Vet Intern Med**. v.32, p.1–11, 2018.

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 Veterinary International Medicine**, v. 28, n. 2, p. 618-623, 2014.

BOWLES, K. S.; BEADLE, R. E.; MOUCH, S. A novel model of equine recurrent airway obstruction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 385-389, 2002.

BULLONE, M. Reversibility of Airway Remodeling in Equine Asthma: Contribution of Anti-Inflammatory and Bronchodilator Therapies. Montréal, Québec, Canada: Université de Montréal; 2017.

BULLONE, M., & LAVOIE, J.-P. Asthma “of horses and men”—How can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? **Molecular Immunology**, v.66, p.97–105, 2015.

BURREL, M.H. Endoscopic and virological observation on respiratory in a group of young thoroughbred horses in training. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. 2, p.99-103, 1985.

CHWAT, P. **O mundo dos quadrúpedes**. Ed.: Hemus. São Paulo, p. 32-33, 1974.

CLARK, C.K.; LESTER, G.D.; VETRO, T.; RICE, B. Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. **Australian Veterinary Journal**, v.72, n.7, p249-252, 1995.

COSTA, L. R. R.; JOHNSON, J R.; SWIDERSKI, C. H. Managing Summer Pasture- associated Obstructive Pulmonary Disease, an Asthma-like Disease of Horses. Department of Clinical Sciences at Mississippi State University and Equine Health Studies Program at Louisiana State University<<https://aaep.org/horsehealth/managing-summer-pasture-associated-obstructive-pulmonary-disease-asthma-disease-horses>>2016.

COUËTIL, L.; CARDWELL, J.; GERBER, V.; et al. Inflammatory airway disease of horses—revised consensus statement. **J Vet Intern Med**, v.30, p.503-515, 2016.

COUETIL, L.L.; CARDWELL, J.M.; GERBER, V.; LAVOIE, J.P.; LEGUILLETTE, R.; RICHARD, E.A. Inflammatory airway disease of horses – revised consensus statement. **J. Vet. Intern. Med.**, V.30, p.503-515, 2016.

COUETIL, L.L.; CARDWELL, J.M.; GERBER, V.; LAVOIE, J.P.; LÉGUILLET, R.; RICHARD E.A. Inflammatory airway disease of horses - Revised consensus statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.30, n.2, p.503-515, 2016.

COUETIL, L.L.; HOFFMAN, A.M.; HODGSON, J.; BUECHNER-MAXWELL, V.; VIEL, L.; WOOD, J.L.N.; LAVOIE J.P. Inflammatory Airway Disease of Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, n.2, p.356-361, 2007.

COUETIL, L.L.; ROSENTHAL, F.S.; DENICOLA, D. B.; CHILCOAT, C. D. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. **Am. J. Vet. Res.** V.62, p.538-546, 2001.

DITTRICH, J.R.; MELO, H.A.; AFONSO, A.M.C.F.; DITTRICH, L. Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1, p.130-137, 2010.

EDER, C. C.; CRAMERI, R.; MAYER, C. Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n 3-4, p. 241-253, 2000.

EPPINGER, M. Hemorragia pulmonar de esforço e o desempenho de eqüinos PSI {Equus caballus} em corridas de galope no Jockey Club do Paraná. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

FAIRBARN S.N.; PAGE C.P.; LEES P.; CUNNINGHAM F.M. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lung of allergic following antigen exposure. **Clinical & Experimental Allergy**, v.23, n.10, p.821-828, 1993.

FERREIRA, D. F. SisVar® (Software Estatístico): sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.6, Lavras: DEX/UFLA, 2011.

Food and Agriculture Organization - FAO. United Nations, 2008.

FRANCHINI, M.; GILL, U.; VON FELLEBERG, R. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. **American Journal of Veterinary Research**, v.11, n.61, p. 1369-1374, 2000.

GERBER, V.; LINDBERG, Å.; BERNEY, C.; ROBINSON, N. E. Airway mucus in recurrent airway obstruction—short-term response to environmental challenge. **J. Vet. Internal Med.** v.18, p.92-97, 2004.

GERBER, V.; SCHOTT, H.C. II; ROBINSON, N.E. Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. **Equine Vet. J.** v.43, p.153–158, 2011.

GERBER, V.; STRAUB, R.; MARTI, 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.

GIGUERE, S.; VIEL, L.; LEE, E. Cytokine messenger RNA (mRNA) expression in bronchoalveolar cells from normal horses and horses with heave, and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. **18th Annual Veterinary Medical Forum**, v. 4, n. 85, p. 147- 148, 2000.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 4, n. 15, p. 571-576, 1983.

