

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO VICENTE MICHELOTTO JÚNIOR

**EFEITOS DO DESAFIO AMBIENTAL E DO EXERCÍCIO NA FUNCIONALIDADE
DOS MACRÓFAGOS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR DE CAVALOS PURO
SANGUE INGLÊS DE CORRIDA**

CURITIBA

2010

PEDRO VICENTE MICHELOTTO JÚNIOR

**EFEITOS DO DESAFIO AMBIENTAL E DO EXERCÍCIO NA FUNCIONALIDADE
DOS MACRÓFAGOS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR DE CAVALOS PURO
SANGUE INGLÊS DE CORRIDA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, área de concentração: Fisiologia; Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Anita Nishiyama

CURITIBA

2010

A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho
original.

Albert Einstein

**Obrigado Senhor, por na dificuldade
carregar-me no colo, pela Sua
presença constante mesmo nos
momentos mais tranqüilos, e por
conceder-me mais esta benção.**

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha esposa Ana Lúcia e aos meus filhos João Pedro e Bernardo, com todo o meu amor.

Aos cavalos, por me ensinarem tanto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir-me concluir mais esta etapa em minha vida.

A minha esposa Ana Lúcia e meus filhos João Pedro e Bernardo, que estiveram ao meu lado desde o início desta jornada, souberam me dar tranqüilidade e muito amor, além de levarem pizza no laboratório nos dias de experimento.

Aos meus pais, Pedro, Maria, Luis e Zelma, pelos exemplos que vocês são e por todo o amor e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos Marcus e André, cunhados Cristine, Dani e Luiz Gustavo, sobrinhas Mariana e Júlia, pela amizade e torcida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Anita Nishiyama, sobretudo pela amizade e incentivo, sendo orientadora nos momentos certos, sempre com muita competência.

Aos meus colegas médicos veterinários e amigos, Alessandro Mercadante, Daniel Mendes Campos, Fernando Perche e Luis Henrique Costa, pelo apoio prestado na execução deste trabalho, permitindo a avaliação de potros sob sua responsabilidade.

Aos estabelecimentos que me apoiaram e suas equipes de funcionários sempre prestativos: Haras Belmont, Haras Cifra, Haras Santa Rita da Serra, Haras dos Girassóis, Haras Palmerini, Haras Santarén.

Aos treinadores que me apoiaram, permitindo a avaliação dos potros sob sua responsabilidade, extensivo às suas respectivas equipes de funcionários: Fernando Azevêdo, Beto Feltran, Gladston Santos, J César, A A Farias, Marcus Lanza.

À incansável equipe de colheitas de lavado broncoalveolar, que em momento algum deixou de madregar nos 22 experimentos conduzidos: Lorena Andrade da Cruz, Renata Schaefer, Lívia Medalha Araújo, Amine do Vale Meira, Fabiana Tieme da Silva, Mariana Müller da Silva, Aline Bonfá, Richard.

A maravilhosa equipe, da qual tive a felicidade de conhecer e trabalhar: Luis Alexandre Muehlmann MS, Fernanda Ceccon Grandó MS, Ana Lúcia Zanatta, Carolina Farias, Gabriela Rubbo, Eloyse Bieberbach, Ana Cláudia e Victor. Vocês me deram a amizade e o prazer de trabalhar com vocês, me ensinaram muito e valorizaram o verdadeiro sentido de equipe, com simplicidade, determinação e muita competência.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR, companheiros de pós-graduação, de dúvidas, de buscas pelas respostas, de risadas e de conquistas, muito obrigado pela amizade, ajuda e muita paciência: Fabíola, Éverson, Ricardo, Carine, Loli, Sandro, Gleisson, Marcelo, Jaison, Isabela, Diogo, Paulo, Dalton, Gina, Daniele Pequito.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pela inestimável oportunidade de poder trabalhar no seu laboratório, disponibilizando material necessário, e seu tempo quando o solicitei.

A minha amiga e sócia, médica veterinária MS Cassiana Maria Garcez Ramos.

Aos meus amigos, da Direção do Curso de Medicina Veterinária da PUCPR, Profa. Dra. Cláudia Turra Pimpão e Prof. Rodrigo Távora Mira, por todo o apoio, incentivo e amizade incondicionais.

Aos amigos professores da PUCPR Rita M Rocha, Denise Kozemjakin, Antonia Maria, Marconi Farias, pelo apoio.

Ao Decano do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da PUCPR, Prof. Dr. Sylvio Péllico Neto, pelo apoio e incentivo.

Ao Professor Metry Bacila, por tantos exemplos demonstrados e por nunca haver se omitido em ajudar e entusiasmar.

As bibliotecárias da UFPR pela ajuda, e também da PUCPR, Lucieli e Teresinha, e equipe.

A amiga Monica Echeverria, pela amizade e apoio no inglês, nesta e em muitas outras oportunidades. Thank you.

Ao Laboratório Fort Dodge, pelo apoio me fornecendo os sedativos e pela dedicação dos competentes profissionais Alessandra, Carol e Leonardo, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Ao amigo Nilton Reis, companheiro de trabalho na Unidade Hospitalar para Equinos da PUCPR, pelo apoio.

Aos amigos do Regimento de Polícia Montada Coronel Dulcídio, pela amizade e apoio durante esta etapa, Coronel Heraldo Régis Bório da Silva, Major Lorival da Cunha Sobrinho, Major Márcio Luis Fonseca, Capitão Adilar Marcelo de Lima e à equipe do Centro Veterinário da PMPR, Sargento Fátima, Sd Manassés e demais amigos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XI
LISTA DE TABELAS	XV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS	18
1.2 DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS (DIVA)	18
1.3 PAF E VIAS AÉREAS	23
1.4 MUCO E INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS	27
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO NAS VIAS AÉREAS E EXERCÍCIO	29
1.6 HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO (HPIE)	34
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVOS GERAIS	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 REAGENTES E SEDATIVOS	41
3.2 ANIMAIS	41
3.3 ASPECTOS ÉTICOS	43
3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA	43
3.5 AVALIAÇÃO ENDOSCÓPICA DAS VIAS AÉREAS	43
3.6 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	45
3.7 AVALIAÇÃO CITOLÓGICA DO LBA	46
3.8 EXTRAÇÃO LIPÍDICA TOTAL DAS CÉLULAS DO LBA (FOLCH ET AL., 1957)	47
3.9 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES (PMN) DE EQUINOS	48
3.10 MENSURAÇÃO DO INFLUXO DE Ca^{++} EM PMNS INDUZIDO POR PAF (BIOATIVIDADE DE PAF) (MARATHE ET AL., 2001)	48
3.11 CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS DO LBA (BRADFORD, 1976)	51
3.12 CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS DO LBA (STUEHR E MARLETTA, 1985)	51
3.13 CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS DO LBA (NOUROOZ-ZADEH ET AL., 1994)	52
3.14 ATIVIDADE DA CATALASE NAS CÉLULAS DO LBA (AEBI, 1984)	53

3.15 FAGOCITOSE DE MACRÓFAGO ALVEOLAR (DYRYNDA ET AL., 1998)	54
3.16 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR (DYRYNDA ET AL., 1998):	54
3.17 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂) POR MACRÓFAGO ALVEOLAR (PICK E MIZEL, 1981):.....	55
3.18 ADESÃO DE MACRÓFAGO ALVEOLAR (ROSEN E GORDON, 1987)	56
3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4 RESULTADOS	59
4.1 PRIMEIRA ETAPA DO ESTUDO	59
4.1.1 Avaliação Clínica.....	59
4.1.2 Avaliação Endoscópica das Vias Aéreas	60
4.1.3 Citologia do Aspirado Traqueal (AT)	61
4.1.4 Colheita do Lavado Broncoalveolar (LBA)	62
4.1.5 Contagem do Número Total de Células Nucleadas (NTCN) e Contagem Diferencial de Células do LBA	62
4.1.6 Resposta de Neutrófilos do Sangue de Equino Frente ao PAF	63
4.1.7 Resposta de Macrófago Alveolar de Equino Frente ao PAF	65
4.1.8 Bioatividade de PAF no Extrato Lipídico das Células do LBA	67
4.1.9 Concentração Total de Proteínas no LBA	68
4.1.10 Concentração de Nitritos no LBA	69
4.1.11 Concentração de Hidroperóxidos Lipídicos nas Células do LBA:.....	70
4.1.12 Atividade da Catalase nas Células do LBA	71
4.1.13 Fagocitose de Macrófago Alveolar	72
4.1.14 Produção de Ânion Superóxido por Macrófago Alveolar	73
4.1.15 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) por Macrófago Alveolar	74
4.2 SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO	75
4.2.1 Contagem do Número Total de Células Nucleadas (NTCN) e Contagem Diferencial de Células do LBA	75
4.2.2 Bioatividade de PAF no Extrato Lipídico das Células do LBA	76
4.2.3 Concentração Total de Proteínas no LBA	77
4.2.4 Concentração de Nitritos no LBA	78
4.2.5 Concentração de Hidroperóxidos Lipídicos nas Células do LBA.....	79
4.2.6 Fagocitose de Macrófago Alveolar	80
4.2.7 Produção de Ânion Superóxido por Macrófago Alveolar (O ₂ ⁻)	80
4.2.8 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) por Macrófago Alveolar	81
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
AT	Aspirado traqueal
CN	Grupo Condições Naturais
DA	Grupo Desafio Ambiental
DIVA	Doença inflamatória das vias aéreas
DIVAI	Doença inflamatória das vias aéreas inferiores
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EX	Grupo Exercício
HAIE	Hipoxemia arterial induzida pelo exercício
HPIE	Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício
HRPO	<i>Horse radish peroxidase</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-8	Interleucina-8
IL-9	Interleucina-9
IL-17	Interleucina-17
LBA	Lavado broncoalveolar
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil ester
LTB4	Leucotrieno B4
LTE8	Leucotrieno E8
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NTCN	Número total de células nucleadas
ORVA	Obstrução recorrente das vias aéreas
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAF-AH	Fator de ativação plaquetária acetilhidrolase
PAF-R	Receptor de fator de ativação plaquetária
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PMN	Polimorfonuclear

PRS	<i>Phenol red solution</i>
PSI	Puro sangue inglês
RNS	Espécie reativa do nitrogênio
ROS	Espécie reativa do oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
Th2	Linfócitos T helper 2
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – VALORES DE PAO ₂ (MÉDIA ±SD) DURANTE QUATRO ETAPAS DE UM TESTE PADRÃO EM ESTEIRA DE ALTA VELOCIDADE....	20
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA FOSFATIDILCOLINA, FOSFOLIPÍDIO PRECURSOR DO PAF, CONTENDO UM ÉTER LIGADO A POSIÇÃO SN-1 DO ESQUELETO DE GLICEROL	24
FIGURA 3 – RESUMO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR EM RESPOSTA AO PAF, NO PULMÃO DE RATOS.....	25
FIGURA 4 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ROS) E SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	30
FIGURA 5 – MECANISMOS LEVANDO A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA ASMA.....	31
FIGURA 6 – PRINCIPAIS FONTES DE OXIDANTES NAS CÉLULAS.....	32
FIGURA 7 – ELETROMICROGRAFIAS DA BARREIRA ALVÉOLO-CAPILAR (BAC) DE PULMÕES DE CAVALOS, FIXADOS POR PERFUSÃO A 25 (A) E 100 mmHg (B-D).....	35
FIGURA 8 – TRÊS FORÇAS AGEM NA BARREIRA ALVÉOLO-CAPILAR (BAC).....	36
FIGURA 9 – HIPÓTESE PARA A PATOGÊNESE DA HPIE SEGUNDO DERSKEN et al. (2009).....	38
QUADRO 1 – GRADUAÇÃO DA PRESENÇA DE FOLÍCULOS LINFÓIDES NA FARINGE.....	44
QUADRO 2 – GRADUAÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO DAS CARTILAGENS ARITENÓIDES DE I A IV.....	44
FIGURA 10 – GRADUAÇÃO DE 0 a 5 PARA A QUANTIDADE DE MUCO TRAQUEAL OBSERVADA DURANTE O EXAME ENDOSCÓPICO.....	45
FIGURA 11 – REGISTRO DA FLUORESCÊNCIA CAUSADA PELO INFLUXO DE Ca ⁺⁺ EM CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES (PMN) DE EQUINOS (2,25 x 10 ⁶ CÉLULAS PMN/mL SUSPENSÃO), MENSURADA COMO RELAÇÃO 340:380 nm COM EMISSÃO REGISTRADA A 510 nm.....	50

- FIGURA 12** – ADESÃO DE MACRÓFAGO ALVEOLAR EM MICRO PLACA ACRÍLICA DE 96 POÇOS UTILIZANDO CORANTE DE GIEMSA A 0,2%..... 57
- FIGURA 13** – FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021..... 63
- FIGURA 14** – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021..... 64
- FIGURA 15** – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021..... 64
- FIGURA 16** – FAGOCITOSE DE MACRÓFAGO ALVEOLAR DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021..... 65
- FIGURA 17** – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021..... 66
- FIGURA 18** – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021..... 66
- FIGURA 19** – BIOATIVIDADE DE PAF NO EXTRATO LIPÍDICO DAS CÉLULAS DO LBA DOS POTROS DOS GRUPOS CN (n=10), DA (n=10) E EX (n=10), MENSURADA ESPECTROFLUOROMETRICAMENTE PELO INFLUXO DE Ca⁺⁺ EM CÉLULAS PMN DE EQUINOS E EXPRESSADA COMO RELAÇÃO 340:380nm..... 67

- FIGURA 20** – GRÁFICO DEMONSTRANDO A BIOATIVIDADE DE PAF NO EXTRATO LIPÍDICO DAS CÉLULAS DO LBA DE UM POTRO DO GRUPO EX, NA AUSÊNCIA (●) E NA PRESENÇA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021 (□), MENSURADA ESPECTROFLUOROMETRICAMENTE PELO INFLUXO DE Ca⁺⁺ EM CÉLULAS PMN DE EQUINOS E EXPRESSADA COMO RELAÇÃO 340:380nm..... 68
- FIGURA 21** – CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS DO LBA DOS GRUPOS CN (n=25), DA (n=26) E EX (n=31), MENSURADA A PARTIR DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS OBTIDO APÓS A PRIMEIRA CENTRIFUGAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO DO LBA.....69
- FIGURA 22** – CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS NO LBA PARA OS GRUPOS CN (n=22), DA (n=23) e EX (n=16) MENSURADO A PARTIR DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS OBTIDO APÓS A PRIMEIRA CENTRIFUGAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO DO LBA.....70
- FIGURA 23** – CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS DO LBA DOS GRUPOS CN (n=14), DA (n=11) e EX (n=11), MENSURADO NO EXTRATO METANÓLICO DAS CÉLULAS DO LBA..... 71
- FIGURA 24** – ATIVIDADE DA CATALASE NAS CÉLULAS DO LBA DOS GRUPOS CN (n=10), DA (n=7) e EX (n=10)..... 72
- FIGURA 25** – FAGOCITOSE DE MACRÓFAGO ALVEOLAR NOS GRUPOS CN (n=14), DA (n=13) e EX (n=15)..... 73
- FIGURA 26** – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR NOS GRUPOS CN (n=11), DA (n=9) e EX (n=14)..... 74
- FIGURA 27** – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR NOS GRUPOS CN (n=19), DA (n=14) e EX (n=15)..... 75
- FIGURA 28** – BIOATIVIDADE DE PAF NO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=11) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=6), HPIE NEG (n=5) e EX NORMAL (n=4)..... 76
- FIGURA 29** – CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS NO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=28) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=13), HPIE NEG (n=12) E EX NORMAL (n=8)..... 77
- FIGURA 30** – CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS NO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=22) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=12), HPIE NEG (n=10) E EX NORMAL (n=7)..... 79

- FIGURA 31** – CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS DO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=17) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=9), HPIE NEG (n=8) E EX NORMAL (n=5)..... 80
- FIGURA 32** – ESTÃO DEMONSTRADOS A PRODUÇÃO BASAL DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DOS POTROS DO GRUPO EX (n=14) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=10), HPIE NEG (n=5) E EX NORMAL (n=5), BEM COMO A PRODUÇÃO DE $O_2^{\cdot-}$ ESTIMULADA POR PMA (EX e, HPIE POS e, HPIE NEG e, EX NORMAL e).....81
- FIGURA 33** – ESTÃO DEMONSTRADOS A PRODUÇÃO BASAL DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DOS POTROS DO GRUPO EX (n=15) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=11), HPIE NEG (n=6) E EX NORMAL (n=5), BEM COMO A PRODUÇÃO DE H_2O_2 ESTIMULADA POR PMA (EX e, HPIE POS e, HPIE NEG e, EX NORMAL e)..... 82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– PRINCIPAIS INDICADORES DE EXAME CLÍNICO PARA OS TRÊS GRUPOS AVALIADOS DE POTROS PURO SANGUE INGLÊS DE CORRIDA.....	59
TABELA 2	– DISTRIBUIÇÃO DOS FOLÍCULOS LINFÓIDES FARINGIANOS OBSERVADOS POR EXAME ENDOSCÓPICOS E GRADUADOS DE I A IV.....	60
TABELA 3	– OBSERVAÇÃO ENDOSCÓPICA DOS MOVIMENTOS DAS CARTILAGENS ARITENÓIDES.....	60
TABELA 4	– QUANTIDADE DE SECREÇÃO TRAQUEAL OBSERVADA ATRAVÉS DE EXAME ENDOSCÓPICO, NOS POTROS PURO SANGUE INGLÊS DOS GRUPOS CN, DA E EX DURANTE AVALIAÇÃO EM REPOUSO, E GRADUADA DE 0 a 5.....	61
TABELA 5	– CONTAGEM PERCENTUAL DOS PRINCIPAIS TIPOS CELULARES NO ASPIRADO TRAQUEAL (AT) DOS GRUPOS CN (N=20), DA (N=19) E EX (N=15).....	61
TABELA 6	– CONTAGEM DO NTCN E CONTAGEM PERCENTUAL DOS DIFERENTES TIPOS CELULARES DO LBA DOS GRUPOS CN (n=45), DA (n=40) E EX (n=34).....	63
TABELA 7	– CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS NUCLEADAS E CONTAGEM PERCENTUAL DOS PRINCIPAIS TIPOS CELULARES NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) DO GRUPO EX E DOS SUBGRUPOS HPIE POS, HPIE NEG E EX NORMAL.....	76

RESUMO

A doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) e a hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) são comuns em cavalos de corrida, resultando em interrupção no treinamento. A hipótese do presente estudo foi de que o ambiente e o exercício causam estresse oxidativo, produção do fator de ativação plaquetária (PAF) e inflamação nas vias aéreas de potros PSI de corrida, e que há uma relação entre a DIVA e a HPIE. Estudou-se potros PSI em ambiente natural (NC, n=45), estabulados por 30 dias (DA, n=40) e treinados (EX, n=34). Após, os potros do grupo EX foram divididos em três subgrupos: HPIE pos (presença de hemossideróforos no lavado broncoalveolar - LBA), HPIE neg (ausência de hemossideróforos no LBA) e EX normal (ausência de hemossideróforos no LBA e menos de 5% de neutrófilos e menos de 1% de eosinófilos no LBA). Avaliou-se perfil citológico e parâmetros do LBA relacionados a estresse oxidativo, bioatividade de PAF, atividade da catalase e função de macrófago alveolar (MA). Os percentuais de neutrófilos e eosinófilos no LBA do grupo EX foram maiores ($5,4 \pm 1,1\%$ vs. $0,9 \pm 0,2\%$ $P < 0,001$ e $1,5 \pm 0,7$ vs. $1,2 \pm 0,1$ $P < 0,05$, respectivamente) que os limites superiores para cavalos normais (5% para neutrófilos e 1% para eosinófilos), juntamente com um maior número total de células nucleadas ($45,6 \pm 2,8$ vs. $34,3 \pm 2,4$ células/ μL de LBA $P = 0,017$), evidenciaram a ocorrência de inflamação pulmonar. A bioatividade de PAF e a concentração de proteínas no LBA foram maiores no grupo EX (relação 340:380 nm $0,068 \pm 0,02$ vs. $0,006 \pm 0,002$ $P = 0,017$, $0,36 \pm 0,06$ vs. $0,14 \pm 0,03$ mg de proteínas/mL de LBA $P < 0,001$). A concentração de hidroperóxidos no LBA foi maior no grupo DA ($104,7 \pm 24,1$ vs. $35,2 \pm 8,4$ nmoles/mg de proteínas, $P < 0,001$) e a atividade da catalase foi maior no grupo EX ($0,24 \pm 0,05$ vs. $0,06 \pm 0,01$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas, $P = 0,002$). A fagocitose de MA ($P = 0,006$) bem como a produção de ânion superóxido ($P < 0,001$) e peróxido de hidrogênio ($P = 0,006$) foram significativamente menores no grupo EX. Vinte e três (62,2%) potros do grupo EX foram HPIE pos, e o LBA desse subgrupo apresentou concentração de proteínas ($0,39 \pm 0,08$ vs. $0,19 \pm 0,04$ mg de proteínas/mL de LBA, $P = 0,031$), bioatividade de PAF (relação 340:380 nm $0,180 \pm 0,05$ vs. $0,043 \pm 0,02$, $P = 0,042$) e concentração de hidroperóxidos lipídicos ($36,7 \pm 9,3$ vs. $6,2 \pm 2,0$ nmoles /mg de proteínas, $P = 0,009$), significativamente maiores que o subgrupo HPIE neg. A concentração de nitritos ($0,08 \pm 0,03$ vs. $0,12 \pm 0,07$ absorvância 550 nm, $P = 0,049$) e a atividade de MA foi menor em comparação com o subgrupo HPIE neg. O ambiente e o exercício modificaram o fluido broncoalveolar, confirmando a hipótese do presente estudo. Houve aumento da resposta de MA induzida pelo ambiente, enquanto o exercício físico resultou em HPIE, inflamação pulmonar e diminuição na resposta imune inata relacionada aos macrófagos alveolares, nos potros PSI jovens durante o treinamento para corrida, e o PAF esteve presente nesse processo. Sugere-se a condução de novas investigações para elucidar os mecanismos inflamatórios da HPIE, bem como o papel do PAF neste processo, como um potencial alvo terapêutico.

Palavras-chave: cavalo; fator de ativação plaquetária; hemorragia pulmonar; inflamação pulmonar; fluido broncoalveolar.

ABSTRACT

Inflammatory airway disease (IAD) and exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) are common in racehorses during training, being important ailments interrupting training of thoroughbred racehorses. The present study hypothesis was that stabling and exercise cause oxidative stress, release of platelet-activating factor (PAF) and inflammation in airways of Thoroughbred colts, and that there is an association between IAD and EIPH. The subjects were colts in breeding farms (NC, n=45), stabled for 30 days (EC, n=40) and race trained (EX, n=34). Colts of the EX group were subdivided into three subgroups: EIPH pos (presence of hemosiderophages in BALF), EIPH neg (absence of hemosiderophages in BALF) and Normal EX (absence of hemosiderophages and less than 5% neutrophils and 1% eosinophils in BALF). Cytological profile and parameters of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) related to oxidative stress, bioactivity of the pro-inflammatory mediator PAF, catalase activity, and alveolar macrophage (AM) activity were studied. Percentages of neutrophils and eosinophils in the BALF of the EX group were higher ($5.4 \pm 1.1\%$ vs. $0.9 \pm 0.2\%$ $P < 0.001$ and 1.5 ± 0.7 vs. 1.2 ± 0.1 $P < 0.05$, respectively) than the upper limits for normal horses (5% of neutrophils and 1% of eosinophils), that associated with a significantly higher total nucleated cell count (45.6 ± 2.8 vs. 34.3 ± 2.4 cells/ μ L of BALF $P = 0.017$), displayed pulmonary inflammation. PAF bioactivity and the total protein concentration in the BALF were higher in the EX group (0.068 ± 0.02 vs. 0.006 ± 0.002 340:380nm ratio $P = 0.017$, 0.36 ± 0.06 vs. 0.14 ± 0.03 mg of proteins/mL of BALF $P < 0.001$). Concentration of BALF hydroperoxides was higher in the EC group (104.7 ± 24.1 vs. 35.2 ± 8.4 nmoles/mg of proteins $P < 0.001$) and catalase activity was higher in the EX group (0.24 ± 0.05 vs. 0.06 ± 0.01 μ mol H_2O_2 /min/mg of proteins $P = 0.002$). AM phagocytosis ($P = 0.006$) as well as production of superoxide anion ($P < 0.001$) and hydrogen peroxide ($P = 0.006$) were significantly lower in EX group. Twenty three (62.2%) colts of the EX group were EIPH pos, and the BALF of this subgroup presented a significantly higher protein concentration (0.39 ± 0.08 vs. 0.19 ± 0.04 mg of proteins/mL of BALF $P = 0.031$), PAF bioactivity (0.18 ± 0.05 vs. 0.043 ± 0.02 340:380 nm ratio $P = 0.042$) and lipid hydroperoxide concentration (36.7 ± 9.3 vs. 6.2 ± 2.0 nmoles / mg of proteins $P = 0.009$), as well as lower nitrite concentration (0.08 ± 0.03 vs. 0.12 ± 0.07 absorbance 550 nm $P = 0.049$) and AM activity than EIPH neg subgroup. Environment and exercise modified the bronchoalveolar fluid, confirming the hypothesis of the present study. Environment increased AM response, as exercise resulted in EIPH, pulmonary inflammation and decreased innate immune response of alveolar macrophages, in young Thoroughbred horses during race training, and PAF participated in this event. Further studies should be conducted to better understand the inflammatory mechanisms of EIPH, and the role of PAF in this process, as a potential therapeutic target.

Keywords: horse; platelet-activating factor; pulmonary hemorrhage; pulmonary inflammation; bronchoalveolar fluid.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

As doenças respiratórias são comuns nos cavalos, e as condições a que estão sujeitos fazem com que a inflamação seja uma manifestação freqüente dessas afecções. O epitélio das vias aéreas superiores e dos pulmões estão expostos a patógenos invasores e fatores ambientais. Portanto, o conhecimento dos mecanismos da resposta inflamatória nas vias aéreas se faz importante, a fim de se estabelecer estratégias para reduzir o impacto e os danos causados (THACKER, 2006).

A inflamação das vias aéreas apresenta um agravante, o papel dos pulmões na troca gasosa. Assim, as quatro principais conseqüências de um processo inflamatório desencadeado nas vias aéreas, incluem: vasodilatação e a redução no fluxo sanguíneo, resultando em capilares ingurgitados; o aumento da permeabilidade capilar, permitindo a passagem de fluído e células para os tecidos; o influxo e acúmulo de fagócitos e células ativadas no local; e a bronconstrição (LUNN et al., 2007).

O estudo das doenças respiratórias em cavalos é relevante, particularmente nos cavalos jovens de corrida onde a taxa de inflamação detectada nas vias aéreas é significativa (CHRISTLEY e RUSH, 2007).

1.2 DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS (DIVA)

Os termos “doença inflamatória das vias aéreas” (DIVA) e “doença inflamatória das vias aéreas inferiores” (DIVAI), têm sido usados para descrever uma síndrome inflamatória do trato respiratório de cavalos de corrida (CHRISTLEY e RUSH, 2007).

Tem-se relatado que a DIVA ocorre em 11% a 50% dos cavalos de corrida em treinamento, chegando a afetar até 80% dos cavalos de corrida de dois anos de idade (CHRISTLEY e RUSH, 2007). MALIKIDES (2003) estudou a prevalência da DIVA em cavalos de corrida na Austrália, evidenciando que 41% deles apresentaram inflamação das vias aéreas após duas semanas de iniciarem treinamento.

A DIVA é considerada a segunda afecção mais comum a interromper o treinamento para corridas (WILSHER et al., 2006), podendo resultar em prejuízos a troca gasosa e diminuição da capacidade atlética (COUËTIL e DENICOLA, 1999; SÁNCHEZ et al., 2005).

Cavalos com DIVA ou com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) apresentaram uma maior hipoxemia arterial induzida pelo exercício (HAIE) (CHRISTLEY et al., 1997; COUËTIL e DENICOLA, 1999; SÁNCHEZ et al., 2005) (FIGURA 1).

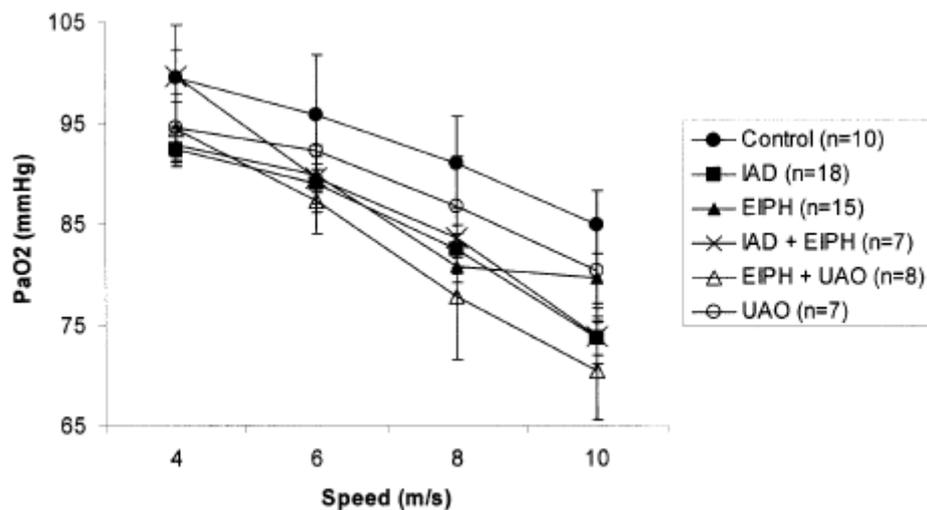


FIGURA 1 – VALORES DE PAO₂ (MÉDIA ±SD) DURANTE QUATRO ETAPAS DE UM TESTE PADRÃO EM ESTEIRA DE ALTA VELOCIDADE. EIPH, HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO; IAD, DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS; UAO, OBSTRUÇÃO DAS VIAS AÉREAS SUPERIORES. FONTE: SÁNCHEZ et al. (2005).

Cavalos trotadores de corrida, diagnosticados com DIVA, tiveram a mecânica pulmonar (volume corrente, frequência respiratória, ventilação pulmonar, duração da inspiração e da expiração, complacência dinâmica) alterada, apresentaram um significativo aumento da carga ventilatória e da energia requerida para a respiração, sofrendo restrições em seu rendimento atlético (PIRRONE et al., 2007).

Contudo, a inflamação das vias aéreas dos cavalos atletas não é entendida por completo, especialmente pela falta de consistência e precisão na definição dessa síndrome (CHRISTLEY e RUSH, 2007).

Recentemente, um painel de discussão promovido pelo *American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM), definiu que a DIVA pode ocorrer em cavalos de qualquer idade e é caracterizada pelo seguinte fenótipo (COUËTIL et al., 2007):

- Baixo rendimento desportivo, intolerância ao exercício;
- Tosse, com ou sem quantidade excessiva de muco traqueal;
- Inflamação não séptica, detectada pela avaliação citológica do fluido do LBA ou disfunção pulmonar baseada em evidência de obstrução de vias aéreas inferiores, hiperresponsividade das vias aéreas, ou prejuízo a troca gasosa durante o repouso ou exercício.

Este painel, formado por experts e pesquisadores da área, propôs também alguns fatores de exclusão para a DIVA:

- Evidência de sinais sistêmicos de infecção (febre, alterações hematológicas compatíveis com infecção);
- Aumento do esforço respiratório durante o repouso.

A etiopatogenia da DIVA é pouco definida. Acredita-se que uma variedade de fatores de risco estejam envolvidos, variando nas diferentes populações de cavalos baseado na alimentação, manejo, práticas preventivas, distribuição de agentes infecciosos e influências genéticas (COUËTIL et al., 2007).

Alguns autores encontraram uma redução da incidência desta afecção em cavalos mais velhos (BURRELL et al., 1996; CHAPMAN et al., 2000; CHRISTLEY et al., 2001; WOOD et al., 2005), sendo que a idade não provocou diferença no estudo de McKANE et al. (1993).

O ambiente da cocheira representa um risco adicional para a DIVA nos cavalos (BURRELL et al., 1996; HOLCOMBE et al., 2001; CLEMENTS e PIRIE, 2007; BERNDT et al., 2008), bem como para a inflamação das vias aéreas das pessoas envolvidas no trabalho com os cavalos (ELFMAN et al., 2009).

HOLCOMBE et al. (2001) associaram o manejo de estabulação com a ocorrência de inflamação nas vias aéreas inferiores. Estudaram 14 potros árabes, que foram transferidos da pastagem para cocheiras com cama de palha. Após 90 dias de estabulados, houve um aumento no número percentual de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA). Cavalos estabulados em cama de palha também apresentaram maior chance de apresentar DIVA em outros estudos (BURRELL et al., 1996; WOODS et al., 1993).

No entanto, em cavalos de montaria no estado norte-americano de Michigan, foi a permanência em piquetes durante o inverno que esteve associado com aumento do acúmulo de muco traqueal com maior número de neutrófilos. Neste

estudo, a alimentação com feno também representou risco para a ocorrência de inflamação (ROBINSON et al., 2006).

Contudo, o ambiente de cocheiras em modelos convencionais de manejo, aos quais os cavalos em treinamento estão submetidos, reconhecidamente apresenta riscos para as vias aéreas. Nestes, há aumento nas concentrações de partículas inaláveis, contendo partículas orgânicas e inorgânicas, incluindo endotoxinas, β -D-glucan, partículas ultra finas (<100 nm de diâmetro), microorganismos, esporos de fungos, material vegetal, poeira inorgânica e gases tóxicos (COUËTIL et al., 2007) . Recentemente, no estudo de BERNDT et al. (2008), se demonstrou que o ambiente de cocheira apresenta uma concentração de endotoxinas 8 vezes maior que nos piquetes.

Além disso, há muito já foi descrita a presença de actinomicetos termofílicos, como a *Micropolyspora faeni*, nos fenos fornecidos aos cavalos, capazes de serem inalados atingindo as vias aéreas inferiores (McPHERSON e THOMSON, 1983). Assim, a prática de encharcar o feno antes da administração, para diminuir a quantidade de poeira disponível, resultou em benefício às vias aéreas dos cavalos (CLEMENTS e PIRIE, 2007).

Por outro lado, a participação das bactérias na etiopatogenia da DIVA ainda não está bem esclarecida. Cavalos com sinais clínicos de inflamação das vias aéreas apresentaram maior frequência de isolados bacterianos nos estudos de CHRISTLEY et al. (2001) e WOOD et al. (2005) apesar de o painel do ACVIM entender que a participação das bactérias na etiopatogenia da DIVA precisa ser melhor estudada (COUËTIL et al., 2007).

O exercício também tem sido associado à inflamação das vias aéreas inferiores dos cavalos atletas (McKANE et al., 1993; COUËTIL e DENICOLA, 1999; SÁNCHEZ et al., 2005). A prevalência da DIVA é maior em cavalos em treinamento que em cavalos do mesmo grupo, mas sem treinamento, talvez pela inalação de maiores quantidades de partículas, pela exposição das vias aéreas inferiores ao ar frio ou pela ocorrência da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (DAVIS et al., 2006; CHRISTLEY e RUSH, 2007).

O diagnóstico da DIVA inclui a história e o exame físico detalhados, para a identificação de potenciais fatores etiológicos. A tosse durante o exercício ou durante a alimentação constitui a queixa mais comum (CHRISTLEY e RUSH, 2007), esteve associada à presença de quantidades aumentadas de secreção traqueal bem

como a um maior percentual de neutrófilos tanto na secreção traqueal (CHRISTLEY et al., 2001) como no LBA (BENEDICE et al., 2008), mas sua ausência não descarta o diagnóstico da DIVA (COUËTIL et al., 2007).

A presença de descarga nasal mucopurulenta é achado comum em cavalos de corrida de dois anos de idade, sendo menos comum em cavalos mais velhos. Sua relação com a DIVA, todavia, não é sabida (COUËTIL et al., 2007).

A auscultação torácica durante o repouso raramente evidencia alterações em cavalos atletas com inflamação das vias aéreas inferiores (MAZAN e HOFFMAN, 2003; CHRISTLEY e RUSH, 2007; COUËTIL et al., 2007), sendo necessária a utilização de uma sacola para o cavalo respirar no seu interior, ampliando o esforço respiratório (*'rebreathing bag'*), podendo tornar audíveis alguns sons anormais em certos casos (MAZAN e HOFFMAN, 2003; COUËTIL et al., 2007).

MAZAN e HOFFMAN (2003) relataram que os testes de função pulmonar, como o pneumotacógrafo e o teste de broncoprovocação com histamina, podem auxiliar tornando o diagnóstico da DIVA definitivo. Contudo, o diagnóstico precoce da inflamação das vias aéreas inferiores deve enfatizar a avaliação citológica do LBA e não os testes de função pulmonar (COUËTIL et al., 2007).

A avaliação citológica do AT também tem contribuído ao diagnóstico dos processos inflamatórios das vias aéreas, contudo não é considerado suficiente para o diagnóstico da DIVA. Isto se deve a falta de concordância entre os achados citológicos do AT e do LBA, e da falta de estudos associando os achados no AT e o rendimento atlético (HODGSON e HODGSON, 2003; HUGHES et al., 2003; COUËTIL et al., 2007). Ainda, um cuidado a ser levado em conta quando da realização de AT, é o tempo da colheita, já que a realização de exercício esteneuante pode aumentar o percentual de neutrófilos na amostra obtida (MALIKIDES et al., 2007).

O LBA, por sua vez, é o método para a obtenção de amostras de células presentes nas vias aéreas mais distais e espaço alveolar (HOFFMAN, 1999; FERNANDES et al., 2000; LESSA et al., 2005), considerado como uma biópsia líquida (MAZAN e HOFFMAN, 2003), sendo a técnica de avaliação citológica preferida para o diagnóstico da DIVA (COUËTIL et al., 2007).

Um aumento no percentual de células inflamatórias no fluido do LBA é um dos principais critérios diagnósticos para a DIVA. Usualmente ocorre uma predominância de neutrófilos, mas também pode ocorrer aumento nos números percentuais de

eosinófilos, linfócitos e mastócitos, normalmente associados com diminuição no rendimento desportivo e hiperresponsividade das vias aéreas (McKANE et al., 1993; HARE e VIEL, 1998; CHRISTLEY e RUSH, 2007; COUËTIL et al., 2007).

O perfil citológico de LBA mais comumente encontrado em cavalos com DIVA, é caracterizado por aumento no número total de células nucleadas (NTCN) com discreta neutrofilia (>5%), linfocitose e monocitose. Também pode ser encontrado um aumento do número percentual de eosinófilos (>0,1%) e mastócitos (>2%) (HOFFMAN, 1999; COUËTIL et al., 2007).

O painel de estudo da DIVA promovido pelo ACVIM, apontou direções para as pesquisas nesta área, e dentre elas, o estudo das citocinas e mediadores inflamatórios envolvidos no processo (COUËTIL et al., 2007).

Sabe-se que ocorre um incremento da imunidade inata nas vias aéreas dos cavalos estabulados, com o envolvimento de IL-6 (RIIHIMÄKI et al., 2008a). Em cavalos trotadores de corrida em treinamento, ocorre uma eosinofilia transitória no fluido broncoalveolar e um aumento da expressão de IL-4 e IL-5, contudo não foi encontrada correlação entre estes eventos (RIIHIMÄKI et al., 2008b).

Dentre os mediadores químicos participantes do processo inflamatório nas vias aéreas, o PAF (*platelet-activating factor*) está especialmente implicado na asma, sepse e injúria pulmonar aguda (THACKER, 2006), presente também na fisiopatologia da obstrução recorrente das vias aéreas em cavalos mais velhos (FAIRBAIRN et al., 1996). Contudo, a participação do PAF no processo inflamatório nas vias aéreas de cavalos atletas ainda não é conhecida.

1.3 PAF E VIAS AÉREAS

O fator de ativação plaquetária (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline) é um potente mediador pró inflamatório envolvido na angiogênese, aterosclerose, anafilaxia, cicatrização, inflamação, apoptose e endotoxemia (MARATHE et al., 2001; STAFFORINI et al, 2003; OWEN et al., 2005). O PAF é produzido por eosinófilos, macrófagos alveolares, neutrófilos, plaquetas e células endoteliais (BAKER et al., 2002; STAFFORINI et al, 2003; GAUDREAUULT et al, 2005; SUMITA et al, 2005), a partir de uma subclasse específica de fosfatidilcolina que contém um éter, ao invés de um éster, ligado a posição *sn*-1 do esqueleto de glicerol (FIGURA

2). A fosfatidilcolina é o mais abundante fosfolípido presente nas membranas biológicas (MARATHE et al., 2001; OWEN et al., 2005).

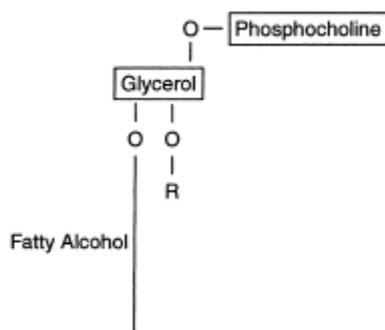


FIGURA 2 – ESTRUTURA DA FOSFATIDILCOLINA, FOSFOLÍPIDIO PRECURSOR DO PAF, CONTENDO UM ÉTER LIGADO A POSIÇÃO sn-1 DO ESQUELETO DE GLICEROL. FONTE: MARATHE et al. (2001).

O PAF também está envolvido numa variedade de funções pulmonares, como por exemplo, no tônus vascular e das vias aéreas, na frequência de movimentação dos cílios e na permeabilidade endotelial, causando um aumento da secreção de fluido traqueal, broncoconstrição, edema e hiperresponsividade das vias aéreas, resultando em prejuízos a troca gasosa (CLAVIJO et al., 2001; GABRIJELCIC et al., 2003; ISHII et al., 2004; GÖGGEL e UHLIG, 2005; SHIBAMOTO et al., 2008).

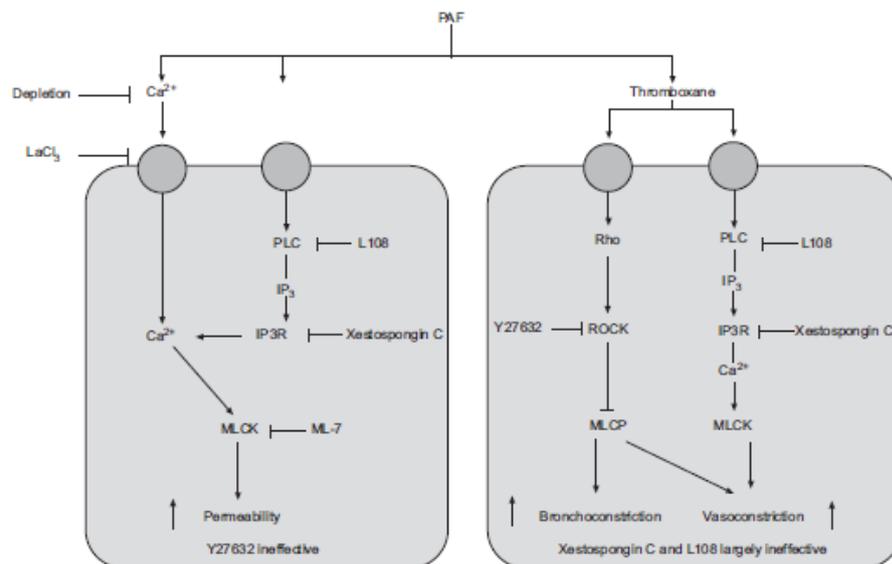
Os efeitos do PAF sobre a circulação pulmonar foram descritos por diversos autores. CHEN et al. (1992) demonstraram um aumento das pressões arterial e microvascular pulmonares, e edema, após a injeção de PAF. SHIBAMOTO et al. (1993) estudaram os efeitos do PAF na circulação venosa em pulmão de cão, onde o PAF causou venoconstrição e aumento da pressão capilar, sem aumento da permeabilidade vascular. OHAR et al. (1994), também demonstraram venoconstrição, em estudo com pulmão de coelhos, mas demonstraram que a redução da complacência e aumento da resistência vascular deveu-se a alteração estrutural vascular, por perda de colágeno intersticial, induzida por PAF.

Contudo, o papel do PAF como causador de aumento da permeabilidade vascular e edema pulmonar está bem estudado, devido a sua participação na fisiopatologia da anafilaxia, da endotoxemia e da asma (EVANS et al., 1987;

CLAVIJO et al., 2001; GÖGGEL e UHLIG, 2005; SHIBAMOTO et al., 2008; MUEHLMANN et al., 2009).

Em estudo prévio, o extravasamento microvascular ocorrido após a infusão de PAF não foi acompanhado de aumento da pressão arterial pulmonar, assim os autores concluíram que o edema pulmonar mediado por PAF resulta de aumento da permeabilidade microvascular pulmonar (CLAVIJO et al., 2001).

De fato, demonstrou-se que o aumento da permeabilidade capilar induzida por PAF ocorre pela formação de fendas no endotélio microvascular, devido a desorganização das proteínas juncionais VE-caderina e ocludina (ZHANG et al., 2003; JIANG et al., 2008), mediada por receptores específicos (EVANS et al., 1987) e através da ativação da via do inositol trisfosfato e influxo de cálcio (GÖGGEL e UHLIG, 2005) (FIGURA 3).



PLC: phospholipase C; IP₃, inositol 1,4,5,-trisphosphato; IP₃R, receptor de IP₃;
MLCK: myosin light chain kinase; ML-7: 5-iodonaphthalene-1sulphonyl-
homopiperazine; L108: edelfosina. —| Inibição; ↑ ativação

FIGURA 3 – RESUMO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR EM RESPOSTA AO PAF, NO PULMÃO DE RATOS. NO LADO ESQUERDO, OBSERVA-SE O EFEITO DO PAF EM CÉLULAS ENDOTELIAIS. NO LADO DIREITO, OBSERVA-SE OS EFEITOS DO PAF EM CÉLULAS DA MUSCULATURA LISA VASCULAR E DAS VIAS AÉREAS, A QUAL É ALTAMENTE MEDIADA POR TROMBOXANO. NESTE, A VIA PRINCIPAL É ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE RHO E PROTEÍNAS KINASES ASSOCIADAS À RHO, QUE ATENUAM A ATIVIDADE DA MLCP (MYOSIN LIGHT CHAIN PHOPHATASE), COM CONSEQÜENTE AUMENTO DA FOSFORILAÇÃO DA CADEIA LEVE DA MIOSINA, E, PORTANTO A CONTRAÇÃO. FONTE: GÖGGEL e UHLIG (2005).

Adicionalmente, os efeitos do PAF na permeabilidade vascular podem ser dependentes, em parte, da liberação de óxido nítrico (NO) (BELLAN et al., 1992). O aumento da produção de NO, induzida por PAF via ativação de receptor de PAF, foi demonstrado em células do endotélio vascular humano, considerado como um efeito cardioprotetor (KIKUCHI et al., 2008; LEARY et al., 2008). Contudo, particularmente na microcirculação o NO contra-ataca muitos dos efeitos biológicos do PAF, inibindo a vasoconstrição arteriolar e o aumento da permeabilidade vascular, além de inibir a adesão de plaquetas e de leucócitos ao endotélio (BRKOVIC e SIROIS, 2007; KIKUCHI et al., 2008; LEARY et al. 2008). Mas os mecanismos pelos quais o NO modula a permeabilidade microvascular ainda não são bem entendidos, podendo ser confusos e dependentes do estado das células endoteliais (RAMIREZ et al., 2006).

A inibição da NO sintase (NOS) em células endoteliais atenuou o aumento da permeabilidade microvascular induzida por PAF no estudo de ZHU et al. (2004). Por outro lado, estudando a participação de NO e PAF em lesões de intestino delgado de ratos, KWASNIEWSKI et al. (2008) evidenciaram que a inibição da produção de NO endógeno aumentou bastante as lesões hemorrágicas e a taxa de mortalidade, demonstrando o papel pró inflamatório do PAF e o efeito protetor do NO, na microcirculação. Tal relação também foi descrita por BRKOVIC e SIROIS (2007), estudando o papel do PAF e do NO nos efeitos pró inflamatórios resultantes da participação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e concluindo que é o PAF que diretamente aumenta a permeabilidade vascular sendo o NO um cofator.

A atuação do PAF como mediador inflamatório é bastante importante na asma, onde além de provocar aumento da permeabilidade vascular, também induz uma neutropenia transitória seguida de neutrofilia, resultando no recrutamento de neutrófilos para o pulmão, evidenciado através de estudo citológico do lavado broncoalveolar (LEE et al., 2002; GABRIJELCIC et al., 2003).

No estudo de AU et al. (2001), a ativação de neutrófilos resultou em ativação dos receptores de PAF, aumento da fagocitose de neutrófilos e subsequente liberação de interleucina-8 (IL-8), causando mais quimiotaxia de neutrófilos. Adicionalmente, demonstrou-se que há envolvimento de receptor 1 de leucotrieno B₄ (LTB₄) nas atividades de neutrófilos humanos mediadas por PAF (GAUDREULT et al., 2005).

Em indivíduos asmáticos e com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), o influxo de neutrófilos mediado por PAF nas vias aéreas foi modulado pelo aumento

de LTB₄, provavelmente pelo estímulo de PAF para a liberação de LTB₄ dos macrófagos alveolares (SHINDO et al., 1998; GABRIJELCIC et al., 2003; FINNEY-HAYWARD et al. 2009).

Nas vias aéreas dos cavalos, se demonstrou a participação do PAF na fisiopatologia da obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA), levando a um aumento do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos no pulmão, resultando em prejuízos à função pulmonar (FAIRBAIRN et al., 1996).

O PAF, tendo como uma de suas origens o macrófago alveolar, é capaz de modificar o comportamento de neutrófilos sanguíneos, induzindo a um aumento da adesão (BRAZIL, 2001) e na ativação dos neutrófilos em cavalos suscetíveis a ORVA (MARR et al., 2002).

A participação do PAF na asma humana e em outras espécies foi evidenciada pela sua capacidade em reproduzir mecanismos fisiopatológicos tais como a broncoconstrição, hiperresponsividade das vias aéreas, aumento da permeabilidade na microcirculação pulmonar e aumento na secreção de muco (LOU et al., 1998; ISHII et al., 2004; MUEHLMANN et al., 2009).

1.4 MUCO E INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

Os desafios indutores de alterações na funcionalidade dos macrófagos alveolares resultando em quimiotaxia de neutrófilos para as vias aéreas levam a um quadro inflamatório pulmonar acompanhado de hipersecreção de muco. Por sua vez, o muco presente nas vias aéreas possui uma série de funções essenciais que, coletivamente levam a proteção das vias aéreas. Juntamente com as células epiteliais, forma o sistema mucociliar que, associado à tosse, é essencial para manter as vias aéreas desobstruídas (ADLER, 2005).

Por outro lado, a produção excessiva de muco representa um fator importante de morbidade e mortalidade nas doenças das vias aéreas (THORNTON e SHEEHAN, 2004). Assim, a resposta imunológica do epitélio das vias aéreas frente a infecções virais e bacterianas, e endotoxinas inaladas, é caracterizada pela liberação de citocinas e pela produção de mucinas para prover proteção adicional (HODGSON et al., 2003; GERBER et al., 2004; LORA et al., 2005). Entretanto, nos quadros inflamatórios, os danos teciduais substanciais podem levar a produção

excessiva de muco e comprometimento da função respiratória (LORA et al., 2005; ROBINSON, 2005).

O muco é uma mistura de água (~95%), eletrólitos (~1%), lipídios (~1%), proteínas (2-3%): enzimas, proteínas séricas e mucinas (GERBER, 2001). As mucinas, glicoproteínas oligoméricas, representam um constituinte importante do muco, sendo o gene responsável pela produção de mucinas, o *MUC5* (THORNTON e SHEEHAN, 2004).

Nas vias aéreas, a produção de mucinas ocorre predominantemente pelas células caliciformes do epitélio e, em menor parte nas glândulas da submucosa (GERBER et al., 2004; THORNTON e SHEEHAN, 2004). A produção de quantidades excessivas de muco pode representar a causa direta de obstrução bronquial, podendo amplificar o efeito de estreitamento luminal da broncoconstrição e estar associada ao comprometimento da função pulmonar, tosse e capacidade reduzida para a corrida, em atletas humanos (HALLSTRAND et al., 2007) e em cavalos de corrida (CHRISTLEY et al., 2001; HOLCOMBE et al., 2006).

Assim, a quantidade de muco secretado apresenta uma correlação estreita com a inflamação das vias aéreas (GERBER et al., 2004; ROBINSON et al., 2003; HOLCOMBE et al., 2006; ROBINSON, 2005). De fato, há uma evidente associação entre a hipersecreção de muco e presença de quantidades aumentadas de neutrófilos nas secreções respiratórias, em seres humanos e em cavalos (HODGSON et al., 2003; ROBINSON et al., 2003; ADLER, 2005). Contagens de neutrófilos no LBA menores que 30 células/ μ L correspondem a pequenas quantidades de muco nas vias aéreas e os acúmulos de secreção aumentam quando as quantidades de neutrófilos estão entre 30 e 100 células/ μ L. Entre 100 e 1000 células/ μ L, ocorre obstrução mensurável das vias aéreas. Possivelmente, esse mecanismo pode estar relacionado com a secreção de proteínas pelos neutrófilos (ROBINSON et al., 2003). De fato, já foi demonstrado que o neutrófilo secreta elastase, a qual está associada com um aumento nas secreções relacionadas com a expressão do gene *MUC5* (SHAO e NADEL, 2005) e metaplasia de células caliciformes (VOYNOW et al., 2004).

A expressão anormal de neutrófilos e de moléculas de adesão em indivíduos com asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) foi demonstrada por GABRIJELCIC et al. (2003). Além do aumento no número de neutrófilos, também foram observados diferentes padrões de ativação e níveis aumentados de elastase

neutrofílica e IL-8. Estes últimos, bem como a expressão do gene *MUC5*, estão associados a um aumento no estresse oxidativo pulmonar (DROST et al., 2005; SHAO e NADEL, 2005).

A associação entre a severidade da inflamação das vias aéreas e o estresse oxidativo, em cavalos com ORVA, foi relatada por KIRSCHVINK et al. (2008), os quais relacionaram a inflamação das vias aéreas ao aumento da glutathiona oxidada, do ácido úrico e de isoprostano (8-iso-PGF_{2α}), no LBA.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO NAS VIAS AÉREAS E EXERCÍCIO

Estresse oxidativo é o termo utilizado para descrever os danos causados quando as espécies reativas do oxigênio (ROS) superam a capacidade de defesa antioxidante do indivíduo (WOOD et al., 2003).

Entretanto, tanto as ROS como as espécies reativas do nitrogênio (RNS), ocorrendo em concentrações pequenas a moderadas, apresentam importante papel na fisiologia celular, incluindo a defesa contra invasores e atuando em diversas vias de sinalização celular e na indução da resposta mitogênica. O estresse oxidativo propriamente dito ocorre quando o sistema redox sofre desequilíbrio, pela produção aumentada de ROS e/ou RNS ou produção reduzida de antioxidantes (VALKO et al., 2007).

Os pulmões encontram-se sujeitos ao estresse oxidativo, pois estão diretamente expostos a quantidades muito elevadas de oxigênio, o que torna imperativo que este órgão possua um arsenal para a defesa contra possíveis ataques oxidativos. Portanto, os pulmões são providos de um desenvolvido sistema de defesa endógeno constituído de agentes chamados antioxidantes. Os antioxidantes ajudam os pulmões a se livrarem dos efeitos de uma variedade de oxidantes provenientes do oxigênio (ROS), como o ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, e do nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO), peroxinitrito, e nitritos endógenos e do ambiente. Os principais sistemas antioxidantes não enzimáticos dos pulmões são a glutathiona, a vitamina C, a vitamina E, o beta-caroteno e o ácido úrico, enquanto os antioxidantes enzimáticos são as superóxido dismutases, a catalase e as peroxidases (RAHMAN et al., 2006) (FIGURA 4).

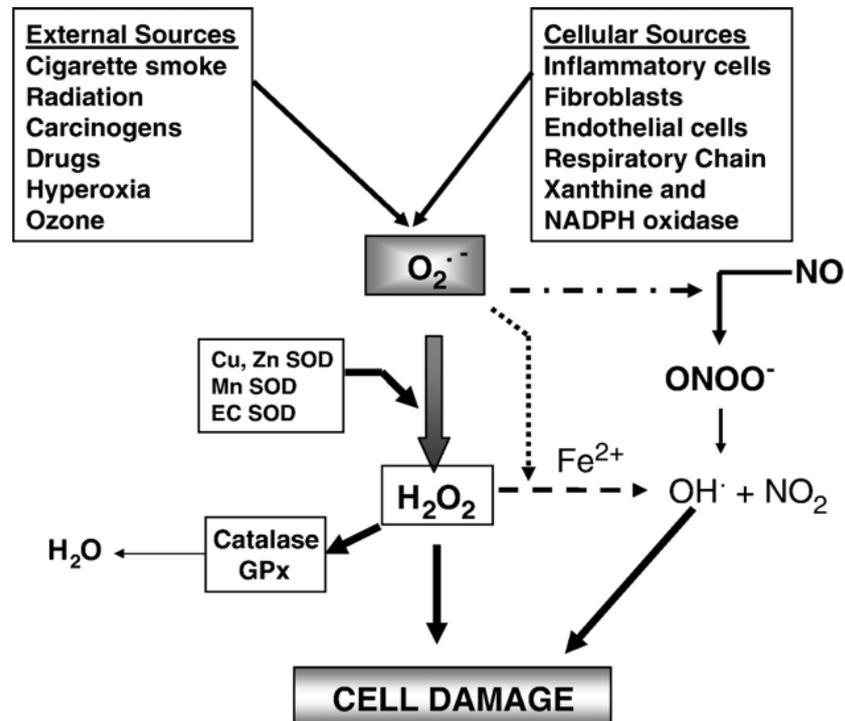


FIGURA 4 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ROS) E SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE. $O_2^{\cdot-}$, ÂNION SUPERÓXIDO; NO, ÓXIDO NÍTRICO; H_2O_2 , PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO; OH^{\cdot} , RADICAL HIDROXILA; NO_2 , DIÓXIDO DE NITROGÊNIO; $ONOO^-$, PEROXINITRITO; Fe^{2+} , ÍON FERROSO; GPx, GLUTATIONA PEROXIDASE. FONTE: RAHMAN et al. (2006).