HERSZBERG, B.; RAMOS-BARBON, D.; TAMAOKA, M.; MARTIN, J.G.; LAVOIE, JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. **J Allergy Clin Immunol**. v.118, p.382-388, 2016

HOBO, S.; MATSUDA, Y.; YOSHIDA, K. Prevalence of upper respiratory tract disorders detected with a flexible videoendoscope in thoroughbred racehorses. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.57, n.3, p.409-413, 1995.

HODGSON, J.L.; HODGSON, D.R. Inflammatory Airway Disease. In: LEKEUX, P. (Ed.) Equine respiratory disease. Inthaca: International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/hodgson/chapter_frm.asp?LA=1> Acesso em: 29 ago.2018.

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

HOLCOMBE, S. J.; JACKSON, C.; GERBER, V. Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, n. 33, p. 244- 249, 2001.

HOTCHKISS, J.W.; REID S.W.; CHRISTLEY, R. Construction and validation of a risk-screening questionnaire for the investigation of recurrent airway obstruction in epidemiological studies of horse populations in Great Britain. **Prev Vet Med**. v.75, p.8-21, 2006.

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

HUGHES, K.J.; NICOLSON, L.; DA COSTA, N.; et al. Evaluation of cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. **Vet Immunol Immunopathol**. v.140, p.82-89, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE.

Produção da pecuária municipal, 2008. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/>>

JEFCOAT, A. M.; HOTCHKISS, J. A.; GERBER, V. Persistent mucin glycoprotein alteration in equine recurrent airway obstruction. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.281, n. 3, p. C704-712, 2001.

JOUBERT, P.; SILVERSIDES D. W.; LAVOIE, J. P. Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor- alpha, interleukin (IL)-beta, IL-6, IL-8, macrophage- inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon-gamma. **Equine Veterinary Journal**, v. 7, n. 33, p. 730- 733, 2001.

KAISELER, P.H.; DZYEKANSKI, B.; SCHIEFELBEIN, R.; SILVEIRA, R.G.; PIMPÃO, C.T.; MICHELOTTO JR, P.V. Upper airway evaluations of thoroughbred racehorses in a private clinic in Curitiba, Brazil – resting endoscopic findings in 587 horses. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.4, p.1-9, 2012.

LANE, J.; BLADON, B.; LITTLE, D.; NAYLOR, J.R.J.; FRANKLIN, S.H. Dynamic obstructions of the equine upper respiratory tract. Part 1: Observations during high-speed treadmill endoscopy of 600 Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v.38, n.5, p.393-399, 2006.

LAUMEN, E.; DOHERR M.G.; GERBER, V. Relationship of horse owner assessed respiratory signs index to characteristics of recurrent airway obstruction in two Warmblood families. **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.2, p.142-148, 2010.

LAVOIE J-P. Which is the most appropriate in 2017: "Mild to Severe Equine Asthma" or heaves, RAO, equine COPD, IAD, tracheal IAD, bronchial IAD, small airway disease, chronic bronchitis, SPACOPD, SPOPD, summer heaves

or summer RAO? World **Equine Airway Symposium**. Vol 6. Copenhagen, Denmark: University of Copenhagen, 2017.

LAVOIE, J. P.; MAGHNI, K. DESNOYERS, M. Neutrophilic airway inflammation in horses with heave is characterized by a Th2-type cytokine profile. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 8, n. 164, p.1410-1413, 2001.

LESSA, D. A. B. Doença das Vias Aéreas (DIVA) em equinos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: estudo clínico e da atividade macrofágica alveolar. **Tese (doutorado)**- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós- Graduação: Clínica Veterinária, 2003.

MAHAFFEY, E. A.; COWELL, R. L.; TYLER, R. D. Cytology and hematology of the horse. **Cytology and hematology of the horse**, 1992.

MARTI, E.; GERBER, V.; WILSON, A.; et al. Report of the 3rd Havemeyer workshop on allergic diseases of the horse. **Vet. Immunol Immunopathol**. v.126, p.351-361, 2008.

MARTIN JR., B.; REEF, V.; PARENTE, E.; SAGE, A.D. Clinical evaluation of poor training or racing performance in 348 Horses (1992–1996). In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, Albuquerque, 1999. **Proceedings**...Albuquerque: American Association of Equine Practitioners, 1999.

MCGORUM, B.; DIXON, P. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. **Equine Vet Educ**. v.6, p.203-209, 1994.

MCGORUM, B.C.; ELLISON, J.; CULLEN, R.T. Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. **Equine Veterinary Journal**, v.30, n.5, p.430-434, 1998.