O estresse oxidativo pode resultar em muitos prejuízos às funções das vias aéreas, incluindo a contração da musculatura lisa das vias aéreas, a indução de hiperresponsividade das vias aéreas, a hipersecreção de muco, danos ao epitélio respiratório e aumento da permeabilidade capilar (WOOD et al., 2003).

A fisiopatologia da asma e da DPOC caracteriza-se por inflamação crônica localizada e estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre pelo aumento de agentes oxidantes que são inalados, bem como por grandes quantidades de ROS liberadas das células inflamatórias. Níveis aumentados de ROS aumentam a resposta inflamatória, diretamente ou via formação de produtos da peroxidação lipídica, levando a um aumento na severidade da doença (KIRKHAM e RAHMAN, 2006).

A peroxidação dos lipídios da membrana celular leva a geração de isoprostanos (FIGURA 5), um composto bioativo semelhante às prostaglandinas. Os isoprostanos são produzidos independentemente das enzimas ciclooxigenases via peroxidação do ácido aracádônico, catalizada por ROS, apresentando potente efeito

constritor na musculatura lisa respiratória, hiperresponsividade e exsudação de plasma nas vias aéreas (WOOD et al., 2003).

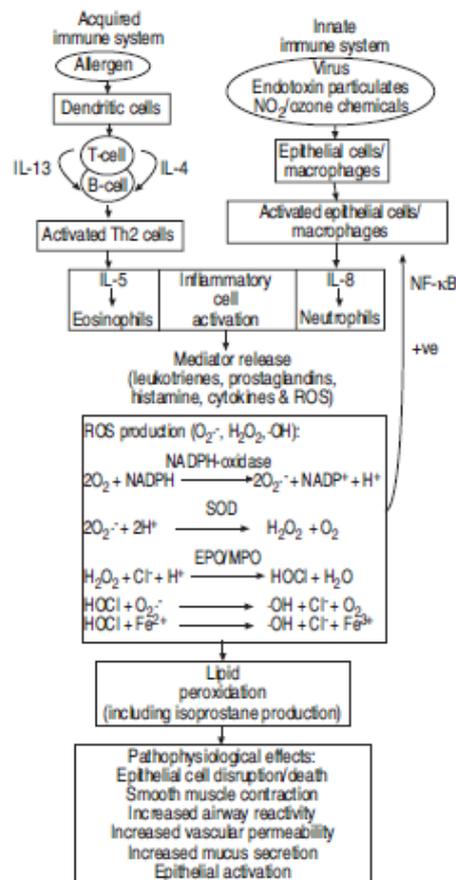


FIGURA 5 – MECANISMOS LEVANDO A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA ASMA. IL: INTERLEUCINA; TH2: CÉLULAS T-HELPER TIPO 2; ROS: ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO; O₂^{•-}, ÂNION SUPERÓXIDO; H₂O₂, PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO; OH[•], RADICAL HIDROXILA; NO₂, DIÓXIDO DE NITROGÊNIO; NADPH: NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDIO FOSFATO REDUZIDA; NADP, NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDIO FOSFATO; SOD, SUPERÓXIDO DISMUTASE; EPO, PEROXIDASE EOSINOFÍLICA; MPO, MIELOPEROXIDASE; NF, FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR. FONTE: WOOD et al. (2003).

O óxido nítrico (NO), sintetizado enzimaticamente pela oxidação do aminoácido L-arginina para L-citrulina, apresenta diversas funções fisiológicas nas vias aéreas, como o relaxamento da musculatura lisa, a regulação da responsividade e da permeabilidade das vias aéreas, e na defesa contra invasores. Contudo, em altas concentrações o NO apresenta diversos efeitos pró inflamatórios, participando da infiltração de células inflamatórias e apresentando efeitos citotóxicos sobre

diversas células, tal como a célula do epitélio respiratório, especialmente por interagir com o ânion superóxido formando o peroxinitrito (REDINGTON, 2006).

As células inflamatórias recrutadas às vias aéreas do indivíduo asmático apresentam excepcional capacidade de produção de oxidantes. Eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, bem como células do epitélio respiratório, podem gerar oxidantes. Inicialmente ocorre a formação de ânion superóxido, no complexo dependente de NADPH oxidase na membrana celular, no sistema xantina oxidase citosólico, e na cadeia respiratória mitocondrial (FIGURA 6) (CARAMORI e PAPI, 2004). A seguir, a interação do ânion superóxido com outros oxidantes e o ataque oxidativo ao tecido pulmonar, leva à peroxidação lipídica e danos ao tecido pulmonar (MILLS e HIGGINS, 1997; KIRKHAM e RAHMAN, 2006).

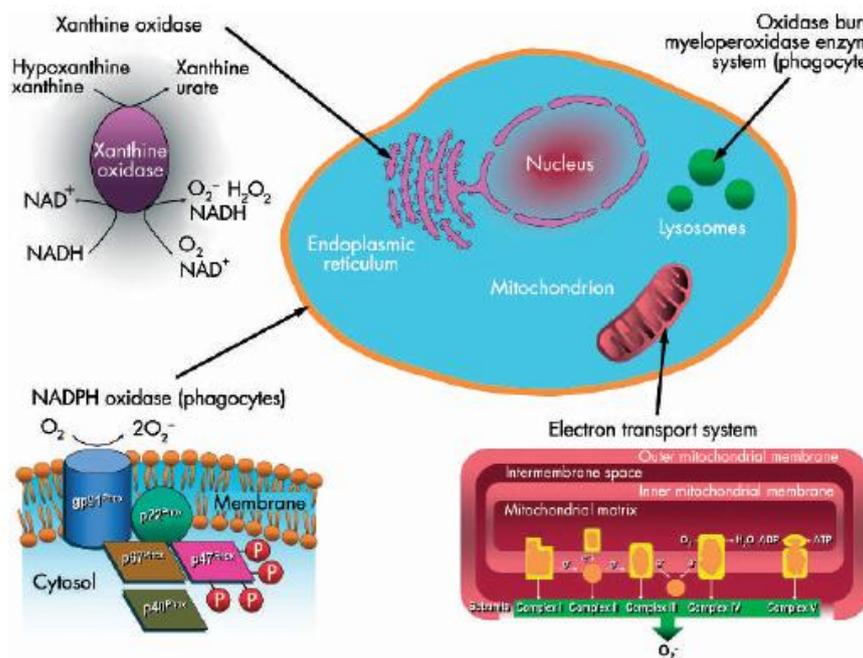


FIGURA 6 – PRINCIPAIS FONTES DE OXIDANTES NAS CÉLULAS. FONTE: CARAMORI E PAPI (2004).

O estudo do estresse oxidativo na asma se utiliza de modelos que podem envolver os murinos (MUEHLMANN et al., 2009), ou mesmo os cavalos, já que estes naturalmente desenvolvem a ORVA, doença respiratória com diversas similaridades com a asma humana (DEATON, 2006).

Nos cavalos com ORVA, os marcadores de estresse oxidativo estão aumentados e diretamente relacionados à inflamação pulmonar e infiltrado inflamatório neutrofílico (KIRSCHVINK et al., 2008), ao aumento da produção de ânion superóxido por neutrófilos sanguíneos após a exposição à poeira orgânica ambiental (MARR et al., 1997) e ao aumento da secreção de muco, apresentando também concentrações reduzidas de ácido ascórbico no fluido do epitélio respiratório (DEATON, 2006).

O exercício físico, por sua vez, também pode causar estresse oxidativo nas vias aéreas, em atletas humanos e em cavalos, pela geração de ROS e RNS (MILLS e HIGGINS, 1997; ART e LEKEUX, 2005; KIRSCHVINK et al., 2008).

Os cavalos de corrida apresentam a habilidade de aumentar o consumo de oxigênio em 60 vezes durante o esforço máximo, o que representa um fator de risco ao estresse oxidativo nesses animais (ART e LEKEUX, 2005).

A peroxidação lipídica é o marcador de dano oxidativo pós exercício mais estudado (DEATON e MARLIN, 2003). Em atletas humanos, houve aumento da peroxidação lipídica após a realização de ultramaratona (MASTALLOUDIS et al., 2004), mas o treinamento produziu efeitos benéficos e redução dos marcadores de peroxidação lipídica após um período de treinamento (MIYAZAKI et al., 2001; BALOG et al., 2006). Em cavalos, o exercício submáximo induziu um aumento nos hidroperóxidos lipídicos plasmáticos dentro de 5 minutos após o término (DEATON e MARLIN, 2003).

As ROS e seus produtos, como os peróxidos lipídicos, podem diretamente danificar o tecido pulmonar e causar um incremento da pressão vascular pulmonar, pela liberação aumentada de mediadores inflamatórios vasoconstritores (p.ex.: PAF), interferindo na atividade do NO como vasodilatador, podendo assim, contribuir na patogênese da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) nos cavalos atletas (MILLS e HIGGINS, 1997).

1.6 HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO (HPIE)

A HPIE é caracterizada por hipertensão pulmonar, edema nas regiões de troca gasosa, ruptura dos capilares pulmonares e a presença de sangue nas vias aéreas (ERICKSON e POOLE, 2007), sendo extremamente comum em cavalos de corrida (PEREZ-MORENO et al., 2009).

Tem-se relatado que a HPIE ocorre, essencialmente, em todos os cavalos PSI de corrida em treinamento (WEST et al., 1993; HINCHCLIFF, 2007), mas também constitui um problema em outras raças de cavalos que realizam exercício intenso, como os trotadores e os quarto de milha, e em cavalos realizando exercício de menor intensidade, como os cavalos de salto e tração (LAPOINTE et al., 1994; ERICKSON e POOLE, 2007; VICINO, 2007).

O comprometimento ao rendimento desportivo causado pela HPIE não havia sido comprovado até o estudo de HINCHCLIFF et al. (2005a), quando demonstraram que cavalos de corrida com HPIE grau 1 apresentaram 4 vezes mais possibilidades de vencer, em relação a graduações mais elevadas de hemorragia.

Cavalos PSI de corrida estão sob maior risco de apresentar HPIE, porque apresentam pressão capilar pulmonar mais elevada que cavalos de outras raças e atividades, durante o esforço máximo (HACKETT et al., 2003).

Adicionalmente, a criação seletiva de cavalos de corrida, visando que sejam cada vez mais capazes de atingir altas velocidades associado a consumo bastante alto de oxigênio, resultou em débito cardíaco substancial (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1994) e barreira alvéolo-capilar (BAC) bastante fina (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1999). A espessura média, em micrometros, do interstício da BAC é $0,175 \pm 0,010$ em coelhos, $0,318 \pm 0,081$ em cães, e $0,390 \pm 0,02$ em cavalos, evidenciando que proporcionalmente a BAC dos cavalos é mais fina que a de outras espécies (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1999). Portanto, há um dilema envolvendo a evolução da BAC dos cavalos. Por um lado, a necessidade de ser extremamente fina para uma troca gasosa eficiente, enquanto de outro, a necessidade de ser resistente o suficiente para suportar o estresse extremamente alto na parede dos capilares pulmonares, quando a pressão capilar se eleva durante o exercício (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1995).

A pressão hidrostática máxima nos capilares pulmonares humanos durante o exercício supera 30 mmHg. Nos cavalos PSI de corrida, a pressão capilar ultrapassa

100 mmHg, aproximando-se da força necessária para ocorrer a ruptura do colágeno que suporta a parede capilar na BAC (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1995).

Quando o estresse na parede capilar se eleva demasiadamente, ocorrem alterações ultra-estruturais na BAC, uma condição conhecida como falência por estresse, descrita em atletas de elite humanos e em cavalos (WEST, 2000).

BIRKS et al. (1997) demonstraram a falência por estresse e conseqüente ruptura dos capilares pulmonares em cavalos exercitando a altas velocidades, havendo maior risco de ocorrência da HPIE quando encontraram-se sob importante aumento da pressão arterial pulmonar (FIGURA 7).

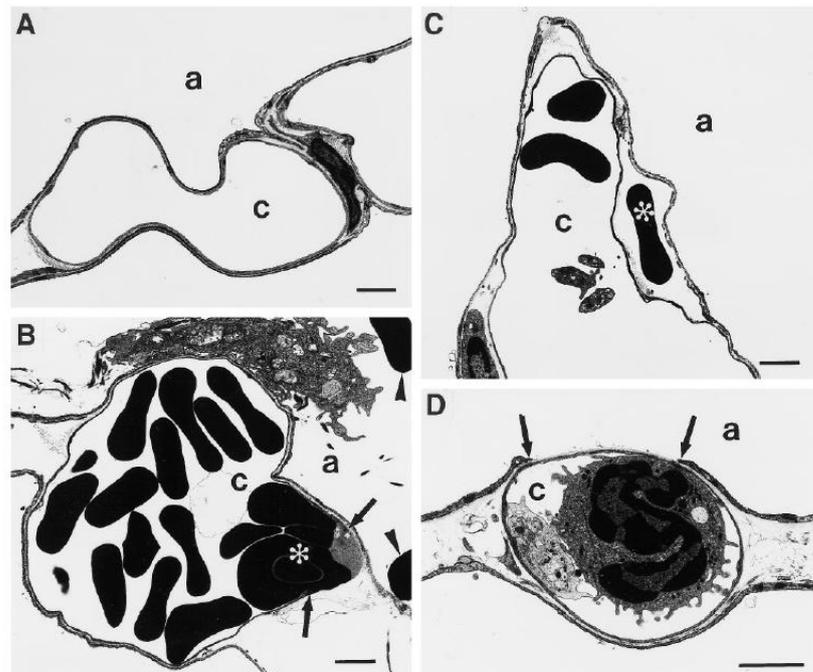


FIGURA 7 – ELETROMICROGRAFIAS DA BARREIRA ALVÉOLO-CAPILAR (BAC) DE PULMÕES DE CAVALOS, FIXADOS POR PERFUSÃO A 25 (A) E 100 mmHg (B-D). A: ULTRAESTRUTURA CAPILAR NORMAL. B: RUPTURA DO ENDOTÉLIO CAPILAR (SETAS) COM ERITRÓCITOS ADJACENTES (ASTERISCO); NOTA-SE TAMBÉM, ERITRÓCITOS NO ESPAÇO ALVEOLAR (PONTAS DE SETAS). C: ERITRÓCITO NO INTERSTÍCIO (ASTERISCO). D: RUPTURA DO EPITÉLIO ALVEOLAR (SETAS). A, ALVÉOLO; C, CAPILAR. BAR, 2 μ m. FONTE: BIRKS et al. (1997).

Portanto, a falência por estresse dos capilares pulmonares é a teoria aceita para a ocorrência da HPIE, sendo causada pela elevada pressão transmural nos capilares pulmonares, resultado do aumento da pressão arterial pulmonar somada à pressão pleural inspiratória negativa (WEST, 2000) (FIGURA 8).

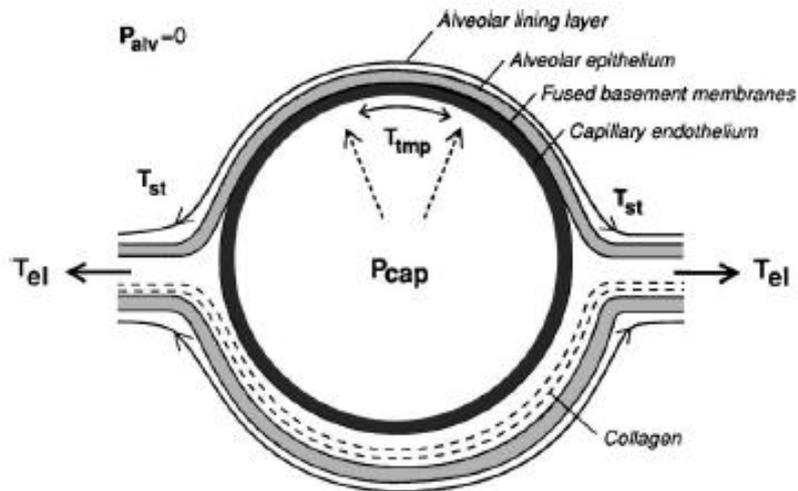


FIGURA 8 – TRÊS FORÇAS AGEM NA BARREIRA ALVÉOLO-CAPILAR (BAC). T_{TMP} TENSÃO CIRCUNFERENCIAL OU EM ARCO CAUSADA PELA PRESSÃO TRANSMURAL CAPILAR. T_{EL} É A TENSÃO LONGITUDINAL NOS COMPONENTES DA PAREDE ALVEOLAR ASSOCIADA COM A INFLAÇÃO PULMONAR; PARTE DESTA É TRANSMITIDA À BAC. T_{ST} É A TENSÃO DE SUPERFÍCIE DA CAMADA SUPERFICIAL ALVEOLAR; ESTA, APARENTEMENTE EXERCE UMA FORÇA DE AÇÃO INTERNA PARA SUPOORTAR O CAPILAR QUANDO ESTE INTUMESCE PARA DENTRO DO ESPAÇO ALVEOLAR A ALTAS PRESSÕES TRANSMURAL CAPILARES. P_{ALV} , PRESSÃO ALVEOLAR; P_{CAP} , PRESSÃO CAPILAR. FONTE: WEST (2000).

Diversos estudos estiveram envolvidos em avaliar a participação do NO, no aumento da pressão arterial pulmonar no cavalo durante o exercício, e na fisiopatologia da HPIE. Inicialmente, evidenciou-se que cavalos realizando exercício intenso apresentam hipoxemia arterial induzida pelo exercício (HAIE) (CHRISTLEY et al., 1997; COUËTIL e DENICOLA, 1999; DEMPSEY e WAGNER, 1999; SÁNCHEZ et al., 2005), o que resulta na inibição da produção do NO abolindo o relaxamento vascular dependente do endotélio (MILLS e HIGGINS, 1997).

Portanto, acreditou-se que a redução da produção do NO durante o exercício intenso poderia contribuir para a alta incidência de HPIE nos cavalos de corrida. Contudo, a administração do antagonista da óxido nítrico sintase (NOS) N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), mostrou que o NO endógeno resulta numa maior

extração de O₂ no repouso e no exercício submáximo, mas não causou alteração no exercício intenso (MANOHAR e GOETZ, 1998; MANOHAR et al., 2006). A administração de L-NAME por KINDIG et al. (2000) resultou em agravamento da HPIE nos cinco animais estudados, contudo, não observou-se aumento da pressão arterial pulmonar.

MANOHAR e GOETZ (1999) avaliaram os efeitos da infusão intravenosa de nitroglicerina em cavalos realizando exercício, e não observaram alterações sobre a incidência ou severidade da HPIE.

Adicionalmente, KINDIG et al. (2001) estudaram os efeitos do exercício na pressão arterial pulmonar e na HPIE em cavalos inalando NO. Comparados aos controles, o grupo que inalou o NO apresentou uma pequena, mas consistente, redução na pressão arterial pulmonar máxima, mas com um significativo aumento da HPIE nesses animais, avaliado pelo aumento na contagem do número de eritrócitos no LBA. Os autores entenderam que a pressão arterial pulmonar elevada reflete, em parte, uma vasoconstrição arteriolar que serve para proteger o leito capilar das pressões arteriais pulmonares extremamente altas, desencadeadas durante o exercício máximo em cavalos PSI. Assim, o tratamento com NO exógeno não só não ajudou, como agravou a HPIE.

Portanto, em face aos achados relacionados à participação do NO e da NOS no cavalo em exercício máximo e na HPIE, são necessárias outras investigações a respeito dos efeitos da inibição da NOS e da produção do NO, na circulação pulmonar e na HPIE (KINDIG et al., 2000).

Apesar da maior atenção aos efeitos da HPIE e da pressão arterial pulmonar em cavalos realizando exercícios intensos, a HPIE também passou a ser demonstrada em cavalos envolvidos em atividades de menor intensidade, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na fisiopatologia (EPP et al., 2006).

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

Neste contexto, a associação entre a HPIE e a inflamação pulmonar já foi demonstrada anteriormente (McKANE et al., 1993; SÁNCHEZ et al., 2005). Em concordância, o estudo epidemiológico de NEWTON e WOOD (2002), evidenciou

uma significativa associação entre a HPIE e a inflamação pulmonar em cavalos puro sangue inglês (PSI) jovens durante treinamento para corrida.

O processo de hemorragia pulmonar pode culminar em irritação e inflamação das vias aéreas, o que exacerbaria a doença inflamatória das vias aéreas inferiores (ERICKSON e POOLE, 2007). WEST e MATHIEU-COSTELLO (1999) sugerem que alterações na BAC ativariam vias pró inflamatórias nas vias aéreas, com a participação de LTB4. Possivelmente, a membrana basal alveolar exposta após a ruptura ativaria macrófagos alveolares, sendo que estes são ricos em LTB4.

DERKSEN et al. (2009) sugeriram uma hipótese para a ocorrência da HPIE (FIGURA 9), onde a ocorrência das altas pressões vasculares pulmonares levaria a alterações venulares culminando na ruptura capilar, sangramento, inflamação e hemossiderose, agravando o quadro da HPIE.

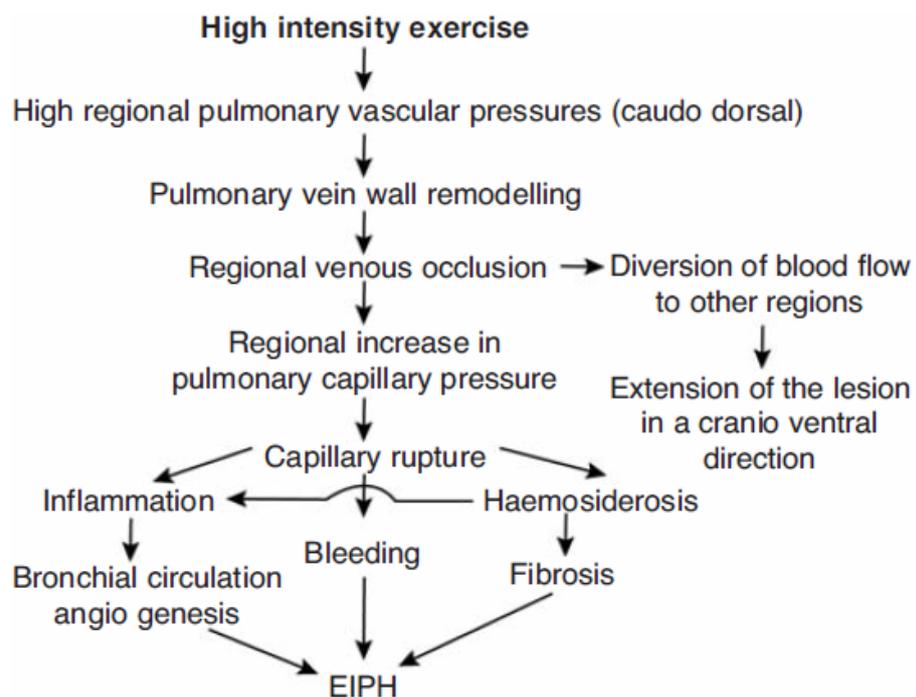


FIGURA 9 – HIPÓTESE PARA A PATOGÊNESE DA HPIE SEGUNDO DERSKEN et al. (2009).

Contudo, mediadores bem como os mecanismos inflamatórios que estão envolvidos na fisiopatologia da HPIE ainda precisam ser esclarecidos.

O diagnóstico da HPIE pode ser feito pela evidência de sangue na traquéia, visível através de exame endoscópico (HINCHCLIFF et al., 2005b; ERICKSON e POOLE, 2007), pela contagem de eritrócitos no LBA (MEYER et al., 1998) ou pela

presença de hemossideróforos (macróforos contendo hemossiderina ou eritrócitos) no AT (EPPINGER, 1990; MICHELOTTO JÚNIOR et al., 2007) e/ou no LBA (DOUCET e VIEL, 2002; SÁNCHEZ et al., 2005; BIAVA et al., 2006), realizado uma hora após o exercício. A presença de hemossideróforos no LBA é considerada a forma mais sensível de diagnóstico da HPIE (McKANE et al., 1993).

Em resumo, a inflamação das vias aéreas, acompanhada de hiperresponsividade e hipersecreção de muco, denominada doença inflamatória das vias aéreas (DIVA), bem como a hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE), são causas de enormes perdas econômicas e de queda de rendimento desportivo, interrupção nos treinamentos e de encerramento de campanha em cavalos de corrida. Apesar disso, a maioria dos estudos sobre as doenças inflamatórias das vias aéreas dos cavalos são direcionados para a ORVA e a fisiopatologia da DIVA ainda está pouco esclarecida, bem como os mecanismos inflamatórios da HPIE ainda precisam ser mais bem estudados.

Tendo-se em vista estes aspectos, a hipótese levantada no presente estudo foi de que o desafio ambiental e o exercício físico estejam acompanhados de estresse oxidativo, alterando o quadro inflamatório, possivelmente por alterar a produção de PAF no pulmão, com conseqüente alteração da funcionalidade celular, e que a hemorragia pulmonar pode exercer influência sobre essa situação. As células estudadas foram os macróforos alveolares, os quais podem apresentar um papel central na regulação deste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar alterações em parâmetros clínicos e inflamatórios, pulmonares, em cavalos puro sangue inglês (PSI) de corrida jovem, submetidos ao desafio ambiental e ao treinamento físico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os seguintes parâmetros clínicos e laboratoriais:

- Avaliação clínica;
- Avaliação endoscópica das vias aéreas;
- Avaliação citológica das vias aéreas através das técnicas de aspirado traqueal (AT) e de lavado broncoalveolar (LBA);
- Avaliação da bioatividade de PAF, bem como a concentração de proteínas e a produção de peróxidos lipídicos e nitritos, no LBA;
- Avaliação da capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) por macrófagos alveolares, bem como a capacidade fagocitária e de adesão.
- Avaliação da capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) por neutrófilos do sangue periférico, bem como a capacidade fagocitária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SEDATIVOS

O BN52021 (Gingkolide B) foi obtido da Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA). Fura-2 AM (cat. num. F-0888), PAF (β -Acetyl- γ -O-hexadecyl-L- α -phosphatidylcholine, P-4904) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). A coloração de Romanowski (Panótico[®]) foi obtida da Laborclin (Pinhais, PR, Brasil), e a acepromazina da Univet (São Paulo, SP, Brasil). A xylazina e o butorphanol foram obtidos do laboratório Fort Dodge (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes foram comprados da Sigma (St Louis, MO, USA).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados equinos machos adultos jovens (potros) da raça puro sangue inglês (PSI) de cinco diferentes criatórios (haras) da região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná (Haras Cifra e Haras dos Girassóis, em Piraquara, Haras Palmerini e Haras Belmont, em São José dos Pinhais e Haras Santa Rita da Serra em Tijucas do Sul, e potros de quatro diferentes cocheiras no Jockey Club do Paraná (Av. Víctor Ferreira do Amaral 2291, Tarumã, Curitiba, PR).

Inicialmente os potros foram divididos em três grupos. O primeiro grupo foi denominado grupo condições naturais (CN, n=45), compreendendo os potros dos haras, vivendo soltos em piquetes dia e noite, alimentando-se de gramíneas e leguminosas da pastagem mais complemento peletizado fornecido no campo. A média de idade dos animais deste grupo foi de $14,5 \pm 0,4$ meses. O segundo grupo foi denominado grupo desafio ambiental (DA, n=45), constituído por potros estabulados por 30 dias com o propósito de prepará-los para o início de treinamento. Estes animais eram mantidos em grupos de 15 a 20 potros, sendo que permaneciam em baias individuais com dimensões de 3,5m x 3,5m x 3,5m em média, em cama de serragem e alimentados duas vezes ao dia com aveia mais ração peletizada e feno de gramínea e de alfafa. A média de idade dos potros do grupo DA foi de $21,7 \pm 2,9$ meses. O terceiro grupo foi denominado de grupo exercício (EX, n=34), onde foram incluídos potros inéditos (são considerados inéditos animais que ainda não correram

em hipódromos oficiais), mas que estavam em treinamento para corrida há aproximadamente cinco meses e mantidos nas mesmas condições de estabulação e alimentação que os potros do grupo DA. Estes animais foram acompanhados durante o período de treinamento, sendo que a avaliação clínica, endoscópica e a colheita de LBA ocorreu 24 horas após seu primeiro exercício intenso (15 m/s – 16 m/s) em 800m – 1.000m de distância na pista de areia do Jockey Club do Paraná. A média de idade dos potros do grupo EX foi de $27,0 \pm 0,3$ meses.

A obtenção de dados para o presente trabalho de pesquisa ocorreu durante uma seqüência de experimentos independentes durante um período de 18 meses. Durante este período, grupos de potros foram acompanhados até se encontrarem nas condições estabelecidas para cada grupo, quando então foram avaliados. As amostras do grupo CN foram obtidas de oito diferentes experimentos, sendo dois durante o verão, dois durante o inverno, três durante a primavera e um no outono. As amostras do grupo DA foram provenientes de seis experimentos, sendo dois durante o verão, dois no inverno e dois no outono e para o grupo EX, os resultados advieram de amostras obtidas durante o verão em cinco ocasiões e durante a primavera em quatro, totalizando nove experimentos independentes para este grupo. Os resultados apresentados, para cada uma das análises, provêm de pelo menos três experimentos independentes.

Todos os animais estudados eram pertencentes a estabelecimentos com programa de desverminação bimensal, bem como foram todos vacinados regularmente contra Influenza Equina e Herpes Vírus Equino tipos 1 e 4. A alimentação utilizada nos estabelecimentos que cederam os potros para o estudo era similar, bem como a análise da alimentação utilizada para os potros dos três grupos não diferiu no que se refere a constituintes essenciais que poderiam influenciar nas avaliações realizadas no presente trabalho. Os critérios de inclusão para os potros dos três grupos foram os estabelecidos e já descritos previamente nas características de cada grupo, e a exclusão do estudo ocorreu quando da história de doença recente ou diferenças em manejo.

As comparações intergrupos foram feitas entre os grupos CN e DA (diferença ambiental) e entre os grupos DA e EX (diferença no regime de exercício).

Na segunda etapa do trabalho, dedicada ao estudo da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE), avaliou-se somente os potros do grupo EX, agora com $n=37$. Este grupo foi dividido em subgrupos, sendo o subgrupo HPIE pos ($n=23$,

constituído por potros com qualquer percentual de hemossiderófagos na avaliação citológica do LBA) e subgrupo HPIE neg (n=14, constituído por potros sem hemossiderófagos na avaliação citológica do LBA). Nesta etapa, as comparações realizadas foram entre os subgrupos HPIE pos e HPIE neg.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do setor de Ciências Biológicas da UFPR sob o número de registro 168, e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob o número de registro 129, e está de acordo com o *Guiding Principles in the Care and Use of Animals*.

3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Prévio à colheita de material procedeu-se a avaliação clínica de cada potro, iniciada pela história incluindo possíveis ocorrências médicas relevantes à saúde do sistema respiratório, manejo, alimentação, desverminação e vacinação. Na história incluiu-se também a informação sobre a ocorrência de tosse espontânea quando em piquetes, na baia, no momento da alimentação ou durante o treinamento. O exame físico incluiu a observação da presença de secreção nasal, estímulo da tosse, palpação de linfonodos submandibulares e retrofaringeanos, auscultação cardíaca e auscultação traqueal e pulmonar (McGORUM e DIXON, 2007).

3.5 AVALIAÇÃO ENDOSCÓPICA DAS VIAS AÉREAS

A avaliação endoscópica das vias aéreas foi realizada previamente a realização do LBA, com o animal tranqüilizado através da administração de acepromazina (acepran 1%, Univet) (0,03 mg/kg, IM) e após 30 minutos, seguindo-se a administração de xilazina (sedazine, Fort Dodge) (0.3-0.5 mg/kg, IV) mais butorfanol (torbugesic, Fort Dodge) (0,05 mg/kg, IV) (HOFFMAN, 1999; HEWSON e VIEL, 2002). Utilizou-se um fibroscópio flexível Pentax de 170 cm de comprimento e 12,8 mm de diâmetro, para a avaliação das vias aéreas superiores e inferiores até a bifurcação da traquéia.

A presença de folículos linfóides na faringe foi graduada segundo RAKER e BOWLES (1978), adotando-se a graduação de I a IV (QUADRO 1) e graus III e IV foram considerados como faringite.

A movimentação das cartilagens aritenóides foi graduada de I a IV segundo RACKESTRAW et al. (1991) (QUADRO 2) e graus III e IV foram considerados como anormais.

GRADUAÇÃO	SIGNIFICADO
Grau I	Faringe com poucos folículos claros na parede dorsal
Grau II	Presença de numerosos pequenos folículos juntamente a hiperemia, cobrindo a superfície dorsal e lateral da faringe
Grau III	Presença de grandes grupos de folículos hiperêmicos cobrindo a superfície dorsal e lateral da faringe
Grau IV	Presença de folículos grandes, edematosos e hiperêmicos por toda a mucosa faringiana

QUADRO 1 – GRADUAÇÃO DA PRESENÇA DE FOLÍCULOS LINFÓIDES NA FARINGE. FONTE: RAKER E BOWLES (1978).

GRADUAÇÃO	SIGNIFICADO
Grau I	Movimentação sincrônica e abdução completa das cartilagens aritenóides
Grau II	Movimentação assincrônica (hesitação, tremores, fraqueza na abdução) da cartilagem aritenóide esquerda durante qualquer fase da respiração com abdução completa da cartilagem aritenóide esquerda (em relação à direita) conseguida com a deglutição ou oclusão nasal
Grau III	Movimentação assincrônica (hesitação, tremores, fraqueza na abdução) da cartilagem aritenóide esquerda durante qualquer fase da respiração e a abdução completa da cartilagem aritenóide esquerda (em relação à direita) não é conseguida na deglutição nem na oclusão nasal
Grau IV (Hemiplegia Laringeana)	Cartilagem aritenóide esquerda posicionada medialmente na glote e não apresenta movimento quando da deglutição ou oclusão nasal

QUADRO 2 – GRADUAÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO DAS CARTILAGENS ARITENÓIDES DE I A IV. FONTE: RACKESTRAW et al. (1991).

Especial interesse foi dado à presença de muco no lume traqueal e sua quantificação através de graduação de 0 a 5 conforme GERBER et al. (2004) (FIGURA 10).

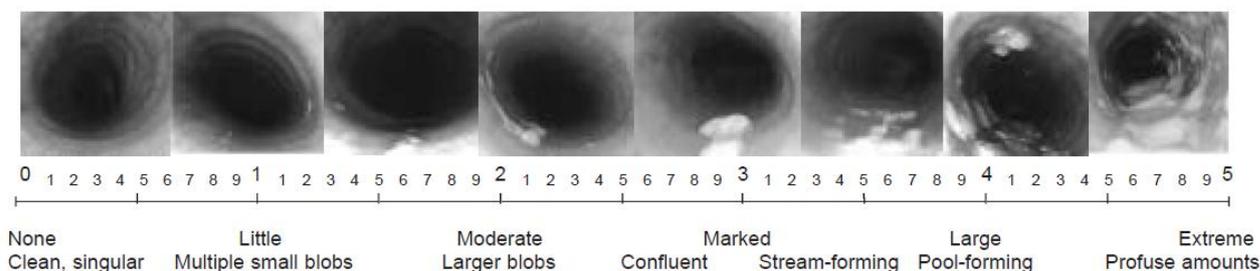


FIGURA 10 – GRADUAÇÃO DE 0 a 5 PARA A QUANTIDADE DE MUCO TRAQUEAL OBSERVADA DURANTE O EXAME ENDOSCÓPICO. FONTE: GERBER et al., 2004.

Quando da observação de muco traqueal, este foi aspirado através de tubo de silicone introduzido pelo canal de trabalho do endoscópio, sendo imediatamente transferido para uma lâmina de microscopia e deixado para secar ao ar. As lâminas foram coradas com coloração de Romanowski (Panótico, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), e 500 células foram contadas em aumento de 1.000X (HODGSON e HODGSON, 2003).

Foi considerado achado citológico normal para o aspirado traqueal (AT) contendo <10% de linfócitos, <1% de eosinófilos e <20% de neutrófilos (ROBINSON, 2003; HODGSON e HODGSON, 2007).

3.6 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Para a realização do LBA foi utilizado um cateter flexível de silicone, específico para a obtenção de LBA de equinos, marca Cook (V-PBAL-300, Cook Vet Products, Hamburg, Alemanha), de 300 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro. Este foi introduzido às cegas via nasotraqueal, preferencialmente do lado direito, até se alojar em um brônquio, quando o *cuff* na extremidade distal era inflado com 5-10 mL de ar. Utilizou-se 300 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) estéril e com heparina sódica (5 UI/mL de PBS), pré-aquecidos a 37°C (HOFFMAN, 1999; PICKLES et al., 2002a,b,c; MORI et al., 2003; RIIHIMÄKI et al., 2008b). O PBS era infundido em alíquotas de 120 mL (HEWSON e VIEL, 2002), aspirando-se

gentilmente após cada alíquota e dispensando-se o LBA recolhido em frascos plásticos estéreis mantidos em isopor com gelo. Este procedimento foi repetido até que o volume de 300 mL era totalmente empregado. O material recolhido foi mantido refrigerado em isopor com gelo até a chegada ao Laboratório de Metabolismo Celular, no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, para o processamento em menos de 3 horas após a colheita (PICKLES et al., 2002c; VIEL e HEWSON, 2003).

No laboratório, o LBA era centrifugado a 340g (1.300 rpm) por seis minutos a 4°C (Centrifuge 5810 R Eppendorf, Bloomington, IN, EUA), e o pellet obtido foi ressuspenso em 2 mL de PBS para a contagem do número total de células nucleadas (NTCN).

3.7 AVALIAÇÃO CITOLÓGICA DO LBA

A contagem do NTCN foi realizada usando-se a câmara de Neubauer. Uma alíquota da suspensão de células foi diluída 1:10 em PBS em um frasco de centrifugação de 1,5 mL de fundo cônico (Eppendorf). Desta, uma alíquota de 50 µL foi misturada a 50 µL do corante vital Azul de Tripán, para a contagem das células vivas. A partir do número de células vivas por mililitro da suspensão de células, a concentração da suspensão de células foi ajustada para 5×10^6 células/mL para as avaliações da atividade de macrófago alveolar (fagocitose, produção de ânion superóxido, produção de peróxido de hidrogênio e adesão – ver tópicos 3.15, 3.16, 3.17 e 3.18).

Para a avaliação citológica diferencial do LBA, lâminas para microscopia foram preparadas a partir de 10 µL da suspensão de células distribuídos de forma circular sobre a lâmina, secadas ao ar e coradas com coloração de Romanowski (Panótico, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) (HEWSON e VIEL, 2002) e 500 células foram contadas em aumento de 1.000X.

Foi considerado achado citológico normal para o LBA contendo em média, 60% de macrófagos, 35% de linfócitos, <5% de neutrófilos, <2% de mastócitos, <1% de eosinófilos (ROBINSON, 2003; MAZAN e HOFFMAN, 2003; RICHARD et al., 2009)

3.8 EXTRAÇÃO LIPÍDICA TOTAL DAS CÉLULAS DO LBA (FOLCH ET AL., 1957)

Uma porção correspondente a 90 mg de pellet de células do LBA foi ressuspensionado em um solvente extrator (metanol/clorofórmio, 1:2 vol/vol), na quantidade de 1,8 mL, e sonificado (6 ciclos de 4 segundos). Os tubos foram deixados em gelo por 20 minutos.

Na etapa seguinte, mais metanol foi adicionado (324 µL; o cálculo é a quantidade de solvente extrator x 0,180, resultando na quantidade de metanol em mililitros), para reduzir a densidade do líquido e possibilitar, assim, a decantação do material particulado insolúvel no meio. Após, o material foi centrifugado a 5.000g por 10 minutos a 4°C (Centrifuge 5810 R Eppendorf, Bloomington, IN, EUA).

O sobrenadante foi transferido para tubos de vidro e clorofórmio foi adicionado (648 µL, ou seja, o dobro da quantidade de metanol utilizada anteriormente).

Na seqüência, o extrato foi lavado uma vez com 1,9 mL de água ultra pura. O sistema bifásico formado foi submetido a uma intensa agitação, até não serem mais distinguíveis as duas fases (forma-se, momentaneamente, uma emulsão). Nesta etapa, substâncias com maior afinidade à água do que ao solvente orgânico são solubilizadas no meio aquoso e, portanto, se separam dos lipídios.

Após a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido com o auxílio de uma micropipeta, cuidando-se para não retirar o que se encontrava abaixo.

Em seguida, foi adicionado o FSP (CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,8 mM, NaCl 49,7 mM, clorofórmio 3,0%, metanol 49,0%, água ultra pura 48,0%), lentamente, (para evitar a formação de emulsão) e de maneira que as paredes do tubo fossem lavadas com esta solução. Após a remoção do sobrenadante, este procedimento foi repetido mais duas vezes.

A mistura de clorofórmio e metanol, na qual estavam dissolvidos os lipídios, foi evaporada em banho-maria a 37°C sob corrente de nitrogênio. O extrato lipídico seco foi armazenado a -80°C em atmosfera de nitrogênio. Para a determinação da bioatividade de PAF (tópico 3.10), esses extratos foram solubilizados em 100 µL de DMSO, sob agitação intensa.

3.9 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES (PMN) DE EQUINOS

O sangue de cavalo foi colhido em bolsas de transfusão (CPDA-1, JP Indústria Farmacêutica SA, São Paulo, Brasil), através de punção venosa jugular.

O sangue foi diluído 1:1 (v/v) em PBS e 40 mL do sangue diluído foram adicionados a tubos para centrífuga estéreis (tubos Falcon de 50 mL) sobre 8 mL de Ficoll Paque Plus e centrifugado (400g por 40 minutos a 4^oC), para o isolamento das células PMN por gradiente.

Após a centrifugação, a camada superior, composta por plasma, solução de Ficoll, e células mononucleares, foi descartada. A camada inferior, composta principalmente por PMNs e eritrócitos, foi dividida em duas alíquotas iguais, as quais foram separadas em dois tubos para centrífuga. A cada alíquota foi adicionada solução hemolítica (NH₄Cl 0,77%, tris[hydroxymethyl]aminomethane 0,21%, pH 7.4, solução aquosa) para completar 50 mL e incubadas por 20 minutos a 37^oC em estufa.

A seguir, a suspensão celular livre dos eritrócitos foi centrifugada (400g, 6 min, 4^oC). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células (basicamente PMNs) foi ressuspenso em 5 mL de PBS contendo glucose 5 mM. A densidade de células foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada para 1,0 x 10⁷ células viáveis/mL.

A viabilidade celular foi determinada através do corante vital Azul de Tripán e resultou aproximadamente 95%. A percentagem de neutrófilos na suspensão de PMNs foi superior a 90% determinada pela coloração de Romanowski (Panótico, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil).

3.10 MENSURAÇÃO DO INFLUXO DE Ca⁺⁺ EM PMNS INDUZIDO POR PAF (BIOATIVIDADE DE PAF) (MARATHE et al., 2001)

À suspensão de PMNs (tópico 3.9) na densidade de 1,0 x 10⁷ células viáveis/mL, foi adicionado FURA-2 AM (Sigma, solução estoque 1 nM em DMSO), para concentração final de 1 µM. A suspensão foi incubada em ambiente escuro a 37^oC por 45 minutos.

Nesta etapa, os PMNs incorporaram o FURA-2 AM, um indicador fluorescente de cálcio. Quando o FURA-2 AM está ligado ao Ca⁺⁺, há redução da eficiência de

excitação a 380 nm e aumento da eficiência de excitação a 340 nm, observados no comprimento de onda de emissão de 510 nm. Com isso, é possível quantificar a concentração de Ca^{++} intracelular nas células carregadas com FURA-2 AM através da relação da intensidade de emissão a 510 nm entre os comprimentos de onda de excitação de 340 nm e de 380 nm (relação 340:380 nm).

Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução de Ringer (NaCl 142.5 mM, KCl 4,0 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1,8 mM, 5,0 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, glicose 5,0 mM, pH 7.4, solução aquosa), para a remoção do FURA-2 AM que não foi incorporado às células.

As células então foram ressuspensas em solução de Ringer para uma concentração final de $2,25 \times 10^6$ células viáveis/mL. Esta foi a preparação utilizada na leitura de fluorescência.

A suspensão de células foi mantida em gelo até a sua utilização. Alíquotas de 2 mL, eram previamente incubadas em banho-maria por 4 minutos a 37°C no escuro (tubo envolto em papel alumínio), previamente a serem transferidas para uma cubeta para a leitura da fluorescência em espectrofluorímetro acoplado a um microcomputador (RF5301PC, Shimadzu, Kyoto, Japão) controlado pelo software Super Ion Probe (Shimadzu, Kyoto, Japão). Durante esta incubação, as células que seriam utilizadas como controle negativo para PAF foram tratadas com antagonista de receptor de PAF, BN52021 (Biomol, solução 10 mM em DMSO).

Foi utilizada excitação dual com comprimentos de onda 340 nm e 380 nm (janela de leitura de 2 segundos) com emissão registrada a 510 nm. A temperatura foi mantida em 37°C pelo sistema termostatisado do aparelho. A leitura da fluorescência consistiu primeiramente da obtenção de uma linha de base nos primeiros 50 segundos. Após esta leitura inicial, foram adicionados 10 μL do extrato lipídico (tópico 3.8) à suspensão de células, seguindo-se a agitação (por 3 segundos) com uma barra magnética presente dentro da cubeta. A leitura foi feita então por mais 100 segundos.

Para cada amostra, foram realizados os procedimentos descritos na presença e na ausência de BN52021. A resposta máxima obtida pelo tratamento da suspensão de PMNs com extrato lipídico na presença de BN52021 foi subtraída da resposta máxima obtida na ausência deste antagonista. O resultado desta subtração foi utilizado como indicador semiquantitativo da bioatividade de PAF no extrato lipídico e os resultados foram expressos como relação 340:380 nm.

Antes de analisar as amostras de extrato lipídico para a bioatividade de PAF, a cada experimento a suspensão de PMNs tratada com FURA-2 AM foi testada com PAF (1-*O*-palmitil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, solução estoque de 3 mM em DMSO, da Sigma), nas concentrações de 1, 10 e 100 nM e com 100 nM na presença de 150 μ M de BN52021 (concentração suficiente para antagonizar 10² nM de PAF). A resposta dos PMNs de equinos aos padrões de PAF é mostrada na FIGURA 11, sendo representativa dos dados obtidos em todos os experimentos.

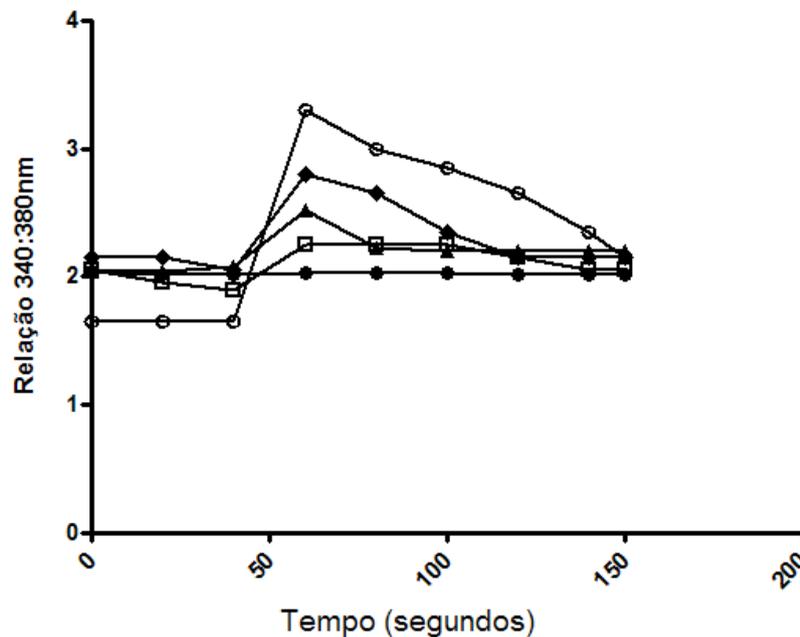


FIGURA 11 – REGISTRO DA FLUORESCÊNCIA CAUSADA PELO INFLUXO DE Ca⁺⁺ EM CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES (PMN) DE EQUINOS (2,25 x 10⁶ CÉLULAS PMN/mL SUSPENSÃO), MENSURADA COMO RELAÇÃO 340:380 nm COM EMISSÃO REGISTRADA A 510 nm. (●) SUSPENSÃO DE PMN; (▲) SUSPENSÃO DE PMN + PAF 1 nM; (◆) SUSPENSÃO DE PMN + PAF 10 nM; (◊) SUSPENSÃO DE PMN + PAF 100 nM; (□) SUSPENSÃO DE PMN + BN52021 150 μ M + PAF 100 nM. A EMISSÃO BASAL DAS CÉLULAS PMN FOI REGISTRADA POR 50 SEGUNDOS PREVIAMENTE À ADIÇÃO DE PAF.

Os PMNs do sangue de equinos, foram utilizados no presente estudo como uma ferramenta para a avaliação da bioatividade de PAF (pelo influxo de Ca⁺⁺ nos PMNs induzido por PAF). Para a determinação da viabilidade desta ferramenta, estudou-se a resposta dos PMNs do sangue de equino a diferentes concentrações de PAF (0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM), na presença e na ausência do antagonista de PAF BN52021, avaliando-se a fagocitose de neutrófilos e a produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio por neutrófilos pelas técnicas descritas

abaixo (ver tópicos 3.15 – fagocitose de macrófago alveolar, 3.16 – produção de ânion superóxido por macrófago alveolar e 3.17 – produção de peróxido de hidrogênio por macrófago alveolar), sendo que para cada ensaio foram realizadas quatro repetições. Igualmente, estudou-se a resposta do macrófago alveolar a diferentes concentrações de PAF (0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM), na presença e na ausência do antagonista de PAF BN52021, avaliando-se a fagocitose e a produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, também realizando-se quatro repetições para cada análise.

3.11 CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS DO LBA (BRADFORD, 1976)

Em microplaca de 96 poços, 250µL de reagente de Bradford (100mg de Coomassie Blue, 50 mL de etanol 95% + 100 mL de ácido fosfórico 85%, completar com água ultra pura para 1000 mL) foi adicionado a 10 µL de LBA sem células (sobrenadante obtido após a primeira centrifugação do LBA durante seu processamento (ver tópico 3.6 - Colheita e Processamento do LBA). Nesta etapa, o corante Comassie é complexado por proteínas presentes na amostra, o que muda a sua cor.

Após 5 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada a 595 nm, utilizando-se um espectrofotômetro para micro placas (Benchmark, Bio-Rad Laboratórios do Brasil, Rio de Janeiro). A concentração de proteínas foi determinada interpolando-se os valores de absorbância numa curva padrão resultante de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (Sigma). Os resultados foram expressos como miligramas de proteínas por mililitro de LBA.

3.12 CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS DO LBA (STUEHR e MARLETTA, 1985)

A concentração de nitritos no LBA foi utilizada como indicador da produção de óxido nítrico na região broncoalveolar.

Em micro placa de 96 poços, adicionou-se 100 µL de reagente de Griess (mistura de cloreto de naftiletlenodiamina a 0,05% e por sulfanilamida a 0,5%, em meio ácido proporcionado por H₃PO₄ a 2,5%) a 100 µL de LBA sem células (sobrenadante obtido após a primeira centrifugação do LBA durante seu processamento (ver tópico 3.6 - Colheita e Processamento do LBA).

A sulfanilamida (um derivado de anilina) reage com o ácido nitroso e, após rearranjos intramoleculares, forma o íon diazônio. Após, o íon diazônio reage com a naftiletilenodiamina (um derivado de naftilamina) para formar pigmento róseo.

Depois de 5 minutos na temperatura ambiente, a absorvância foi mensurada a 550 nm utilizando-se um espectrofotômetro para micro placas (Benchmark, Bio-Rad Laboratórios do Brasil, Rio de Janeiro). Os resultados foram expressos como absorvância a 550 nm.

3.13 CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS DO LBA (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994)

Utilizou-se uma alíquota de suspensão de células de LBA na densidade de $1,5 \times 10^6$ células/mL de LBA. Esta foi ultrasonicada (6 ciclos de 4 segundos) em 1 mL de metanol, sendo centrifugada em seguida a 5.000g por 5 minutos a 4°C (Centrifuge 5810 R Eppendorf, Bloomington, IN, EUA).

Uma alíquota de 50 µL de sobrenadante foi armazenada para posterior mensuração da concentração total de proteínas.

Para cada amostra, alíquotas de 90 µL foram depositadas em seis frascos para centrifuga (de 1,5 mL, Eppendorf), foi agitada no vórtex e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. A três desses tubos foram adicionados 10 µL de solução metanólica de trifenilfosfina (TPP, Sigma) 10 mM, para ocorrer a redução seletiva de hidroperóxidos (os grupamentos hidroperóxido, especificamente os presentes em lipídios, são convertidos a grupamentos hidroxila pela trifenilfosfina). As amostras contidas nos três tubos restantes receberam apenas 10 µL de metanol. Todos os tubos foram agitados vigorosamente e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos.

Após, adicionou-se a todos os tubos 900 µL de reagente de FOX2. Este reagente deve ser preparado no momento do uso, consistindo de xilenol laranja 100 µM, hidroxitolueno butilado (BHT) 400 mM, ácido sulfúrico 25 mM e sulfato ferroso de amônio 250 µM, em metanol 90% (v:v, em água). Após agitação, o meio reacional foi incubado por mais 30 minutos a temperatura ambiente.

Nesta etapa, os cátions ferrosos (Fe^{2+}) do reativo de FOX2 são oxidados por hidroperóxidos presentes na amostra (tanto pelos hidroperóxidos lipídicos quanto por outros tipos de hidroperóxidos presentes na amostra). Como todos os

hidroperóxidos lipídicos das amostras tratadas com TPP foram reduzidos, a produção de Fe^{3+} será menor nestas do que nas amostras não tratadas com TPP.

O Fe^{3+} formado é então quelado pelo xilenol laranja, o que faz a cor deste indicador passar de laranja a azul-púrpura (passa a absorver luz em 560 nm).

Passado o tempo de incubação, a absorbância foi mensurada a 560 nm utilizando-se um espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech do Brasil, São Paulo).

Subtraiu-se então o valor da absorbância das amostras tratadas com TPP (sem hidroperóxidos lipídicos) do valor da absorbância das amostras sem TPP. O valor obtido nessa subtração (referente apenas à quantidade de ferro oxidado por hidroperóxidos lipídicos) foi utilizado na fórmula da curva padrão de peróxido de hidrogênio, obtida com soluções padrão de diferentes concentrações (100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.2, 3.1 e 1.6 μM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). O resultado obtido foi referente à concentração de hidroperóxidos lipídicos.

Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos lipídicos pela concentração de proteínas totais do extrato metanólico. Os resultados foram expressos como nmoles/mg de proteínas.

3.14 ATIVIDADE DA CATALASE NAS CÉLULAS DO LBA (AEBI, 1984)

Utilizou-se 300 μL de uma suspensão de células de LBA em PBS, na densidade de 5×10^6 células/mL, que foram centrifugados (10.600g por 20min a 4°C) para remoção de partículas.

Após, foi colocada em banho com gelo. Uma alíquota de 10 μL desse extrato de células foi adicionada a 990 μL de meio reativo (solução aquosa de H_2O_2 20 mM, tris[hidroximetil] aminometano 0,05M e EDTA 0,25 mM, pH 7,4).

Imediatamente, utilizando-se um espectrofotômetro acoplado a um microcomputador (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech do Brasil, São Paulo), monitorou-se a absorbância a 220 nm por 90 segundos, a 37°C , com intervalos de 2 segundos entre leituras consecutivas.

A degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase causa uma diminuição gradual na absorbância do meio reativo a 220 nm, a qual indica a atividade da catalase no extrato de células. Os valores de atividade da catalase foram corrigidos

pela concentração de proteínas do extrato de células (realizado conforme descrito no tópico 3.11) e foram expressos como μmoles de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteínas.

3.15 FAGOCITOSE DE MACRÓFAGO ALVEOLAR (DYRYNDA et al., 1998)

Em micro placas de 96 poços, adicionou-se, em triplicatas, alíquotas de $100\mu\text{L}$ de uma suspensão contendo 5×10^6 células viáveis/mL ($= 5 \times 10^5$ células/poço) e os macrófagos foram deixados para aderir por 1 hora a 37°C . A suspensão de células na densidade descrita foi obtida durante o processamento do LBA (ver tópico 3.7).