MICHELOTTO JR., P. V.; LESSA, D. A. B.; DA SILVA, K. M.; GAWLOWSKI, K. R. S.; FERNANDES, W. R. The airway fluid analysis: methods and interpretation for the athletic horse. **R. bras. Ci. Vet.** v.20, p.1-5, 2013.

NADEL, J.A.; TAKEYAMA, K.; AGUSTI, C. Role of neutrophil elastase in hypersecretion in asthma. **European Respiratory Journal**, v.13, n.1, p.190-196, 1999.

OLSZEWSKI, M. A.; ROBINSON, N. E.; ZHU, F. X. Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airway. **American Journal of Physiology**, v. 3, n. 276, p. 522-529, 1999.

PELLEGRINI, A.; KALKINIC, M.; HERMANN, M. Equine neutrophils: quantification in tracheobronchial secretion as an aid in diagnosis of chronic pulmonary disease. **Veterinary Journal**, v. 5, n. 155, p. 257-262, 1998.

PIRIE R.S. RAO/SPAOAD - severe equine asthma? **World Equine Airway Symposium**. Vol 8. Copenhagen, Denmark: University of Copenhagen; 2017.

PIRIE, R. S.; DIXON, P. M.; COLLIE, D. D. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, n. 33, p. 311- 318, 2001.

RAMSEYER, A.; GAILLARD, C.; BURGER, D.; et al. Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. **J Vet Intern Med.** v.21, p.149-156, 2007.

RETTMER, H.; HOFFMAN, A. M.; LANZ, S; OERTLY, M; and GERBER, V. Coughing and nasal discharge in equine recurrent airway obstruction. **Equine Vet J**, v.47: p.291-295, 2015. doi:10.1111/evj.12286

RETTMER, H.; HOFFMAN, A.; LANZ, S.; OERTLY, M.; GERBER, V. Owner-reported coughing and nasal discharge are associated with clinical findings,

arterial oxygen tension, mucus score and bronchoprovocation in horses with recurrent airway obstruction in a field setting. **Equine Vet J.** v.47, p.291-295, 2015.

RICHARD, E.; FORTIER, G.; DENOIX, J.M.; et al. Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. **Equine Vet. J.** v.41, p.384-389, 2009.

ROBINSON, N. E. International workshop on equine chronic airway disease. Michigan State University 16-18 June 2000. **Equine Vet J.** v.33, p.5-19, 2001.

ROBINSON, N. E.; JACKSON, C.; JEFcoat, A. Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 17-22, 2002.

ROBINSON, N. E.; OLSZEWSKI, M. A.; BOEHLER, D. BERNEY, C.; HAKALA, J.; MATSON, C.; DERKSEN, F. J. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 5, p. 393-400, 2000.

ROBINSON, N.E. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease, Michigan State University 16–18 June 2000. **Equine Vet. J.** v.33, p.5–19, 2001.

ROBINSON, N.E.; BARNEY, C.; EBERHART, S.; L. DEFEIJTER-RUPP, H.; M. JEFcoat, A.; J. CORNELISSE, C.; M. GERBER, V.; J. DERKSEN, F. Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n. 5, p. 550-557, 2003.

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

ROY, M.F.; LAVOIE, J.P. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. **The Veterinary Clinics Equine Practice**, v.19, n.1, p.1-17, 2003.

SAD, E.P.; VISCARDI, V.; HESS, T.M. SILVA E.G.A.; PEDRO JUNIOR, V.M.; LESSA, D.A.B. Avaliação endoscópica semiquantitativa de exsudato traqueobrônquico em equinos de equitação. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 237-241, jul./set. 2012.

SANTOS, L.C.P.; JUNIOR, PEDRO ,V.M; KOZEMJAKIN, D.A. achados endoscópico e citológico das vias respiratórias De potros puro sangue inglês em início de treinamento no jóquei clube do Paraná. **Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v.10, n.1, p. 9-13, jan./jun. 2007.

SEAHORN, T. L.; BEADLE, R. E.; MCGORUM, B. C. Quantification of antigen-specific antibody concentration in tracheal lavage fluido f horses with summer pasture- associated obstructive pulmonary disease. **American Journal of Veterinary Reserch**, v. 58, n. 12, p. 1408-1411, 1997.

SETLAKWE, E.L.; LEMOS, K.R.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; DUGUAY, J.D.; LAVOIE, JP. 2014. Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v.307, p.252-260, 2014.

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

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

VISCARDI, V. Determinação da atividade da fosfatase alcalina no lavado traqueal de eqüinos da Policia militar do Estado do Rio de Janeiro.

[Dissertação]. **Mestrado em clínica e reprodução da Universidade Fluminense**. Rio de Janeiro, 2012.50fl.

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