Após, os poços foram lavados duas vezes com PBS e foram adicionados $20\mu\text{L}$ de zymosan corado com vermelho neutro ($6,7 \text{ mg/mL}$) mais $100 \mu\text{L}$ de PBS, sendo deixados a temperatura ambiente por 30 minutos.

Em seguida, depois de descartado o sobrenadante, as células foram fixadas com solução de Baker (4% formaldeído, 2% cloreto de sódio, 1% acetato de cálcio, solução aquosa) por 30 minutos.

Após, os poços foram lavados com PBS para que o zymosan corado com vermelho neutro, não fagocitado por macrófagos alveolares, fosse retirado.

Em seguida, o corante vermelho neutro foi solubilizado, em cada poço, com $200\mu\text{L}$ de solução ácido-álcool (ácido acético 1%, etanol 50%, solução aquosa) e deixado por 30 minutos.

Após este período a absorbância foi mensurada a 550 nm . Os resultados foram corrigidos pela adesão de macrófago alveolar de cada potro (ver tópico 3.18 - Adesão de Macrófago Alveolar).

3.16 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR (DYRYNDA et al., 1998):

Estimou-se a produção de ânions pela da formação de formazan, produto da redução do NBT (*nitroblue tetrazolium*) pelo ânion superóxido. Avaliou-se a produção de ânion superóxido por macrófago alveolar não estimulado e estimulado por PMA (*phorbol myristate acetate*). O PMA estimula o complexo NADPH oxidase na membrana dos fagócitos, a produzir ânion superóxido e peróxido de hidrogênio,

mimetizando o resultado da fagocitose de um microorganismo (DEKKER et al., 2000).

Em micro placas de 96 poços, adicionou-se, em triplicatas, alíquotas de 100µL de uma suspensão contendo 5×10^6 células/mL (= 5×10^5 células/poço) e os macrófagos foram deixados para aderir por 1 hora a 37°C. A suspensão de células na densidade descrita foi obtida durante o processamento do LBA (ver tópico 3.7).

Após, os poços foram lavados duas vezes com PBS, para a retirada das células não aderentes. Em seguida, adicionou-se a cada poço 100 µL de PBS com NBT 0,2% ou com NBT 0,2% mais PMA 1,1µM, sempre em triplicatas para cada potro.

Após a incubação por 1 hora a 37°C e em ambiente escuro (a placa deve estar envolta em papel alumínio), a placa foi centrifugada (800g por 5 minutos a 4°C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de PBS foram adicionados a cada poço e a placa foi novamente centrifugada.

Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com metanol por 10 minutos. Em seguida, a placa passou por nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a placa foi deixada secar ao ar em estufa.

Em seguida, a placa foi lavada duas vezes com metanol 50% e o formazan (produto da reação entre o NBT e o ânion superóxido) foi solubilizado através da incubação por 30 minutos com 120 µL solução aquosa de hidróxido de potássio 2M e 140 µL de dimetilsulfóxido, por poço.

A absorbância foi lida a 595 nm e os resultados foram corrigidos pela adesão de macrófago alveolar de cada potro (ver tópico 3.18 - Adesão de Macrófago Alveolar).

3.17 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) POR MACRÓFAGO ALVEOLAR (PICK e MIZEL, 1981):

Mensurou-se a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófago alveolar, não estimulado e estimulado por PMA, através da oxidação do vermelho fenol pela peroxidase, onde esta enzima utiliza, nesta reação, o H₂O₂. O composto oxidado absorve luz, em pH básico, com máxima intensidade em 550 nm.

Em micro placas de 96 poços, adicionou-se, em triplicatas, alíquotas de 100µL de uma suspensão contendo 5×10^6 células/mL (= 5×10^5 células/poço) e os macrófagos foram deixados para aderir por 1 hora a 37°C. A suspensão de células na densidade descrita foi obtida durante o processamento do LBA (ver tópico 3.7).

Após, os poços foram lavados duas vezes com PBS observando-se a retirada de grumos presentes nos poços. Em seguida, 100 µL de solução de vermelho fenol (PRS, *phenol red solution*; 140 mM NaCl, 10 mM fosfato de potássio, 5.5 mM dextrose, 0.56 mM vermelho fenol, 19 U/mL de HRPO, *horse radish peroxidase*, pH 7.0, solução aquosa) ou solução de vermelho fenol + PMA 110nM foram adicionados a cada poço, em triplicatas, e deixados incubar por 1 hora a 37°C no escuro.

Após o período de incubação, adicionou-se 10 µL de NaOH 1N para interromper a reação, alcalinizar o meio e permitir a absorvância da solução, que foi lida a 595 nm após 30 minutos.

Os resultados foram corrigidos pela adesão de macrófago alveolar de cada potro (ver tópico 3.18 - Adesão de Macrófago Alveolar).

3.18 ADESÃO DE MACRÓFAGO ALVEOLAR (ROSEN e GORDON, 1987)

Em micro placas de 96 poços, adicionou-se, em triplicatas, alíquotas de 100µL de uma suspensão contendo 5×10^6 células/mL (= 5×10^5 células/poço) e os macrófagos foram deixados para aderir por 1 hora a 37°C. A suspensão de células na densidade descrita foi obtida durante o processamento do LBA (ver tópico 3.7).

Após, os poços foram lavados duas vezes com PBS para se selecionar as células aderentes, que a seguir foram fixadas com metanol 50% por 10 minutos.

Após este período, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de corante de Giemsa a 0,2% foram adicionados a cada poço e deixados por 40 minutos, em temperatura ambiente.

Os poços foram novamente lavados com PBS, por duas vezes observando-se a retirada de grumos nos poços, e 200 µL de metanol 50% foram adicionados.

Após 30 minutos, a absorvância da suspensão foi lida a 550 nm.

A adesão resultou menor no grupo DA (n=17) em comparação ao grupo CN (n=36) (P=0,010), sendo que o grupo EX (n=26) apresentou adesão maior que o grupo DA (P=0,001) (FIGURA 12), indicando diferenças na capacidade de adesão em placa acrílica, possivelmente devido a diferenças no estado funcional das células

de cada grupo. Por esta razão utilizou-se o ensaio de adesão de macrófago alveolar, realizado concomitantemente aos ensaios de função de macrófago (fagocitose e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), a cada experimento realizado durante o estudo. A correção dos valores obtidos de macrófago, em função da adesão, foi feita através da divisão da média final obtida para o ensaio de função de macrófago dividido pela média obtida no ensaio de adesão, para cada potro avaliado e a cada experimento realizado.

Adesão de Macrófago Alveolar

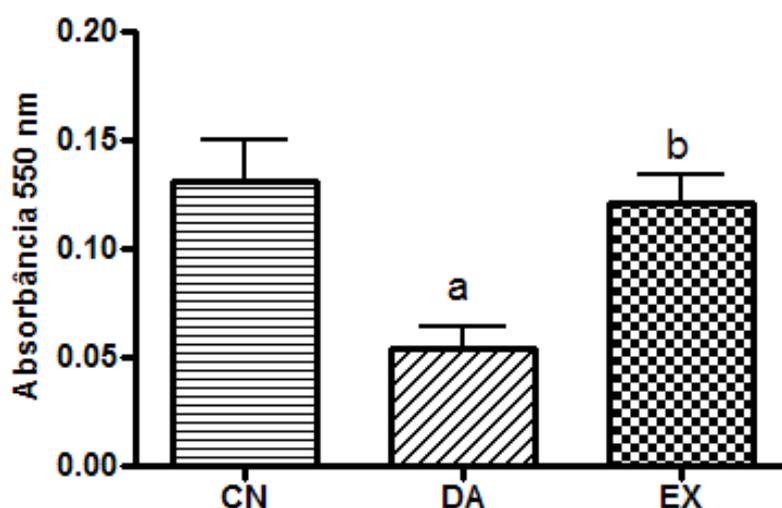


FIGURA 12 – ADESÃO DE MACRÓFAGO ALVEOLAR EM MICRO PLACA ACRÍLICA DE 96 POÇOS UTILIZANDO CORANTE DE GIEMSA A 0,2% (ROSEN e GORDON, 1987). ^aP=0,010 vs. CN e ^bP=0,001 vs. DA.

3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de D'Agostino e Pearson. Valores considerados *outliers* pelo teste de Grubb foram excluídos das análises. Para os dados que apresentaram distribuição normal dos valores (distribuição Gaussiana) (contagem percentual de linfócitos, concentração total de proteínas do LBA, bioatividade de PAF, catalase, hidroperóxidos, nitritos, fagocitose de macrófago alveolar, produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio por macrófago alveolar) foi utilizado o teste *t* não pareado. Os dados com distribuição não Gaussiana dos valores (contagens percentuais de neutrófilos, de

eosinófilos e de macrófagos multinucleados, contagem do NTCN do LBA e adesão de macrófago alveolar) foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. A comparação entre os resultados obtidos de função de macrófago alveolar, estimulado e não estimulado por PMA, foi feita por teste *t* de Student não pareado. Os achados clínicos e endoscópicos foram analisados por meio de teste de Mann-Whitney. A correlação entre o percentual de um mesmo tipo celular no aspirado traqueal e no lavado broncoalveolar, foi analisada através do teste de Spearman. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e os valores apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Valores de $P < 0,05$ foram considerados como significativos.

4 RESULTADOS

4.1 PRIMEIRA ETAPA DO ESTUDO

4.1.1 Avaliação Clínica

Nenhum dos potros dos grupos CN e DA apresentou tosse segundo o histórico obtido. Contudo, oito potros (23,5%) do grupo EX apresentaram tosse espontânea na cocheira ou durante o treinamento, o que resultou em diferença significativa em relação ao grupo DA ($P=0,002$) (TABELA 1).

A presença de corrimento nasal seroso (coriza), observada nos três grupos estudados, está demonstrada na TABELA 1. Não houve diferença significativa entre os grupos, apesar de o percentual de potros com coriza no grupo DA ter reduzido em relação ao grupo CN ($P=0,068$) (TABELA 1).

Os linfonodos submandibulares e/ou retrofaringeanos estiveram aumentados em 38,2%, 22,2% e 38,2% dos potros dos grupos CN, DA e EX, respectivamente, não havendo diferença entre os grupos (TABELA 1).

A auscultação cardíaca e traqueal resultou normal em todos os potros avaliados dos três grupos estudados. Contudo, sons pulmonares crepitantes foram audíveis em 2,8%, 15,6% e 11,5% dos potros avaliados nos grupos CN, DA e EX, respectivamente, havendo um aumento do percentual de crepitação pulmonar nos potros do grupo DA em relação ao grupo CN ($P=0,068$) (TABELA 1).

TABELA 1 – PRINCIPAIS INDICADORES DE EXAME CLÍNICO PARA OS TRÊS GRUPOS AVALIADOS DE POTROS PURO SANGUE INGLÊS DE CORRIDA.

Grupos	Tosse	Corrimento	Linfonodos	Auscultação
	Espontânea	Nasal		Pulmonar
CN	0/34	15/34	13/34	1/36
	(0%)	(44,1%)	(38,2%)	(2,8%)
DA	0/45	11/45	10/45	7/45
	(0%)	(24,4%)	(22,2%)	(15,6%)
EX	8/34	15/34	13/34	3/26
	(23,5%) ^a	(44,1%)	(38,2%)	(11,5%)

^a $P=0,002$ vs. DA.

4.1.2 Avaliação Endoscópica das Vias Aéreas

No início da avaliação endoscópica das vias aéreas, primeiramente considerando os folículos linfóides faríngeanos ou hiperplasia folicular linfóide (HFL), a distribuição das diferentes graduações pode ser vista na TABELA 2.

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS FOLÍCULOS LINFÓIDES FARÍNGEANOS OBSERVADOS POR EXAME ENDOSCÓPICOS E GRADUADOS DE I A IV SEGUNDO RAKER E BOLES (1978).

Grupos	HFL I	HFL II	HFL III	HFL IV
CN	1/33 (3%)	14/33 (42,4%)	18/33 (54,6%)	0 (0%)
DA	5/42 (11,9%)	25/42 (59,5%)	11/42 (26,2%)	1/42 (2,4%)
EX	2/26 (7,7%)	10/26 (38,4%)	12/26 (46,2%)	2/26 (7,7%)

Considerando as graduações de HFL III e IV como faringite, esta anormalidade foi observada em 54,6%, 28,6% e 53,9% dos potros dos grupos CN, DA e EX, respectivamente. Houve uma significativa redução no percentual médio de observações de faringite para o grupo DA em comparação ao grupo CN ($P=0,024$), enquanto no grupo EX, o percentual de faringites foi significativamente maior em relação ao grupo DA ($P=0,039$).

Com relação ao aspecto morfológico da epiglote, um potro do grupo DA e um potro do grupo EX evidenciaram epiglote com aspecto frágil, sendo que os demais potros foram normais.

Com relação à avaliação funcional da laringe todos os potros foram normais, apresentando graduações I ou II (TABELA 3).

TABELA 3 – OBSERVAÇÃO ENDOSCÓPICA DOS MOVIMENTOS DAS CARTILAGENS ARITENÓIDES, DE ACÓRDO COM RAKESTRAW et al. (1991).

Grupos	NLP I	NLP II	NLP III	NLP IV
CN	27/33 (81,8%)	6/33 (18,2%)	0 (0%)	0 (0%)
DA	39/42 (92,9%)	3/42 (7,1%)	0 (0%)	0 (0%)
EX	24/27 (88,9%)	3/27 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)

A quantidade de secreção observada no lume traqueal está demonstrada na TABELA 4.

TABELA 4 – QUANTIDADE DE SECREÇÃO TRAQUEAL OBSERVADA ATRAVÉS DE EXAME ENDOSCÓPICO, NOS POTROS PURO SANGUE INGLÊS DOS GRUPOS CN, DA E EX DURANTE AVALIAÇÃO EM REPOUSO, E GRADUADA DE 0 a 5 SEGUNDO GERBER et al. (2004).

Grupos	0	1	2	3	4	5
CN	2/33 (6,1%)	9/33 (27,3%)	9/33 (27,3%)	11/33 (33,2%)	2/33 (6,1%)	0/33 (0%)
DA	7/42 (16,7%)	12/42 (28,6%)	12/42 (28,6%)	7/42 (16,7%)	3/42 (7,0%)	1/42 (2,4%)
EX	3/27 (11,1%)	7/27 (25,9%)	7/27 (25,9%)	6/27 (22,3%)	4/27 (14,8%)	0/27 (0%)

Quantidade de secreção traqueal acima de grau 2, considerada passível de prejuízo à troca gasosa e ao rendimento desportivo, foi observada em 66,6%, 54,7% e 63,0% dos potros dos grupos CN, DA e EX, respectivamente.

4.1.3 Citologia do Aspirado Traqueal (AT)

Os achados de análise citológica diferencial para os principais tipos celulares do AT, para os três grupos de potros estudados, estão demonstrados na TABELA 5.

TABELA 5 – CONTAGEM PERCENTUAL DOS PRINCIPAIS TIPOS CELULARES NO ASPIRADO TRAQUEAL (AT) DOS GRUPOS CN (n=20), DA (n=19) E EX (n=15). VALORES ESTÃO EXPRESSOS COMO PERCENTAGEM MÉDIA ± SEM.

Grupos	Mac	Lin	Neut	Eos	Mast	Calic	Multi	Epit	Sid
CN	42,9±6,3	7,5 ±1,9	7,6 ±2,9	1,2 ±0,7	0,02 ±0,2	0,5 ±0,2	0,2 ±0,1	20,1 ±5,6	0
DA	59,1 ±4,1	14,1 ±2,4	8,5 ±2,3	1,1 ±0,5	0	0,1 ±0,1	1,1 ±0,2 ^a	16,1 ±4,8	0
EX	59,3 ±4,2	13,4 ±2,3	17,1 ±4,9	0,9 ±0,3	0	0,5 ±0,3	0,8 ±0,3	7,1 ±3,2	0,9 ±0,4

Mac, macrófago alveolar; Lin, linfócitos; Neut, neutrófilos; Eos, eosinófilos; Mast, mastócitos; Calic, células calciformes; Multi, macrófagos multinucleados; Epit, células epiteliais; Sid, hemossideróforos. ^aP<0,001 vs. CN.

4.1.4 Colheita do Lavado Broncoalveolar (LBA)

As quantidades de LBA recuperado estiveram entre 54% e 59% do volume infundido, para os grupos CN (n=16), DA (n=23) e EX (n=16).

4.1.5 Contagem do Número Total de Células Nucleadas (NTCN) e Contagem Diferencial de Células do LBA

A contagem do NTCN e a contagem diferencial de células do LBA estão demonstradas na TABELA 6.

TABELA 6 – CONTAGEM DO NTCN E CONTAGEM PERCENTUAL DOS DIFERENTES TIPOS CELULARES DO LBA DOS GRUPOS CN (n=45), DA (n=40) E EX (n=34). VALORES ESTÃO EXPRESSOS COMO PERCENTAGEM MÉDIA \pm SEM.

	CTCN (células/ μ L de LBA)	Macróf %	Linfóc %	Neutróf %	Eosino %	Masto %	Macróf Multi %	Hemosid %
CN	39,5 \pm 3,8	67,3 \pm 1,7	29,4 \pm 1,5	2,3 \pm 0,4	0,5 \pm 0,3	0,05 \pm 0,04	0.4 \pm 0.1	0
DA	34,3 \pm 2,4	69,8 \pm 1,4	28,1 \pm 1,3	0,9 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	0,02 \pm 0,02	1.1 \pm 0.1 ^d	0
EX	45,6 \pm 2,8 ^a	67,6 \pm 1,8	22,9 \pm 1,5	5,4 \pm 1,1 ^b	1,5 \pm 0,7 ^c	0,2 \pm 0,1	1.3 \pm 0.2	2,2 \pm 0.6

CTCN = contagem total de células nucleadas; Macróf = macrófagos; Linfóc = linfócitos; Neutróf = neutrófilos; Eosino = eosinófilos; Masto = mastócitos; Macróf Multi = macrófagos multinucleados; Hemosid = hemossiderófilos. ^aP<0,01 vs. DA; ^bP<0,001 vs. DA; ^cP<0,05 vs. DA; ^dP<0,001 vs. CN.

Hemossiderófilos foram observados somente no LBA dos potros do grupo EX, mais especificamente em 23 (62,2%) deles, representando 2,2% do total de células. A quantidade observada de hemossiderófilos variou entre 0,4 e 15,2% da contagem citológica diferencial do LBA.

A correlação entre as contagens percentuais de um mesmo tipo celular no AT e no LBA foi analisada para os potros do grupo CN (n=11), DA (n=18) e EX (n=12) que tiveram material colhido para as duas técnicas citológicas, não tendo sido

encontrada correlação, entre ambas as técnicas de avaliação citológica, para nenhuma das células.

4.1.6 Resposta de Neutrófilos do Sangue de Equino Frente ao PAF

A resposta dos neutrófilos do sangue de equino frente ao PMA e frente ao PAF nas concentrações 0,1 nM, 1 nM, 10 nM e 100 nM, na ausência e na presença do antagonista de PAF BN52021, está demonstrado nas FIGURAS 13 a 15.

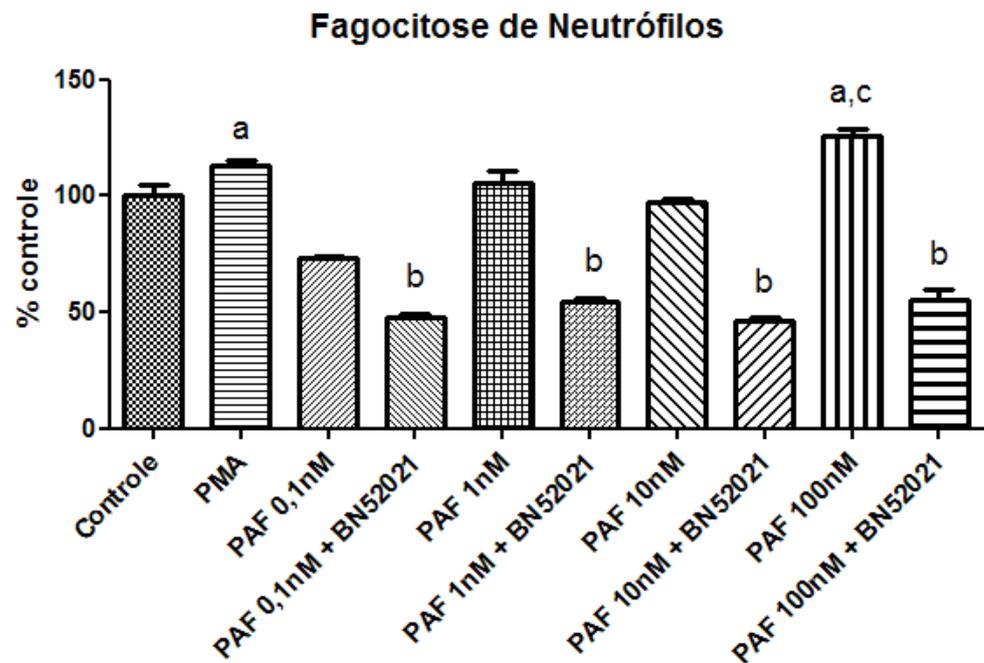


FIGURA 13 – FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF (BN52021). BN52021 INIBIU A FAGOCITOSE INDUZIDA POR TODAS AS CONCENTRAÇÕES DE PAF. ^aP=0,028 vs. controle; ^bP<0,001 vs. sem BN52021; ^cP=0,028 vs. PMA.

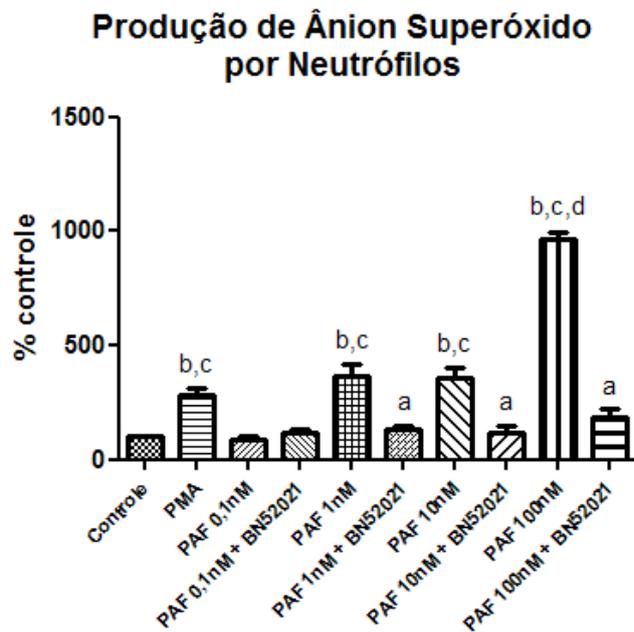


FIGURA 14 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF (BN52021). BN52021 INIBIU A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO INDUZIDA POR PAF NAS CONCENTRAÇÕES 1nM (^aP=0,007), 10nM (^aP=0,003) e 100nM (^aP<0,001). ^bP<0,001 vs. controle; ^cP<0,001 vs. PAF 0,1nM; ^dP<0,001 vs. PMA e PAF 1 e 10nM.

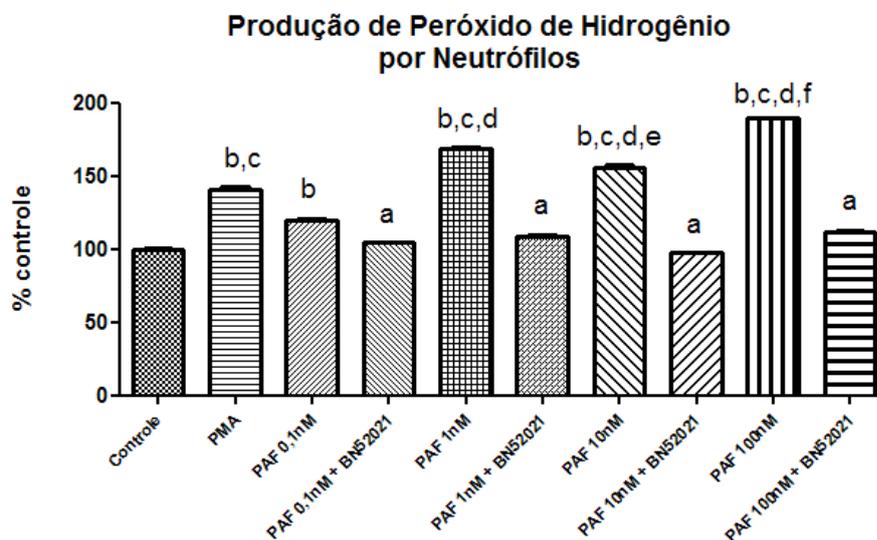


FIGURA 15 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF (BN52021). BN52021 INIBIU A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO INDUZIDA POR PAF EM TODAS AS CONCENTRAÇÕES (^aP<0,001). ^bP<0,001 vs. controle; ^cP<0,001 vs. PAF 0,1nM; ^dP<0,001 vs. PMA; ^eP<0,001 vs. PAF 1nM e ^fP<0,001 vs. PAF 1nM e 10nM.

4.1.7 Resposta de Macrófago Alveolar de Equino Frente ao PAF

Também se estudou a resposta dos macrófagos alveolares de equino frente ao PMA e frente ao PAF nas concentrações 0,1 nM, 1 nM, 10 nM e 100 nM, na ausência e na presença do antagonista de PAF BN52021, demonstrado nas FIGURAs 16 a 18.

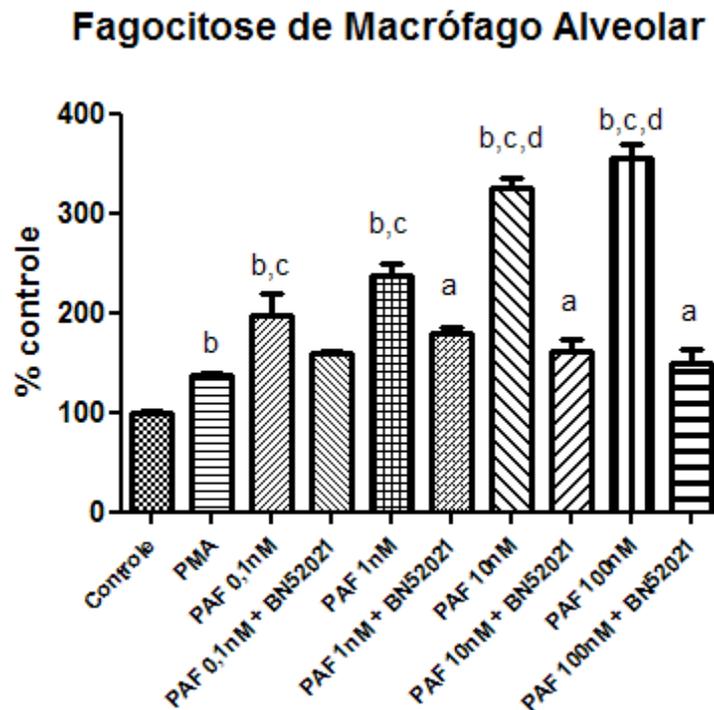


FIGURA 16 – FAGOCITOSE DE MACRÓFAGO ALVEOLAR DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF (BN52021). BN52021 INIBIU A FAGOCITOSE INDUZIDA POR PAF NAS CONCENTRAÇÕES 1nM (^aP=0,003), 10nM (^aP<0,001) e 100nM (^aP<0,001). ^bP<0,001 vs. controle; ^cP<0,010 vs. PMA; ^dP<0,001 vs. PAF 0,1nM e PAF 1nM.

Produção de Ânion Superóxido por Macrófagos Alveolares

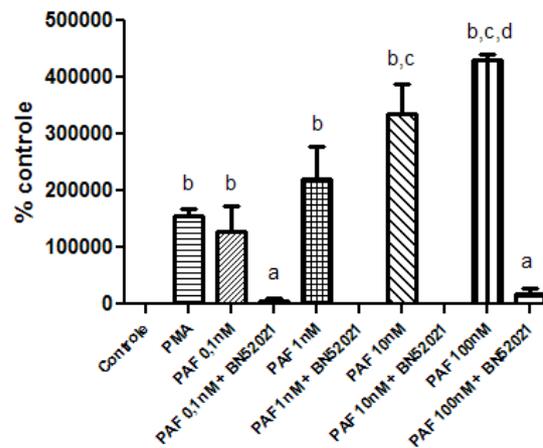


FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF (BN52021). BN52021 INIBIU A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO INDUZIDA POR PAF NAS CONCENTRAÇÕES 1nM ($^aP=0,037$) e 100nM ($^aP<0,001$). $^bP<0,001$ vs. controle; $^cP<0,001$ vs. PMA e PAF 0,1nM; $^dP<0,001$ vs. PAF 1nM.

Produção de Peróxido de Hidrogênio por Macrófagos Alveolares

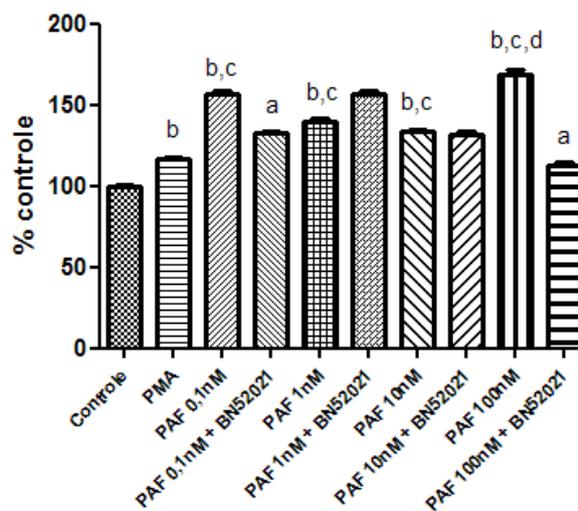


FIGURA 18 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DE EQUINO, ESTIMULADO POR PMA (400 nM) E CONCENTRAÇÕES DE PAF 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO ANTAGONISTA DE PAF (BN52021). BN52021 INIBIU A PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INDUZIDA POR PAF NAS CONCENTRAÇÕES 0,1nM e 100nM ($^aP<0,001$). $^bP<0,001$ vs. controle; $^cP<0,001$ vs. PMA; $^dP<0,01$ vs. PAF 1nM e 10nM.

4.1.8 Bioatividade de PAF no Extrato Lipídico das Células do LBA

A bioatividade de PAF no extrato lipídico das células do LBA dos três grupos foi mensurada pelo influxo de Ca^{++} em células PMN de equinos (FIGURA 19). Registrou-se uma baixa relação 340:380 nm para os grupos CN ($0,005 \pm 0,002$ relação 340:380 nm) e DA ($0,006 \pm 0,002$ relação 340:380 nm), representando um baixo nível de bioatividade de PAF no LBA dos potros avaliados nestes grupos. Contudo, a bioatividade de PAF do grupo EX ($0,068 \pm 0,02$ relação 340:380 nm) foi significativamente maior em comparação ao grupo DA ($P=0,017$). Um gráfico representativo da bioatividade de PAF em uma das amostras do grupo EX, na ausência e na presença do antagonista de PAF BN52021, pode ser visto na FIGURA 20.

Bioatividade de PAF no Extrato Lipídico das Células do LBA

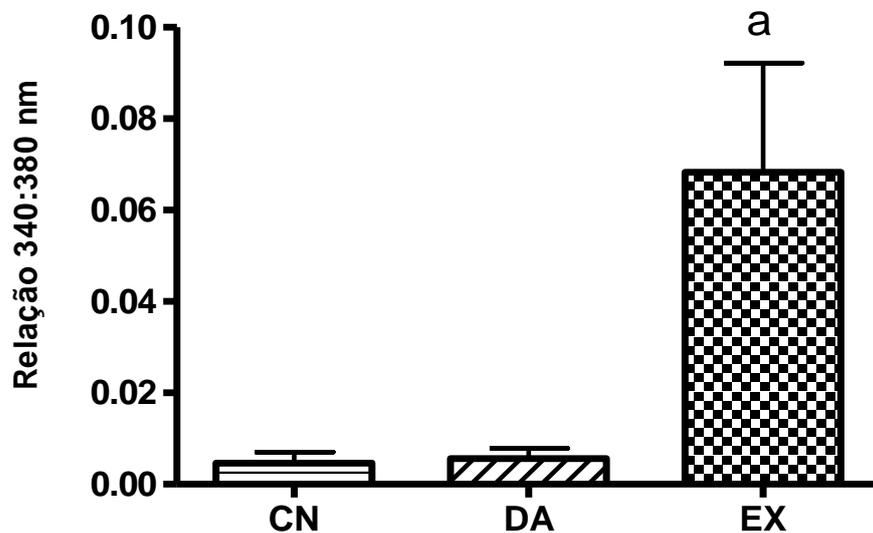


FIGURA 19 – BIOATIVIDADE DE PAF NO EXTRATO LIPÍDICO DAS CÉLULAS DO LBA DOS POTROS DOS GRUPOS CN (n=10), DA (n=10) E EX (n=10), MENSURADA ESPECTROFLUOROMETRICAMENTE PELO INFLUXO DE Ca^{++} EM CÉLULAS PMN DE EQUINOS E EXPRESSA COMO RELAÇÃO 340:380 nm. OS RESULTADOS SÃO PROVENIENTES DE AO MENOS TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. ^aP=0,017 vs. DA.

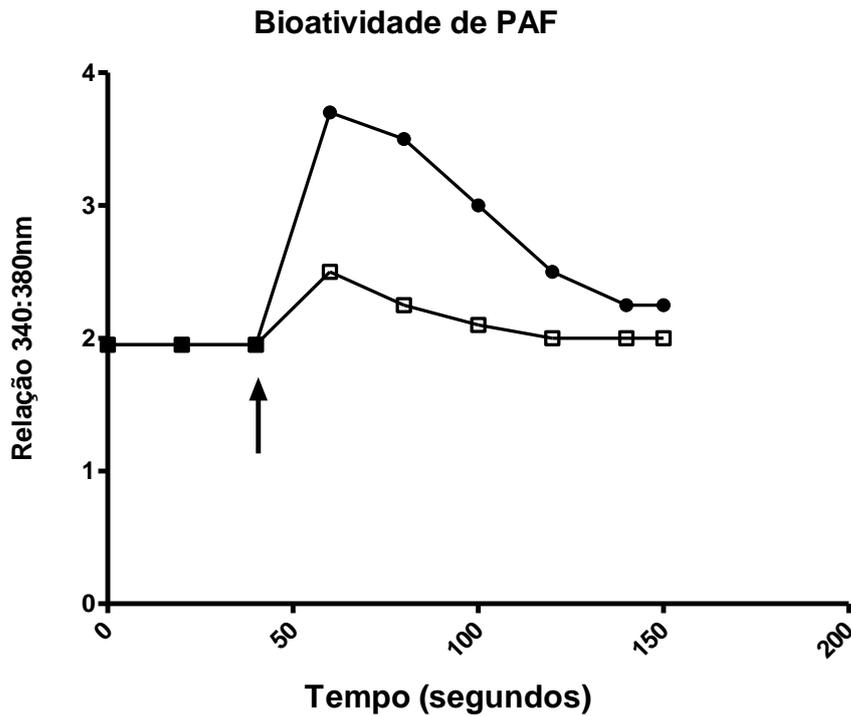


FIGURA 20 – GRÁFICO DEMONSTRANDO A BIOATIVIDADE DE PAF NO EXTRATO LIPÍDICO DAS CÉLULAS DO LBA DE UM POTRO DO GRUPO EX, NA AUSÊNCIA (●) E NA PRESENÇA DO ANTAGONISTA DE PAF BN52021 (□), MENSURADA ESPECTROFLUOROMETRICAMENTE PELO INFLUXO DE Ca^{++} EM CÉLULAS PMN DE EQUINOS E EXPRESSA COMO RELAÇÃO 340:380nm. A AMOSTRA É ADICIONADA À SUSPENSÃO DE CÉLULAS PMN APÓS 50 SEGUNDOS DE LEITURA BASAL (SETA).

4.1.9 Concentração Total de Proteínas no LBA

A concentração total de proteínas no LBA foi maior no grupo DA em relação ao grupo CN ($0,14 \pm 0,03$ vs. $0,03 \pm 0,01$ mg de proteínas/mL de LBA) ($P=0,001$). O grupo EX apresentou concentração total de proteínas no LBA ($0,36 \pm 0,06$ mg de proteínas/mL de LBA) significativamente maior em relação ao grupo DA ($P<0,001$) (FIGURA 21).

Concentração Total de Proteínas no LBA

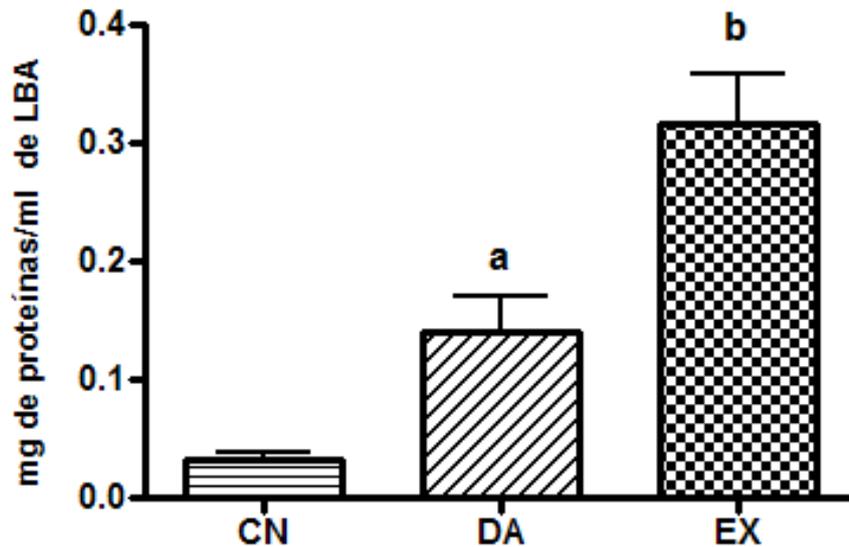


FIGURA 21 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS DO LBA DOS GRUPOS CN (n=25), DA (n=26) E EX (n=31), MENSURADA A PARTIR DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS OBTIDO APÓS A PRIMEIRA CENTRIFUGAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO DO LBA. OS RESULTADOS SÃO PROVENIENTES DE PELO MENOS QUATRO EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. ^aP=0,001 vs. CN; ^bP<0,001 vs. DA.

4.1.10 Concentração de Nitritos no LBA

A concentração de nitritos foi maior no LBA do grupo DA ($0,19 \pm 0,01$ absorbância 550 nm) em relação ao grupo CN ($0,14 \pm 0,01$ absorbância 550 nm) ($P=0,011$). O grupo EX apresentou uma redução significativa na concentração de nitritos no LBA ($0,08 \pm 0,01$ absorbância 550 nm), significativamente menor em comparação ao grupo DA ($P<0,001$) (FIGURA 22).

Concentração de Nitritos no LBA

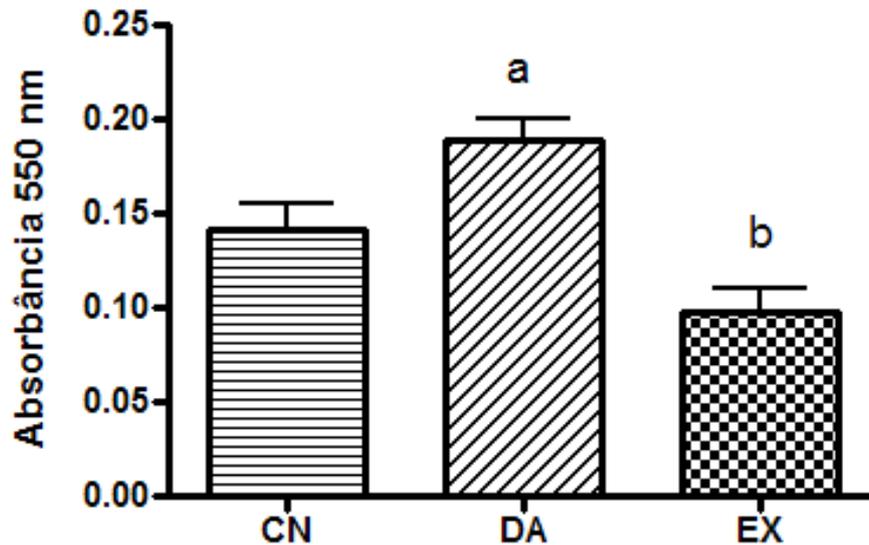


FIGURA 22 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS NO LBA PARA OS GRUPOS CN (n=22), DA (n=23) e EX (n=16) MENSURADO A PARTIR DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS OBTIDO APÓS A PRIMEIRA CENTRIFUGAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO DO LBA. OS RESULTADOS SÃO PROVENIENTES DE PELO MENOS QUATRO EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. ^aP=0,011 vs. CN; ^bP<0,001 vs. DA.

4.1.11 Concentração de Hidroperóxidos Lipídicos nas Células do LBA:

A concentração de hidroperóxidos lipídicos nas células do LBA foi significativamente maior no grupo DA em relação ao grupo CN ($104,7 \pm 24,1$ vs. $6,6 \pm 3,5$ nmoles/mg de proteínas) ($P < 0,001$). No grupo EX, a concentração de hidroperóxidos nas células do LBA apresentou redução em comparação ao grupo DA ($35,2 \pm 8,4$ vs. $104,7 \pm 24,1$ nmoles/mg de proteínas) ($P = 0,007$) (FIGURA 23).

Concentração de Hidroperóxidos Lipídicos no LBA

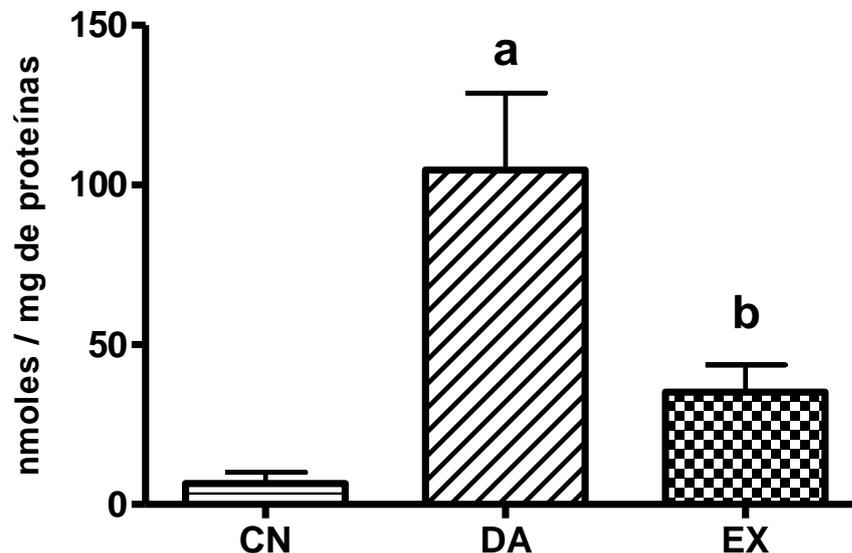


FIGURA 23 – CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS DO LBA DOS GRUPOS CN (n=14), DA (n=11) e EX (n=11), MENSURADO NO EXTRATO METANÓLICO DAS CÉLULAS DO LBA. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO NANOMOLES POR MILIGRAMA DE PROTEÍNA DO LBA E SÃO PROVENIENTES DE PELO MENOS TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. ^aP<0,001 vs. CN; ^bP=0,007 vs. DA.

4.1.12 Atividade da Catalase nas Células do LBA

No grupo EX, a atividade da catalase nas células do LBA foi significativamente maior em relação ao grupo DA ($0,24 \pm 0,05$ vs. $0,06 \pm 0,01$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas) ($P=0,002$), não havendo diferença entre os grupos CN e DA (FIGURA 24).

Atividade da Catalase nas Células do LBA

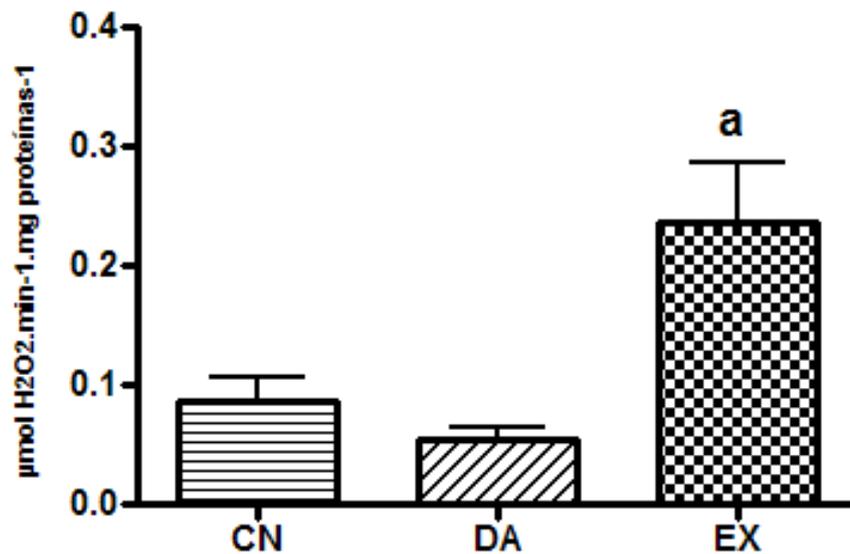


FIGURA 24 – ATIVIDADE DA CATALASE NAS CÉLULAS DO LBA DOS GRUPOS CN (n=10), DA (n=7) e EX (n=10). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO μMOL DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO/MINUTO/MILIGRAMA DE PROTEÍNAS DO LBA E SÃO PROVENIENTES DE PELO MENOS TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. ^aP=0,002 vs. DA.

4.1.13 Fagocitose de Macrófago Alveolar

A fagocitose de macrófago alveolar foi significativamente maior no grupo DA em comparação ao grupo CN ($2,23 \pm 0,43$ vs. $0,72 \pm 0,18$ absorvância 550 nm/adesão) ($P=0,002$). Observou-se uma diminuição na fagocitose no grupo EX em relação ao grupo DA ($1,04 \pm 0,27$ vs. $2,23 \pm 0,43$ absorvância 550 nm/adesão) ($P=0,006$) (FIGURA 25).

Fagocitose de Macrófago Alveolar

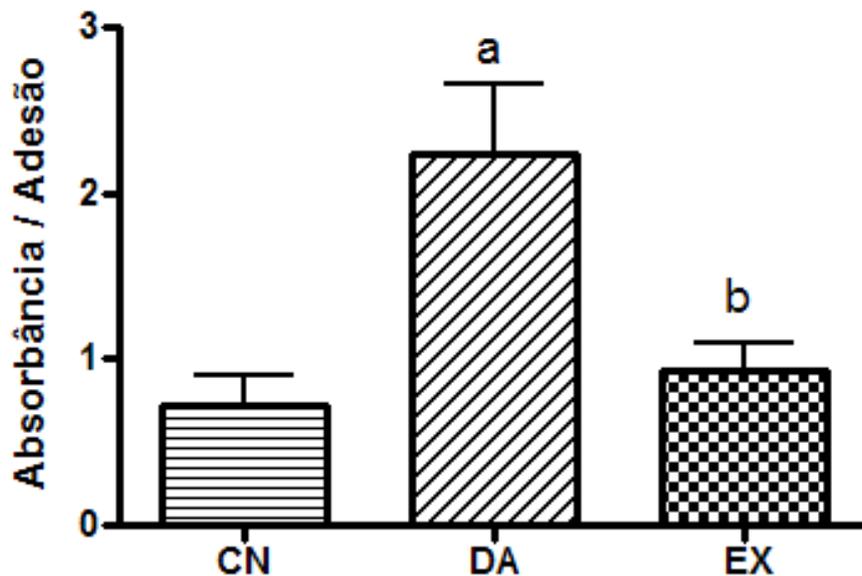


FIGURA 25 – FAGOCITOSE DE MACRÓFAGO ALVEOLAR NOS GRUPOS CN (n=14), DA (n=13) e EX (n=15). OS RESULTADOS SÃO PROVENIENTES DE PELO MENOS TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. EM CADA EXPERIMENTO, UM ENSAIO DE ADESÃO DE MACRÓFAGOS FOI CONDUZIDO PARALELAMENTE E AS MÉDIAS OBTIDAS PARA A FAGOCITOSE, PARA CADA POTRO, FORAM CORRIGIDAS PELA MÉDIA DA ADESÃO DE MACRÓFAGOS DO MESMO POTRO (FAGOCITOSE/ADESÃO). ^aP=0,002 vs. CN e ^bP=0,006 vs. DA.

4.1.14 Produção de Ânion Superóxido por Macrófago Alveolar

A utilização de PMA aumentou significativamente a produção de ânion superóxido pelos macrófagos alveolares dos grupos DA ($2,19 \pm 0,53$ vs. $3,92 \pm 0,62$ absorbância 595 nm/adesão) ($P=0,049$) e EX ($0,60 \pm 0,11$ vs. $0,90 \pm 0,14$ absorbância 595 nm/adesão) ($P=0,031$). A produção basal de ânion superóxido foi significativamente maior no grupo DA em relação ao grupo CN ($2,19 \pm 0,53$ vs. $0,25 \pm 0,07$ absorbância 595 nm/adesão) ($P<0,001$) enquanto o exercício resultou numa redução em comparação ao grupo DA ($0,60 \pm 0,11$ vs. $2,19 \pm 0,53$ absorbância 595 nm/adesão) ($P=0,001$). A produção de ânion superóxido estimulada por PMA foi significativamente maior no grupo DA em relação ao grupo CN ($3,92 \pm 0,62$ vs. $0,46 \pm 0,16$ absorbância 595 nm/adesão) ($P<0,001$), enquanto o exercício resultou numa

diminuição na produção de ânion superóxido em comparação ao grupo DA ($0,90 \pm 0,14$ vs. $3,92 \pm 0,62$ absorvância 595 nm/adesão) ($P < 0,001$) (FIGURA 26).

Produção de Ânion Superóxido por Macrófago Alveolar

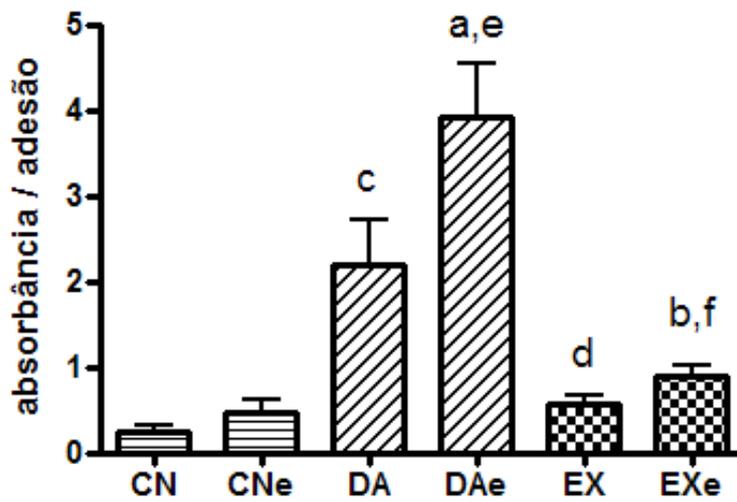


FIGURA 26 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR NOS GRUPOS CN (n=11), DA (n=9) e EX (n=14). OS RESULTADOS SÃO PROVENIENTES DE PELO MENOS TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. EM CADA EXPERIMENTO, UM ENSAIO DE ADESÃO DE MACRÓFAGOS FOI CONDUZIDO PARALELAMENTE E AS MÉDIAS OBTIDAS PARA A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO, PARA CADA POTRO, FORAM CORRIGIDAS PELA MÉDIA DA ADESÃO DE MACRÓFAGOS DO MESMO POTRO (PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO/ADESÃO). A PRODUÇÃO BASAL (CN, DA E EX) BEM COMO A PRODUÇÃO ESTIMULADA POR PMA (CNe, DAe e EXe) ESTÃO DEMONSTRADAS NA FIGURA. ^aP=0,049 vs. DA; ^bP=0,031 vs. EX; ^cP<0,001 vs. CN; ^dP=0,001 vs. DA; ^eP<0,001 vs. CNe; ^fP<0,001 vs. DAe.

4.1.15 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) por Macrófago Alveolar

O PMA aumentou a produção de H₂O₂ pelos macrófagos alveolares nos grupos CN ($0,41 \pm 0,08$ vs. $0,99 \pm 0,17$ absorvância 595 nm/adesão) ($P=0,004$), DA ($0,35 \pm 0,05$ vs. $0,96 \pm 0,17$ absorvância 595 nm/adesão) ($P=0,002$) e EX ($0,10 \pm 0,01$ vs. $0,34 \pm 0,08$ absorvância 595 nm/adesão) ($P < 0,001$). A produção basal de H₂O₂ para o grupo EX foi significativamente menor em relação ao grupo DA ($0,10 \pm 0,01$ vs. $0,35 \pm 0,05$ absorvância 595 nm/adesão) ($P < 0,001$). Além disso, a produção

de H₂O₂ estimulada por PMA diminuiu no grupo EX, tendo sido significativamente menor em relação ao grupo DA (0,34 ± 0,08 vs. 0,96 ± 0,17 absorvância 595nm/adeseão) (P=0,006) (FIGURA 27).

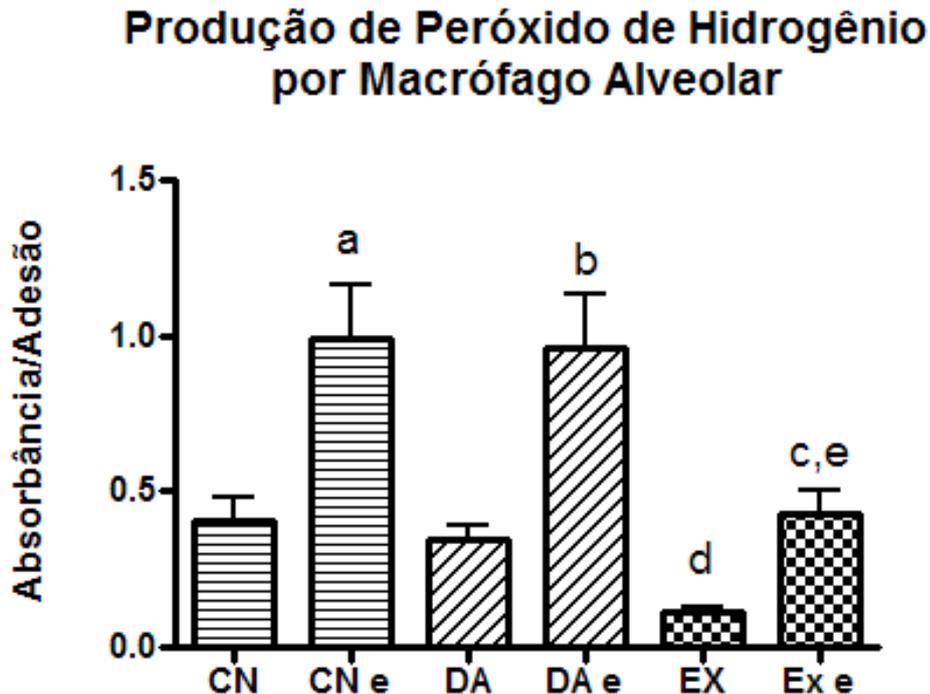


FIGURA 27 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGO ALVEOLAR NOS GRUPOS CN (n=19), DA (n=14) e EX (n=15). OS RESULTADOS SÃO PROVENIENTES DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES PARA CADA GRUPO. EM CADA EXPERIMENTO, UM ENSAIO DE ADESÃO DE MACRÓFAGOS FOI CONDUZIDO PARALELAMENTE E AS MÉDIAS OBTIDAS PARA A PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, PARA CADA POTRO, FORAM CORRIGIDAS PELA MÉDIA DA ADESÃO DE MACRÓFAGOS DO MESMO POTRO (PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO/ADESÃO). A PRODUÇÃO BASAL (CN, DA E EX) BEM COMO A PRODUÇÃO ESTIMULADA POR PMA (CNe, DAe e EXe) ESTÃO DEMONSTRADAS NA FIGURA. ^aP=0,004 vs. CN; ^bP=0,002 vs. DA; ^cP<0,001 vs. EX; ^dP<0,001 vs. DA; ^eP=0,006 vs. DAe.

4.2 SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO

4.2.1 Contagem do Número Total de Células Nucleadas (NTCN) e Contagem Diferencial de Células do LBA

Hemossiderófagos foram observados no LBA de 23 potros (62,2%), sendo que estes foram considerados no subgrupo HPIE pos. A quantidade observada de

hemossiderófagos variou entre 0,4% e 15,2%. A ausência de hemossiderófagos foi evidenciada em 14 potros (37,8%), sendo que estes foram considerados para o subgrupo HPIE neg.

Dentre os potros avaliados, 15 (40,5%) deles (10 potros do subgrupo HPIE pos e 5 potros do subgrupo HPIE neg) apresentaram mais de 5% de neutrófilos e/ou mais de 1% de eosinófilos na contagem diferencial de células, indicando um perfil citológico de LBA compatível com inflamação pulmonar.

Os valores do NTCN bem como da contagem diferencial de células, para o grupo EX e para os subgrupos, está demonstrado na TABELA 7.

TABELA 7 – CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS NUCLEADAS E CONTAGEM PERCENTUAL DOS PRINCIPAIS TIPOS CELULARES NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) DO GRUPO EX (n=37) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=23) E HPIE NEG (n=14).

	CTCN (células/ μ L de LBA)	Macróf %	Linfóc %	Neutróf %	Eosino %	Masto %	Siderof %
Grupo EX	45,6 \pm 2,8	67,6 \pm 1,8	22,9 \pm 1,5	4,7 \pm 1,0	1,3 \pm 0,6	0,2 \pm 0,1	2,2 \pm 3,5
HPIE pos	57,1 \pm 7,8 ^a	64,5 \pm 2,2 ^b	24,0 \pm 2,0	5,6 \pm 1,2	0,9 \pm 0,7	0,2 \pm 0,2	3,4 \pm 3,7
HPIE neg	34,8 \pm 3,8	72,5 \pm 3,0	20,7 \pm 2,5	3,5 \pm 1,8	1,9 \pm 1,1	0,3 \pm 0,1	0,0

CTCN, contagem total de células nucleadas; Macróf, macrófagos; Linfoc, linfócitos; Neutrof, neutrófilos; Eosinof, eosinófilos; Mastoc, mastócitos; Siderof, hemossiderófagos. ^aP=0,005 vs. HPIE neg; ^bP=0,020 vs. HPIE neg.

4.2.2 Bioatividade de PAF no Extrato Lipídico das Células do LBA

A bioatividade de PAF no extrato lipídico das células do LBA foi significativamente maior no subgrupo HPIE pos em relação ao subgrupo HPIE neg (0,18 \pm 0,05 vs. 0,043 \pm 0,02 relação 340:380 nm, P=0,042) (FIGURA 28).

Bioatividade de PAF no Lavado Broncoalveolar

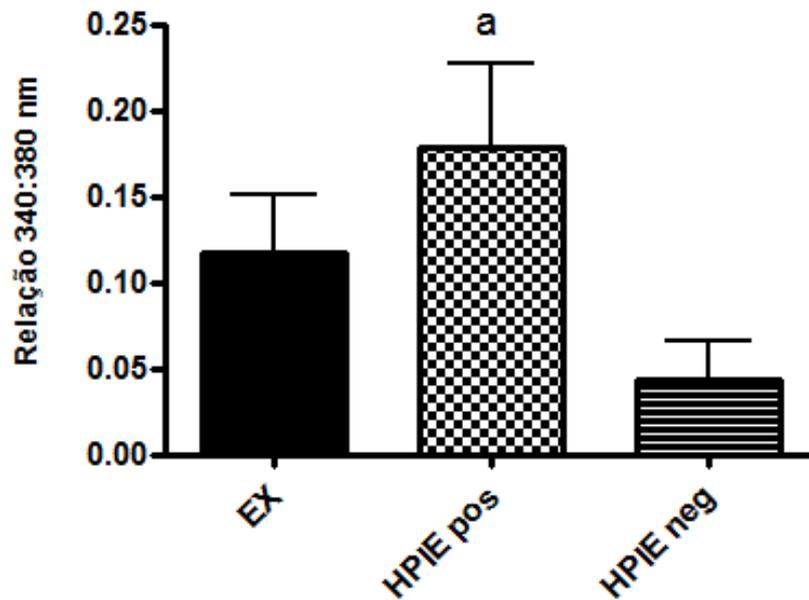


FIGURA 28 – BIOATIVIDADE DE PAF NO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=11) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=6) e HPIE NEG (n=5). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO RELAÇÃO 340:380nm. ^aP=0,042 vs. HPIE neg.

4.2.3 Concentração Total de Proteínas no LBA

A concentração total de proteínas no LBA foi significativamente maior no subgrupo HPIE pos em comparação ao subgrupo HPIE neg ($0,39 \pm 0,08$ vs. $0,19 \pm 0,04$ mg de proteínas/mL de LBA, $P=0,031$) (FIGURA 29).

Concentração Total de Proteínas no LBA

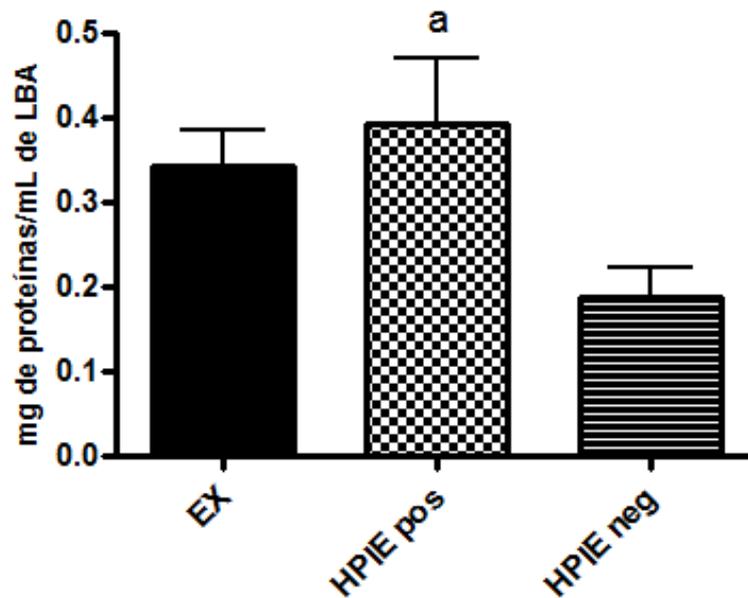


FIGURA 29 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS NO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=28) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=13) E HPIE NEG (n=12). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO MILIGRAMA DE PROTEÍNAS POR MILILITRO DE LBA. ^aP=0,031 vs. HPIE neg.

4.2.4 Concentração de Nitritos no LBA

A concentração de nitritos no LBA do subgrupo HPIE pos resultou significativamente reduzida em comparação ao subgrupo HPIE neg ($0,08 \pm 0,03$ vs. $0,12 \pm 0,07$ absorbância 550 nm, P=0,049) (FIGURA 30).

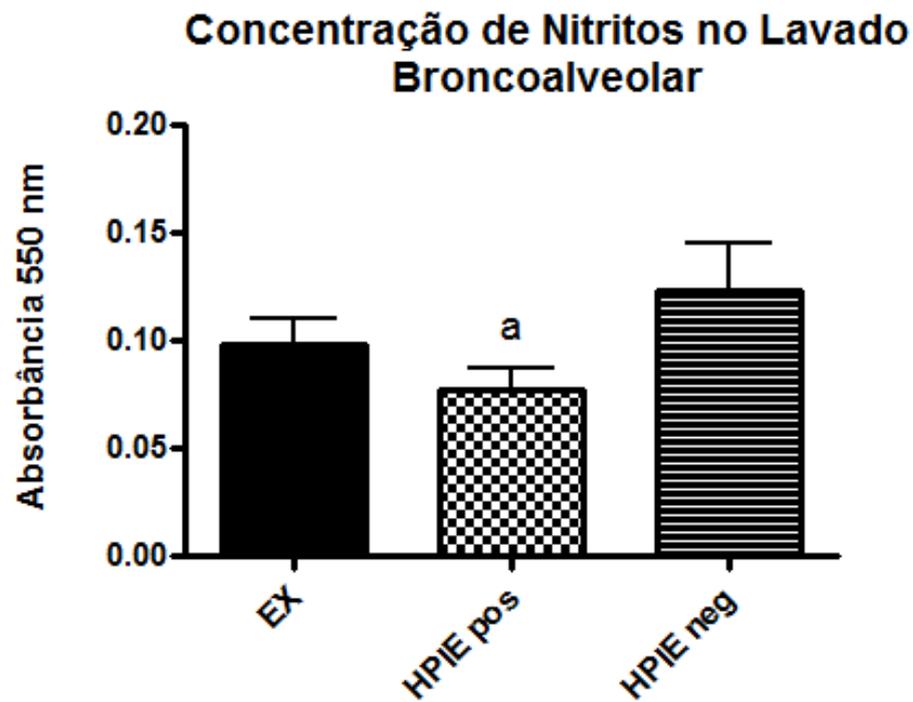


FIGURA 30 – CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS NO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=22) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=12) E HPIE NEG (n=10). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO ABSORBÂNCIA 550 nm. ^aP=0,049 vs. HPIE neg.

4.2.5 Concentração de Hidroperóxidos Lipídicos nas Células do LBA

A concentração de hidroperóxidos lipídicos nas células do LBA dos potros do subgrupo HPIE pos resultou significativamente maior que no subgrupo HPIE neg ($36,7 \pm 9,3$ vs. $6,2 \pm 2,0$ nmoles / mg de proteínas, $P=0,009$) (FIGURA 31).

Concentração de Hidroperóxidos Lipídicos nas Células do Lavado Broncoalveolar

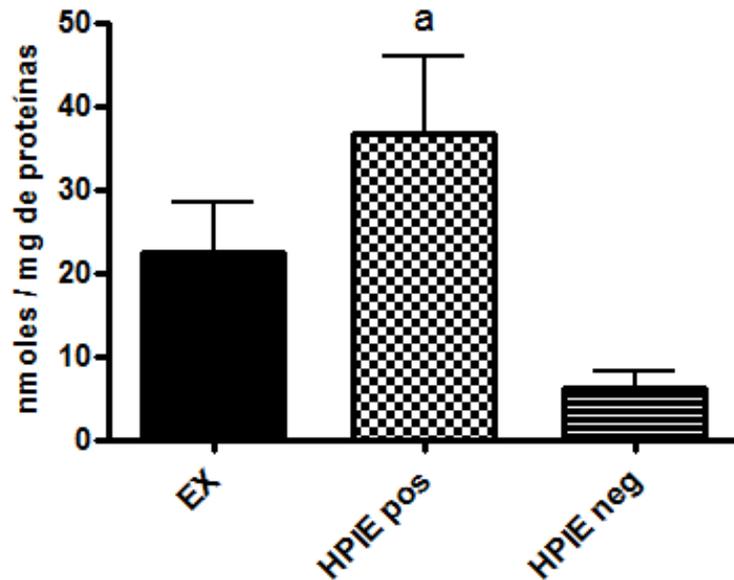


FIGURA 31 – CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NAS CÉLULAS DO LBA DOS POTROS DO GRUPO EX (n=17) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS (n=9) E HPIE NEG (n=8). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO NANOMOLES POR MILIGRAMA DE PROTEÍNAS. ^aP=0,009 vs. HPIE neg.

4.2.6 Fagocitose de Macrófago Alveolar

Não houve diferença na fagocitose de macrófago alveolar entre os grupos estudados.

4.2.7 Produção de Ânion Superóxido por Macrófago Alveolar ($O_2^{\cdot-}$)

A produção basal de $O_2^{\cdot-}$ por macrófagos alveolares resultou similar entre os grupos estudados. A produção de $O_2^{\cdot-}$ estimulada por PMA aumentou significativamente no subgrupo HPIE neg (P=0,047) mas não no subgrupo HPIE pos (FIGURA 32).

A produção de $O_2^{\cdot-}$ estimulada por PMA foi significativamente menor no subgrupo HPIE pos em comparação ao subgrupo HPIE neg ($0,81 \pm 0,11$ vs. $1,24 \pm 0,15$ absorvância 595 nm / adesão, P=0,042) (FIGURA 32).

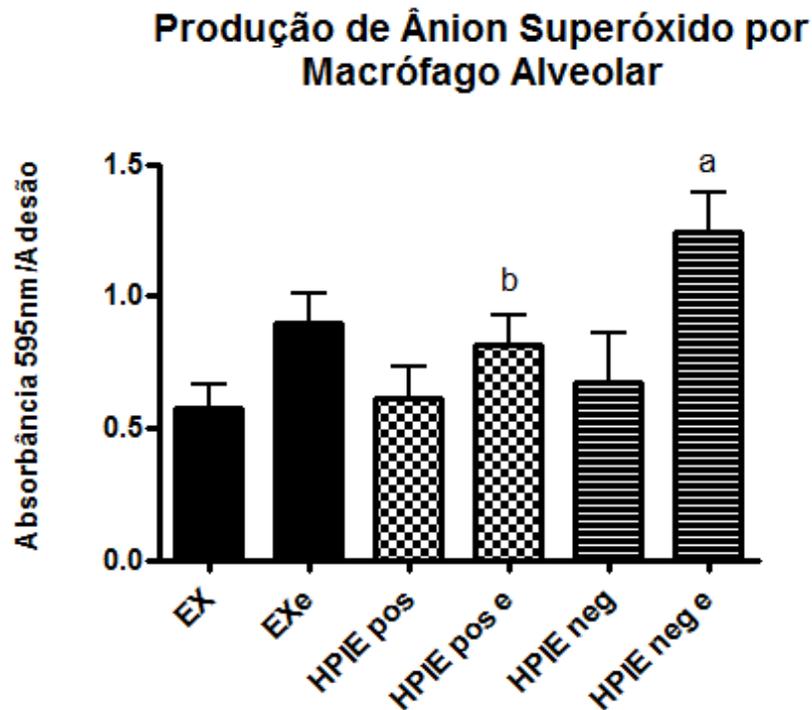


FIGURA 32 – ESTÃO DEMONSTRADOS A PRODUÇÃO BASAL DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DOS POTROS DO GRUPO EX ($n=14$) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS ($n=10$) E HPIE NEG ($n=5$), BEM COMO A PRODUÇÃO DE $O_2^{\cdot-}$ ESTIMULADA POR PMA (EX e, HPIE POS e, HPIE NEG e). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO ABSORBÂNCIA 595 nm/adesão. ^a $P=0,047$ vs. HPIE neg; ^b $P=0,042$ vs. HPIE neg e.

4.2.8 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) por Macrófago Alveolar

A produção basal de H_2O_2 por macrófago alveolar foi similar entre os grupos avaliados no presente estudo. A produção de H_2O_2 estimulada por PMA aumentou significativamente no subgrupo HPIE neg ($P=0,002$), mas não no subgrupo HPIE neg (FIGURA 33).

A produção de H_2O_2 estimulada por PMA resultou significativamente menor no subgrupo HPIE pos em relação ao subgrupo HPIE neg ($0,25 \pm 0,03$ vs. $0,67 \pm 0,14$ absorbância 595 nm / adesão, $P=0,001$).

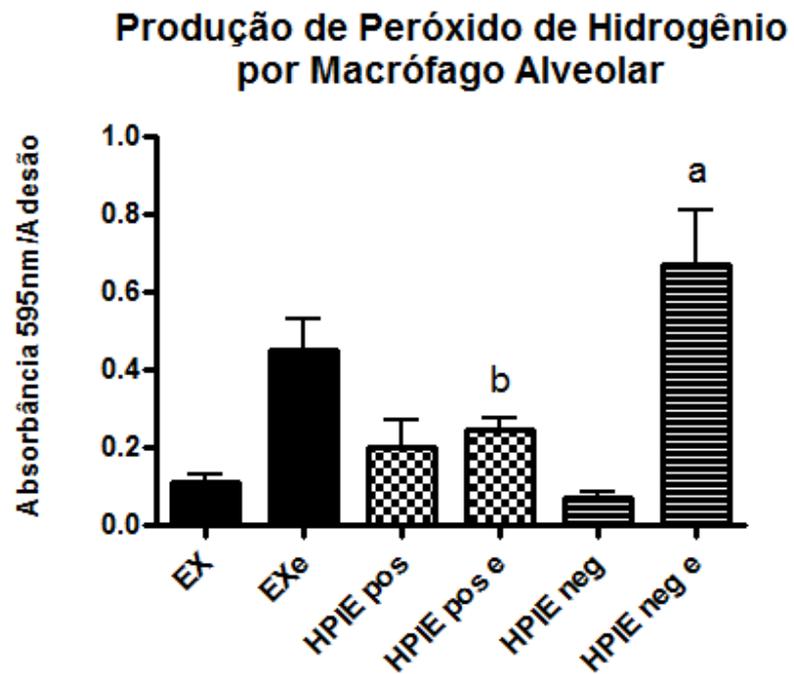


FIGURA 33 – ESTÃO DEMONSTRADOS A PRODUÇÃO BASAL DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) POR MACRÓFAGO ALVEOLAR DOS POTROS DO GRUPO EX ($n=15$) E DOS SUBGRUPOS HPIE POS ($n=11$) E HPIE NEG ($n=6$), BEM COMO A PRODUÇÃO DE H_2O_2 ESTIMULADA POR PMA (EX e, HPIE POS e, HPIE NEG e). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO ABSORBÂNCIA 595 nm/adesão. ^aP=0,002 vs. HPIE neg; ^bP=001 vs. HPIE neg e.

5 DISCUSSÃO

O estudo da inflamação das vias aéreas de cavalos de corrida adultos jovens, em três diferentes situações em seu ambiente natural, foi possível devido à utilização de um grande número de animais. Assim, permitiu-se detectar diferenças entre os grupos mesmo havendo variações ambientais tais como estações do ano, condições climáticas e diferenças sutis em manejo. Como os potros dos três grupos encontravam-se na mesma faixa etária de risco para as doenças respiratórias virais e os experimentos foram realizados durante um mesmo período, as diferenças entre os grupos CN e DA foram consideradas como sendo devido ao ambiente e as diferenças entre os grupos DA e EX foram consideradas como sendo devido ao treinamento.

O grupo CN evidenciou um percentual de observações de faringite, na avaliação endoscópica (TABELA 2), maior que os 37% relatado por HOBBO et al. (1995) em cavalos PSI de corrida de dois anos de idade. Os potros deste grupo foram mantidos integralmente em piquetes, e nesta situação, a hiperplasia dos folículos linfóides da faringe em cavalos jovens pode ser uma resposta normal a inalação de antígenos ambientais ou agentes infecciosos (HOLCOMBE e DUCHARME, 2007).

De fato, as vias aéreas dos potros desse grupo deram mostra de estarem sendo desafiadas, pelo número percentual de corrimento nasal, linfonodos aumentados e quantidades elevadas de secreção traqueal, iguais aos demais grupos (TABELAS 1 e 4). Possivelmente, isso também se deva a fatores climáticos, pois no estudo de ROBINSON et al. (2006), com cavalos de montaria de várias idades, aqueles que permaneceram fora dos estábulos durante o inverno apresentaram quantidades elevadas de muco traqueal. No entanto, diferentemente do nosso estudo, os cavalos avaliados por ROBINSON et al. (2006) tiveram número percentual de neutrófilos aumentado na secreção traqueal, enquanto os potros do grupo CN resultaram em avaliação citológica tanto de AT (TABELA 5) como de LBA (TABELA 6) normais (ROBINSON, 2003; HODGSON e HODGSON, 2007), evidenciando vias aéreas, especialmente as vias aéreas inferiores, saudáveis.

Com relação ao desafio ambiental, no presente estudo adotou-se um sistema convencional de estabulação, pois estudos anteriores em modelos semelhantes ao

nosso já demonstraram a presença de altas concentrações de endotoxinas (BERNDT et al., 2008) bem como de poeira e de aeroalergenos (WOODS et al., 1993).

Contudo, o desafio ambiental de 30 dias utilizado em nosso estudo, resultou em quadro comparável ao do grupo CN, isento de processo inflamatório das vias aéreas. Possivelmente, um período maior de desafio pudesse causar um processo inflamatório tal como foi demonstrado previamente por HOLCOMBE et al. (2001), onde potros da raça puro sangue árabe que sofreram desafio ambiental de 90 dias apresentaram aumento no número percentual de neutrófilos no LBA. Contudo, no estudo citado, o material utilizado para a cama dos potros foi a palha, que também representou um maior risco de desenvolvimento de inflamação nas vias aéreas dos cavalos em outros estudos, quando comparada a serragem utilizada na cama dos potros do grupo DA (BURRELL et al., 1996; VANDEPUT et al., 1998; GERBER et al., 2000; KLEIBER et al., 2005; DEWACHI et al., 2006).

Entretanto, até o momento os efeitos dos fatores ambientais das cocheiras nas vias aéreas foram relatados, em sua maioria, em cavalos apresentando ORVA e não em indivíduos jovens e saudáveis como os potros avaliados em nosso estudo. Nos animais com ORVA, um curto período de exposição ambiental (6 a 48 horas) em baia e, recebendo alimentação composta principalmente por feno, causou aumento da expressão de algumas citocinas (p.ex.: IL-4 e IL-5) em alguns estudos, mas nenhuma alteração em outros (GERBER et al., 2000; AINSWORTH et al., 2003; CORDEAU et al., 2004; KLEIBER et al., 2005), sendo que um longo tempo de exposição ambiental (variando de cinco semanas a três meses) causou aumento da expressão de IFN- γ e IL-8 (AINSWORTH et al., 2003), IL-9 (DEWACHI et al., 2006), IL-17 (DEBRUE et al., 2005) e o desenvolvimento dos sinais clínicos da ORVA acompanhados de alterações na função pulmonar (VANDEPUT et al., 1998).

Contudo, nos potros do grupo DA se evidenciou, no AT (TABELA 5) e no LBA (TABELA 6), um aumento significativo do número percentual de macrófagos multinucleados, em comparação ao grupo CN, bem como número percentual de eosinófilos acima do valor considerado limite para cavalos normais (ROBINSON, 2003), sugerindo que houve uma resposta por parte do sistema de defesa nas vias aéreas dos potros deste grupo.

Os macrófagos multinucleados ou células gigantes multinucleadas, são formados a partir da fusão de dois ou mais macrófagos na resposta imune pulmonar

(ANDERSON et al., 1999), representando especificamente uma resposta imune do tipo Th2 com a participação da IL-4 (HELMING e GORDON, 2007). Em pessoas, os macrófagos multinucleados são considerados como um achado indicativo de reações inflamatórias crônicas nas vias aéreas, como a tuberculose, por exemplo (LEMAIRE et al., 2006; HELMING e GORDON, 2007). Em equinos, são escassos os estudos envolvendo a citologia respiratória que descrevam o número percentual normal deste tipo celular. De qualquer forma, é relatado que pode ser observado em pequeno número em cavalos sem evidências de doença pulmonar, sendo que uma quantidade aumentada já foi descrita associada à inflamação crônica (DECONTO, 1983; HODGSON e HODGSON, 2007). Estas informações parecem não corroborar com o aumento no número percentual de macrófagos multinucleados no grupo DA, em se tratando de potros jovens considerados saudáveis, o que demonstra a necessidade de mais estudos para se entender o papel do macrófago multinucleado no pulmão saudável e na inflamação pulmonar dos cavalos.

Entretanto, o número percentual de eosinófilos acima do limite normal, no LBA dos potros do grupo DA, pode ser considerado como uma resposta ao ambiente, assim como é considerado em humanos (DENGUEZLI-BOUZGARROU et al., 2007) e já relatado em cavalos (COUËTIL et al., 2007).

O período de treinamento, por sua vez, induziu inflamação pulmonar nos potros do grupo EX. O número significativamente aumentado de potros com tosse (TABELA 1) constituiu a evidência clínica sugerindo inflamação das vias aéreas nos potros desse grupo. Cavalos saudáveis raramente tosse (ROBINSON, 2007), sendo a tosse um sinal clínico comprovadamente associado à inflamação das vias aéreas (BURRELL et al., 1996; McGROUM e DIXON, 2007). CHRISTLEY et al. (2001), correlacionaram a tosse com a presença de faringite, sendo que tal associação também foi observada no grupo EX (TABELAS 1 e 2). Adicionalmente, BEDENICE et al. (2008) estudaram a relação entre a tosse e a inflamação pulmonar, e descreveram que os cavalos avaliados por apresentarem tosse, tiveram contagens percentuais de neutrófilos no LBA maiores que 5%.

No presente estudo, um aumento no NTCN e nas contagens percentuais de neutrófilos e eosinófilos do LBA (TABELA 6), confirmaram a presença de inflamação pulmonar no grupo EX (McKANE et al., 1993; COUËTIL e DENICOLA, 1999; COUËTIL et al., 2007). A neutrofilia no LBA de cavalos de corrida já foi correlacionada a um baixo rendimento desportivo e constitui sinal chave para o

diagnóstico da DIVA (COUËTIL et al., 2007). A eosinofilia no LBA de cavalos de corrida, por sua vez, pode ser um achado transitório (VIEL e HEWSON, 2003), apesar de também ter sido associada a um baixo rendimento desportivo além de hiperresponsividade das vias aéreas, em cavalos de corrida jovens (HARE e VIEL, 1998). Portanto, tais evidências podem ser consideradas como um risco ao futuro potencial atlético dos potros do grupo EX.

No presente estudo não houve correlação entre os achados citológicos de AT e LBA, para nenhum dos três grupos estudados, e esta falta de correlação entre AT e LBA já foi relatada anteriormente. Portanto, entende-se que os epitélios, traqueal e broncoalveolar, respondem diferentemente aos agentes agressores, sendo que a avaliação de cavalos com tosse ou diminuição de rendimento desportivo deve ser realizada por ambas as técnicas associadas (MALIKIDES et al., 2003; CHRISTLEY RUSH, 2007; HODGSON e HODGSON, 2007).

A ligação entre o exercício e a inflamação das vias aéreas, provavelmente envolve diversos mediadores pró-inflamatórios, que uma vez identificados poderão ser alvo para abordagens terapêuticas com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios da inflamação pulmonar em cavalos PSI de corrida jovens. Neste contexto, um dos mais potentes e versáteis mediadores pró inflamatórios envolvidos na inflamação das vias aéreas é o PAF (UHLIG et al., 2005).

PAF é quimiotático para, bem como produzido por, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos, em resposta a estresse físico ou químico, apresentando muitos dos critérios essenciais de um mediador pró inflamatório (OWEN et al., 2005).

De fato, estudos realizados *in vitro* demonstraram que o PAF pode induzir a migração de neutrófilos e monócitos do cavalo (DAWSON et al., 1988). Além disso, demonstrou-se a quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos no trato respiratório de murinos e humanos induzida por PAF (LEE et al., 2002; ISHII et al., 2004). Em cavalos com ORVA, a administração intravenosa de PAF promoveu uma redução de leucócitos no sangue periférico e, após alguns minutos, houve um aumento de neutrófilos e eosinófilos no pulmão seguido de uma deterioração clínica e da função respiratória (FAIRBAIRN et al., 1996). Portanto, apoiado nestes estudos e nos resultados de aumento do NTCN e de neutrofilia e eosinofilia no LBA do grupo EX (TABELA 6), é razoável assumir que o PAF possa contribuir para a indução da inflamação pulmonar observada nos potros PSI jovens em treinamento avaliados no presente estudo.

A inflamação pulmonar também está associada a um aumento nas concentrações de proteínas no LBA, principalmente devido ao extravasamento de plasma (TSANGARIS et al., 2003), que pode ser resultado da ação de vários mediadores pró inflamatórios, tal como o PAF.

Um aumento da permeabilidade microvascular induzida pelo PAF, resultando em extravasamento de plasma e edema, foi demonstrado previamente no estudo de CLAVIJO et al. (2001). Além disso, WEST et al. (1997) demonstraram o acúmulo de um fluido rico em proteínas no espaço alveolar de cavalos exercitados a velocidades entre 13 m/s e 16 m/s. No presente estudo, o significativo aumento da concentração de proteínas no LBA dos potros do grupo EX em comparação ao grupo DA (FIGURA 21), confirma que a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (BAC) estava aumentada nos potros do grupo EX e o PAF pode estar envolvido neste mecanismo.

Diferentemente, o significativo aumento de proteínas no LBA do grupo DA em comparação ao grupo CN deve envolver outros mecanismos inflamatórios, pois não houve bioatividade de PAF significativa no LBA destes dois grupos (FIGURA 19).

Contudo, os efeitos do PAF na permeabilidade vascular podem ser dependentes, em parte, da disponibilidade de óxido nítrico (NO) (KIKUCHI et al., 2008). Houve uma produção limitada de NO nas vias aéreas dos potros do grupo EX, esperada em cavalos realizando exercício moderado ou próximo do máximo (MILLS e HIGGINS, 1997). Isto pode ser explicado pela hipoxemia arterial induzida pelo exercício (HAIE) descrita em atletas humanos (HOPKINS, 2005) e em cavalos exercitando a altas intensidades (MILLS et al., 1996; COUËTIL e DENICOLA, 1999; DEMPSEY e WAGNER, 1999; SÁNCHEZ et al., 2005). A produção de NO requer normoxia (GRIMMINGER et al., 1995) sendo que a anoxia abole o relaxamento vascular dependente do endotélio e a hipoxemia degrada o NO (De MEY e VANHOUTTE, 1980). Adicionalmente, ocorre uma inibição do NO pela hemoglobina, sendo que esta inibição é inversamente proporcional a saturação de oxigênio (IWAMOTO e MORIN, 1993).

A inibição da síntese de NO resultou no aumento da permeabilidade vascular no estudo de KIKUCHI et al. (2008), concordando com os nossos achados referentes à bioatividade de PAF aumentada, associada ao aumento da concentração total de proteínas e à diminuição da concentração de nitritos no LBA do grupo EX.

De fato, no estudo de BRKOVIC e SIROIS (2007), o PAF e não o NO foi considerado o mediador pró inflamatório e causador do aumento da permeabilidade vascular, enquanto o NO foi considerado como um co-fator para as atividades inflamatórias do PAF. Na relação entre PAF e NO na microcirculação, parece que NO apresenta um efeito protetor atenuando as atividades inflamatórias de PAF, tendo inclusive reduzido a formação de PAF em vênulas mesentéricas em ratos (NEVIN e BROADLEY, 2002).

Contudo, o NO também tem papel preponderante na defesa das vias aéreas (NEVIN e BROADLEY, 2002; XU et al., 2006), e o aumento na concentração de nitritos no LBA do grupo DA pode ser considerado uma resposta aos poluentes ambientais existentes nas cocheira dos cavalos (WOODS et al., 1993; BERNDT et al., 2008). Além disso, o NO reage com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), um forte oxidante capaz de provocar lesão no tecido pulmonar resultando em peroxidação lipídica (XU et al., 2006).

A peroxidação lipídica foi investigada no presente estudo através da concentração de hidroperóxidos lipídicos nas células do LBA, que resultou aumentada no grupo DA em comparação com o grupo CN (FIGURA 23). A peroxidação lipídica foi associada ao acúmulo de neutrófilos e produção de ROS por esses, nas vias aéreas de crianças (BUSS et al., 2000) e de pessoas com DPOC (SANTUS et al., 2005). Não houve aumento de neutrófilos no LBA dos potros do grupo DA, mas os macrófagos alveolares dos potros deste grupo apresentaram maior produção de ROS (FIGURAS 26 e 27). Isso pode ter contribuído para o aumento da peroxidação lipídica no LBA neste grupo, como resultado da modificação da funcionalidade dos macrófagos alveolares induzida por fatores ambientais, como descrito em estudos em humanos (LUNDBORG et al., 2007) e em cavalos (RIIHIMÄKI et al., 2008b).

Por outro lado, o treinamento resultou em redução da concentração de hidroperóxidos lipídicos no LBA em comparação com o grupo DA. No estudo de MASTALOUDIS et al. (2004), corredores de ultramaratona apresentaram aumento da peroxidação lipídica, avaliada por marcadores do sangue destes atletas. Contudo, outros relataram a redução dos marcadores de peroxidação lipídica após exercício intenso em corredores e esquiadores (URSO e CLARKSON, 2003), em indivíduos treinados (BALOG et al., 2006), em pessoas após 6 meses de

treinamento e também após um programa de treinamento de 3 semanas (ALDRED, 2007) e em pacientes com DPOC após programa de exercícios (PINHO et al., 2007).

Provavelmente, essa diminuição na peroxidação lipídica no LBA dos potros do grupo EX deveu-se a mecanismos protetores, pois o treinamento influencia de forma positiva a capacidade antioxidante do organismo em atletas humanos (URSO e CLARKSON, 2003; PARK et al., 2005; BALOG et al., 2006; ALDRED, 2007; PINHO et al., 2007) e em cavalos (KIRSCHVINK et al., 2008).

URSO e CLARKSON (2003) relataram um aumento significativo da atividade da catalase, uma enzima antioxidante, nos eritrócitos de atletas humanos após um exercício de corrida de longa distância, corroborando com os nossos achados de aumento significativo da atividade da catalase no LBA dos potros do grupo EX em comparação com o grupo DA (FIGURA 24).

No presente estudo, a atividade de macrófago alveolar foi investigada devido ao papel inerente desta célula na defesa pulmonar. O aumento na atividade dos macrófagos alveolares no grupo DA foi discutida acima e provavelmente deveu-se à presença de aeroalergenos e endotoxinas presentes nas cocheiras dos cavalos (RIIHIMÄKI et al., 2008b).

Por outro lado, o treinamento reduziu tanto a fagocitose de macrófago alveolar (FIGURA 25), como a capacidade de produção de ROS (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) (FIGURAS 26 e 27).

O macrófago alveolar é a célula efetora do sistema imune predominante nos espaços alveolares e nas vias aéreas condutoras, responsável por ativar as respostas inflamatórias de forma suficiente a eliminar agentes agressores (PETERS-GOLDEN, 2004). Os macrófagos alveolares são essenciais à sobrevivência, devendo estar em harmonia com o sistema nervoso e endócrino para responder a estímulos fisiológicos, bem como patológicos (GORDON, 2007), sem exagerar na resposta a fim de não comprometer a troca gasosa (PETERS-GOLDEN, 2004).

Apesar de KIZAKI et al. (2008) terem demonstrado que o macrófago pode sofrer uma adaptação ao exercício, melhorando sua funcionalidade, os potros PSI jovens em treinamento para corrida, do grupo EX, apresentaram supressão da imunidade, especificamente a relacionada à resposta imune inata dos macrófagos alveolares, corroborando com estudos anteriores (HUSTON et al., 1987; RAIDAL et al., 2000; RAIDAL et al., 2001) que avaliaram o LBA de cavalos após exercício

realizado em esteira de alta velocidade e obtiveram resultados semelhantes aos nossos.

Outro aspecto, ainda não relatado em equinos, mas demonstrado em pessoas, é que a melhora na atividade antioxidante induzida pelo exercício pode resultar em diminuição da atividade da NADPH oxidase na membrana dos macrófagos, conseqüentemente reduzindo a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por essas células (PARK et al., 2005), como observado no grupo EX.

Portanto, a influencia do exercício sobre a funcionalidade das células do sistema imunológico, como a observada nos macrófagos alveolares do grupo EX no presente estudo, explicaria a maior suscetibilidade apresentada por potros de corrida sob treinamento intenso, a infecções respiratórias (HINES et al., 1996). Em humanos, o exercício intenso reduziu a capacidade de apresentação de antígeno (CEDDIA e WOODS, 1999) bem como a resistência antiviral (DAVIS et al., 1997) por macrófagos. O PMA (*phorbol myristate acetate*), utilizado nas avaliações da atividade de macrófago alveolar (ver tópicos 4.1.14 e 4.1.15), teve como função estimular a NADPH oxidase a produzir ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (DEKKER et al., 2000; NAKAJIMA et al., 2000) mimetizando o estímulo provocado por agentes infecciosos (JI, 2008). Isto, de fato ocorreu no grupo EX, já que os macrófagos estimulados apresentaram aumento significativo na atividade comparando-se aos macrófagos não estimulados (FIGURAS 26 e 27), entretanto a atividade ainda foi significativamente menor que no grupo DA, evidenciando a redução na atividade de macrófagos induzida pelo exercício.

Os efeitos do PMA sobre os macrófagos alveolares e sobre os PMNs do sangue, de equino, podem ser apreciados no experimento de validação da técnica de estudo da bioatividade de PAF (FIGURAS 13 a 18). A técnica utilizada para o estudo da bioatividade de PAF no extrato lipídico das células do LBA dos potros, empregando-se PMNs de equinos como ferramenta para se avaliar o influxo de Ca^{++} induzido por PAF, foi inédita em estudos em cavalos. Anteriormente, a mesma avaliação foi realizada utilizando-se PMNs de humanos (GRYNKIEWICZ et al., 1985; MARATHE et al., 2001). Anteriormente, os PMNs de equinos foram empregados, com êxito, no estudo da bioatividade de PAF em extrato lipídico obtido a partir de amostras de pulmão de ratos, no estudo da asma (MUEHLMANN et al., 2009).

Portanto, a validação desta técnica se fez necessária e importante para o reconhecimento dos resultados obtidos para a bioatividade de PAF no extrato lipídico das células do LBA dos três grupos investigados. No presente estudo, o PAF ativou os PMNs do sangue do cavalo, assim como os macrófagos alveolares, de forma concentração dependente. Portanto, o PAF tendo como uma de suas origens o macrófago alveolar, é capaz de modificar o comportamento de neutrófilos sanguíneos, induzindo a um aumento da adesão (BRAZIL, 2001) e na ativação dos neutrófilos em cavalos suscetíveis a ORVA (MARR et al., 2002).

As influências exercidas pelo PAF na circulação pulmonar, permeabilidade capilar pulmonar e na agregação plaquetária, estimulou o estudo da HPIE nos potros avaliados no grupo EX. Para tal, o hemossideróforo no LBA foi escolhido como o marcador da HPIE, porque a colheita do LBA 24 horas após o exercício resultou que a observação endoscópica de sangue na traquéia, bem como a contagem do número de eritrócitos no LBA, não fossem técnicas diagnósticas indicadas nesse momento.

A observação do hemossideróforo no LBA, mesmo se constituindo numa forma confiável de diagnóstico da HPIE (McKANE et al., 1993), poderia não servir aos nossos propósitos de identificar diferenças em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, bem como na funcionalidade de macrófagos alveolares, dentro de um mesmo grupo, até então, considerado homogêneo. Contudo, o hemossideróforo presente no LBA foi confirmado, no presente estudo, não só como um marcador confiável da HPIE, como também foi capaz de diferenciar subgrupos significativamente distintos dentro do grupo EX.

Interessantemente, observou-se um percentual de HPIE (determinado pela presença de hemossideróforos no LBA) maior que o de inflamação pulmonar (>5% de neutrófilos e/ou >1% de eosinófilos na avaliação citológica diferencial do LBA). Isso nos leva a pensar que a HPIE precede a inflamação no pulmão dos cavalos de corrida, tal como foi sugerido por DERKSEN et al. (2009) (FIGURA 9), mas que requer outras investigações para excluir que o contrário estivesse acontecendo, isto é, um processo inflamatório em período anterior do treinamento que pudesse ter deixado alguma fragilidade pulmonar. Possivelmente, o estudo de potros PSI de corrida tão jovens e em início de treinamento, permitiu tal discussão, visto que se considera que a HPIE acometa praticamente a totalidade dos cavalos PSI em treinamento (WEST et al., 1993; HINCHCLIFF, 2007).

A associação entre a HPIE e a inflamação já foi demonstrada anteriormente (McKANE et al., 1993) e foi considerada como sendo significativa no estudo epidemiológico de NEWTON e WOOD (2002), apesar dos mecanismos pelos quais esta associação ocorre ainda serem apresentados de forma hipotética, como no recente estudo de DERKSEN et al. (2009).

No estudo de COUËTIL e DENICOLA (1999), cavalos de corrida com HPIE apresentaram, na avaliação do LBA, um aumento no NTCN associado à neutrofilia. De fato, isto ocorreu no subgrupo HPIE pos e esses achados de citologia, demonstram que a HPIE esteve associada à inflamação pulmonar nos potros do subgrupo HPIE pos.

Outro achado comum entre a HPIE e a inflamação pulmonar é o aumento da concentração total de proteínas no LBA, como observado no subgrupo HPIE pos em comparação com o grupo HPIE neg (FIGURA 29), evidenciando um aumento na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (BAC) no subgrupo HPIE pos.

O acúmulo de fluido rico em proteínas no espaço alveolar associado à inflamação pulmonar, como demonstrado por TSANGARIS et al. (2003) foi discutido acima. Contudo, cavalos com HPIE exercitados a altas velocidades também apresentaram aumento da concentração de proteínas no espaço alveolar (WEST e MATTHIEU-COSTELLO, 1999).

Possivelmente, o aumento da concentração de proteínas associado à HPIE possa ser devido ao aumento da pressão transmural nos capilares pulmonares, resultando em falência por estresse dos capilares, como demonstrado por BIRKS et al. (1997) em cavalos exercitados nas mesmas velocidades que os potros avaliados no presente estudo.

Adicionalmente, parece que a HPIE deflagrou um mecanismo inflamatório causador de extravasamento de plasma no espaço alveolar, nos potros do subgrupo HPIE pos, e a bioatividade de PAF significativamente aumentada no subgrupo HPIE pos em relação ao subgrupo HPIE neg (FIGURA 28) indica a participação desse mediador pró inflamatório nesse evento.

O extravasamento de plasma na microcirculação pulmonar e a formação de edema pulmonar, induzidos por PAF, foram demonstrados anteriormente e já discutidos acima (EVANS et al., 1987; CLAVIJO et al., 2001). No caso da HPIE, provavelmente o PAF induza a formação de fendas no endotélio microvascular, através da desorganização de proteínas juncionais (JIANG et al., 2008). Estes dados

concordam com a proposta de WEST e MATTHIEU-COSTELLO (1999) de que, a altas pressões em capilares pulmonares, ocorra a formação de fendas nas junções entre as células endoteliais. Desta forma, as evidências indicam que associado ao evento mecânico na etiopatogenia da HPIE, um evento inflamatório também está presente, o que representa um fator de risco para o agravamento do quadro. Adicionalmente, os eventos inflamatórios presentes na HPIE se constituem em potencial área para investigações terapêuticas, visto que ainda não se tem um tratamento efetivo para a hemorragia pulmonar em cavalos atletas. Recentemente, evidências de que a suplementação de cavalos atletas com ácidos graxos ômega-3 melhora a fluidez da membrana dos eritrócitos (PORTIER et al., 2006), sugeriu que a influência benéfica na resposta inflamatória pulmonar pode reduzir os índices HPIE (ERICKSON et al., 2007).

Portanto, é razoável assumir um papel para o PAF na fisiopatologia da HPIE, pelas suas propriedades angiogênicas além de seus efeitos pró inflamatórios (APONTE et al., 2008), concordando com a hipótese da patogênese da HPIE proposta por DERKSEN et al. (2009) (FIGURA 9), onde a ruptura dos capilares pulmonares resultaria em inflamação, sangramento e hemosiderose e conseqüentemente, a ocorrência de angiogênese na circulação bronquial e fibrose, agravando o quadro da HPIE.

Adicionalmente, ZHANG et al. (2003) demonstraram que o aumento da permeabilidade capilar induzido por PAF envolve a participação de estresse oxidativo, visto que a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) atenuou os efeitos do PAF sobre o endotélio. De fato, o grupo HPIE pos apresentou a concentração de peróxidos lipídicos significativamente aumentada em comparação ao subgrupo HPIE neg, sendo uma evidência de estresse oxidativo no LBA dos potros deste grupo, possivelmente exacerbada pela alta quantidade de ferro da hemossiderina presente no espaço alveolar (DERSEN et al., 2009).

A peroxidação lipídica induz alterações patológicas no tecido pulmonar, destruindo pneumócitos e células endoteliais do epitélio levando a um aumento da permeabilidade microvascular, inibe a síntese e a liberação de surfactante e interfere negativamente na atividade do NO. O conjunto dessas ações dos peróxidos lipídicos no pulmão resulta em dano da estrutura pulmonar e leva à hipertensão, representando um fator adicional contribuindo para a patogenia da HPIE (MILLS e HIGGINS, 1997).

Os macrófagos alveolares, como células orquestradoras da resposta imune pulmonar (PETERS-GOLDEN, 2004) devem possuir um importante papel na patogenia da HPIE, visto que a obtenção de subgrupos significativamente distintos, a partir do grupo EX no presente estudo, se deu pela presença ou ausência de hemossideróforos. THACKER (2006) descreveu que os macrófagos ativados secretam interleucina-1 (IL-1), que atrai e ativa a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, para reparar o tecido danificado. Em estudo histopatológico do pulmão de cavalos com HPIE, as áreas de ocorrência de hemorragia caracterizaram-se por hemossiderose e fibrose (DERKSEN et al., 2009).

Adicionalmente WEST e MATTHIEU-COSTELLO (1999) sugeriram o envolvimento de leucotrieno B₄ (LTB₄) no mecanismo inflamatório envolvido na HPIE, apesar deste mecanismo ainda requerer comprovação. Neste evento, a ruptura do epitélio alveolar com a exposição da membrana ativaria os macrófagos alveolares, os quais são ricos em LTB₄.

O LTB₄, por sua vez, também conecta o PAF à HPIE. HOPKINS et al. (1997), estudaram a HPIE em humanos avaliando o LBA de seis ciclistas de elite após 4 km de esforço máximo. Comparados aos controles, os ciclistas que realizaram o esforço apresentaram altas concentrações de eritrócitos, proteínas e LTB₄, no LBA. No estudo citado, exceto pelo aumento da LTB₄, não houve diferença no número percentual de neutrófilos e nem nos níveis de IL-8 e TNF- α entre os grupos, suportando a hipótese do estresse mecânico alterando a BAC na HPIE, segundo a conclusão dos autores. Contudo, a associação entre LTB₄ e PAF foi demonstrada anteriormente, onde o receptor de LTB₄ esteve envolvido com a quimiotaxia pulmonar e degranulação de neutrófilos, induzida por PAF (GAUDREULT et al., 2005). Todavia, até o momento este tipo de associação não foi demonstrada em cavalos, apesar de ter-se relatada a neutrofilia nas vias aéreas de cavalos com ORVA, mediada por LTB₄ (LINDBERG et al., 2004). Portanto, reunindo as informações acima, pode-se assumir a hipótese de que a neutrofilia no LBA e o aumento da permeabilidade da BAC, nos potros do subgrupo HPIE pos, tenha sido induzida por PAF e mediada por receptor de LTB₄.

Adicionalmente, reforça-se a evidência da importância dos macrófagos alveolares na HPIE, e por sua vez, como a hemorragia pulmonar pode influenciar a funcionalidade dos macrófagos. Na primeira etapa do presente estudo, descrevemos a redução na fagocitose e na produção de ânion superóxido e peróxido de

hidrogênio pelos macrófagos alveolares do grupo EX (FIGURAS 25 a 27). Contudo, evidenciamos que a HPIE agravou ainda mais esta situação (FIGURAS 32 e 33), pois a resposta de macrófago alveolar esteve significativamente reduzida no subgrupo HPIE pos em comparação com o subgrupo HPIE neg.

A redução na concentração de nitritos no subgrupo HPIE pos, pode ser explicada novamente pela HAIE com conseqüente inibição da produção do NO (MILLS et al., 1996; COUËTIL e DENICOLA, 1999; SÁNCHEZ et al., 2005), favorecendo o aumento da permeabilidade capilar (KIKUCHI et al., 2008), provavelmente agravado pela ocorrência de peroxidação lipídica neste grupo (MILLS e HIGGINS, 1997).

Os mecanismos pelos quais o NO modula a permeabilidade microvascular não são bem conhecidos. Em cavalos de PSI de corrida, a inibição da NOS pela administração de L-NAME agravou a HPIE enquanto não alterou a pressão arterial pulmonar (KINDIG et al., 2000), e a inalação de NO durante o exercício reduziu ligeiramente a pressão arterial pulmonar enquanto também causou agravamento da HPIE (KINDIG et al., 2001). Parece que a pressão arterial pulmonar elevada reflete, em parte, uma vasoconstrição arteriolar que serve para proteger o leito capilar das pressões arteriais pulmonares extremamente altas, desencadeadas durante o exercício máximo em cavalos PSI. Assim, o tratamento com NO exógeno não só não ajudou, mas agravou a HPIE.

Adicionalmente, corroborando com o aumento da bioatividade de PAF e redução na concentração de nitritos, no LBA do subgrupo HPIE pos, o estudo de KWASNIEWSKI et al. (2008), com um modelo de lesão e hemorragia em intestino delgado, demonstrou que o pré tratamento com antagonista de PAF reduziu as lesões, enquanto a inibição do NO endógeno aumentou consideravelmente as lesões hemorrágicas e a mortalidade. Portanto, o estudo citado demonstrou a existência da relação entre PAF e NO na hemorragia ocorrida na microcirculação, assim como reafirma o papel protetor do NO para os efeitos pró inflamatórios do PAF (NEVIN e BROADLEY, 2002; BRKOVIC e SIROIS, 2007)

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese do presente estudo foi confirmada, pois tanto o desafio ambiental como o exercício causaram alterações no fluido broncoalveolar e modificaram a função de macrófago alveolar. Potros PSI de corrida jovem, em treinamento para corrida, apresentaram depressão da resposta imune inata, mais especificamente do macrófago alveolar, induzida pelo exercício e agravada pela ocorrência da HPIE.

PAF influencia os neutrófilos do sangue bem como os macrófagos alveolares, de equinos, e no presente estudo, esteve presente na inflamação pulmonar induzida pelo exercício nos potros PSI durante o treinamento para corrida.

Os achados relacionados à inflamação pulmonar e ao aumento da bioatividade de PAF, no fluido broncoalveolar dos potros exercitados, estiveram relacionados à HPIE e à presença dos hemossiderófagos no LBA, o que resultou numa resposta de macrófago alveolar ainda mais reduzida.

Desta forma, assume-se que os resultados obtidos para o grupo EX, podem ser extrapolados para as populações similares de cavalos PSI jovens em treinamento para a corrida.

Finalmente, sugere-se a condução de novos estudos para o entendimento dos mecanismos inflamatórios envolvidos na HPIE bem como o papel do PAF neste processo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods of Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

AINSWORTH, D.M.; GRÜNIG, G.; MATYCHAK, M.B.; YOUNG, J.; WAGNER, B.; ERB, H.N.; ANTCZAK, D.F. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1-2, p. 83-91. 2003.

ALDRED, S. Oxidative and nitrative changes seen in lipoproteins following exercise. **Atherosclerosis**, v. 192, p. 1-8, 2007.

ANDERSON, S.; SHIRES, V.L.; WILSON, R.A.; MOUNTFORD, A.P. Formation of multinucleated giant cells in the mouse lung is promoted in the absence of interleukin-12. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, p. 371-378, 1999.

APONTE, M.; JIANG, W.; LAKKIS, M.; LI, M.J.; EDWARDS, D.; ALBITAR, L.; VITONIS, A.; MOK, S.C.; CRAMER, D.W.; YE, B. Activation of platelet-activating factor receptor and pleiotropic effects on tyrosine phospho-EGFR/Src/FAK/paxillin in ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5839-5848, 2008.

ART, T.; LEKEUX, P. Exercised-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. **Livestock Production Science**, n.92, p. 101-111, 2005.

AU, B.; TEIXEIRA, M.M.; COLLINS, P.D.; WILLIAMS, T.J. Blockade of PAF receptors controls interleukin-8 production by regulating the activation of neutrophil CD11/CD18. **European Journal of Pharmacology**, v. 425, p. 65-71, 2001.

BAKER, P.R.S.; OWEN, J.S.; NIXON, A.B.; THOMAS, L.N.; WOOTEN, R.; DANIEL, L.W.; O'FLAHERTY, J.T.; WYKLE, R.L. Regulation of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils by MAP kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1592, p. 175-184, 2002.

BALOG, T.; SOBOCANEC, S.; SVERKO, V.; KROLO, I.; ROCIC, B.; MAROTTI, M.; MAROTTI, T. The influence of season on oxidant-antioxidant status in trained and sedentary subjects. **Life Sciences**, v. 78, p. 1441-1447, 2006.

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, p. 1022-1028, 2008.

BELLAN, J.A.; MINKES, R.K.; HOOD, J.S.; McMAHON, T.J.; HIGUERA, T.R.; NOSSAMAN, B.D.; McNAMARA, D.B.; KADOWITZ, P.J. Analysis of pulmonary and systemic vascular responses to platelet-activating factor in the cat. **The American Journal of Physiology**, v. 263, n. 1-2, p. H234-H243, 1992.

BERNDT, A.; DERKSEN, F.J.; ROBINSON, N.E. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. **The Veterinary Journal**, Oct 17, 2008. [Epub ahead of print]

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.

BIRKS, E.K.; MATHIEU-COSTELLO, O.; FU, Z.; TYLER, W.S.; WEST, J.B. Very high pressures are required to cause stress failure of pulmonary capillaries in Thoroughbred racehorses. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, p. 1584-1592, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principles of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 142, p. 79-83, 1976.

BRAZIL, T.J. The role of neutrophils in equine heaves. In: VIEL, L.; ROBINSON, N.E.; DUCHARME, N.G.; McGORUM, B.C. (Eds.). **Proceedings of the 2nd World Equine Airways Symposium**. Scotland, Edinburg, 2001. Disponível em <http://www.ivas.org/proceedings/weas/2001/Gerber.pdf>. Acesso em 09.jun.2009.

BRKOVIC, A.; SIROIS, M.G. Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: role of endogenous PAF and NO synthesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 100, n. 3, p. 727-737, 2007.

BURRELL, M.H.; WOOD, J.L.; WHITWELL, K.E.; CHANTER, N.; MACKINTOSH, M.E.; MUMFORD, J.A. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationship between disease and viruses, bacteria and environment. **Veterinary Record**, v. 139, n. 13, p. 308-313, 1996.

BUSS, I.H.; DARLOW, B.A.; WINTERBOURN, C.C. Elevated protein carbonyls and lipid peroxidation products correlating with myeloperoxidase in tracheal aspirates from premature infants. **Pediatric Research**, v. 47, n. 5, p. 640-645, 2000.

CARAMORI, G.; PAPI, A. Oxidants and asthma. **Thorax**, v.59, n.2, p.170-173, 2004.

CEDDIA, M.A.; WOODS, J.A. Exercise suppresses macrophage antigen presentation. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 6, p. 2253-2258, 1999.

CHAPMAN, P.S.; GREEN, C.; MAIN, J.P.; TAYLOR, P.M.; CUNNINGHAM, F.M.; COOK, A.J.; MARR, C.M. Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. **Veterinary Record**, v. 146, n. 4, p. 91-95, 2000.

CHEN, C.R.; VOELKEL, N.F.; CHANG, S.W. Pulmonary vascular reactivity: effect of PAF and PAF antagonists. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 1762-1769, 1992.

CHRISTLEY, R.M.; HODGSON, D.R.; EVANS, D.L.; ROSE, R.J. Effects of training on the development of exercise induced arterial hypoxemia in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 6, p. 653-657, 1997.

CHRISTLEY, R.M.; HODGSON, D.R.; ROSE, R.J.; HODGSON, J.L.; WOOD, J.L.; REID, S.W. Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. **Veterinary Record**, v. 148, n. 4, p. 99-104, 2001.

CHRISTLEY, R.; RUSH, B.R. Inflammatory airway disease. In: MCGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON, N.E.; SCHUMACHER, J. **Equine Respiratory Medicine and Surgery**, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p. 591-599.

CLAVIJO, L.C.; CARTER, M.B.; MATHESON, P.J.; WILSON, M.A.; WEAD, W.B.; GARRISON, R.N. PAF increases vascular permeability without increasing pulmonary arterial pressure in the rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n.1, p.261-268, 2001.

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

CORDEAU, M.E.; JOUBERT, P.; DEWACHI, O.; HAMID, Q.; LAVOIE, J.P. IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 87-96, 2004.

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

COUËTIL, 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, p. 356-361, 2007.

DAVIS, J.M.; KOHUT, M.L.; COLBERT, L.H.; JACKSON, D.A.; GHAFFAR, A.; MAYER, E.P. Exercise, alveolar macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 5, p. 1461-1466, 1997.

DAVIS, M.S.; ROYER, C.M.; MCKENZIE, E.C.; WILLIAMSON, K.K.; PAYTON, M.; MARLIN, D. Cold air-induced late-phase bronchoconstriction in horses. **Equine Veterinary Journal Suppl**, v. 36, p. 535-539, 2006.

DAWSON, J.; LEES, P. E SEDGWICK, A.D. Platelet activating factor as a mediator of equine cell locomotion. **Veterinary Research Communications**, v. 12, n. 2-3, p. 101-107, 1988.

De MEY, J.G.; VANHOUTTE, P.M. Interaction between Na⁺,K⁺ exchanges and the direct inhibitory effect of acetylcholine on canine femoral arteries. **Circulation Research**, v. 46, n. 6, p. 826-836, 1980.

DEATON, C.M.; MARLIN, D.J. Exercise-associated oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, n.3, p.278-291, 2003.

DEATON, C.M. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. **Redox Report**, v. 11, n.2, p. 46-52, 2006.

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, p. 25-31, 2005.

DECONTO, I. **Zytologische und bakteriologische untersuchungen des tracheobronchialsekretes bei chronisch lungenkranken pferden.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Hannover (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Hannover). 1983.

DEKKER, L.V.; LEITGES, M.; ALTSCHULER, G.; MISTRY, N.; McDERMOTT, A.; ROES, J.; SEGAL, A.W. Protein kinase C-β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 285-289, 2000.

DEMPSEY, J.A.; WAGNER, P.D. Exercise-induced arterial hypoxemia. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, p. 1997-2006, 1999.

DENGUEZLI-BOUZGARROU, M.; SAAD, H.B.; CHIEKH, I.B.; TABKA, Z.; ZBIDI, A. Role of lung inflammatory mediators as a cause of training-induced lung function changes in runners. **Science & Sports**, v. 22, p. 35-42, 2007.

DERKSEN, F.J.; WILLIAMS, K.J.; PANNIRSELVAM, R.R.; FEIJTER-RUPP, H.; STEEL, C.M.; ROBINSON, N.E. Regional distribution of collagen and haemosiderin in the lungs of horses with exercise-induced pulmonary haemorrhage. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n.6, p. 586-591, 2009.

DEWACHI, O.; JOUBERT, P.; HAMID, Q.; LAVOIE, J.P. Expression of interleukin (IL)-5 and IL-9 receptors on neutrophils of horses with heaves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, p. 31-36, 2006.

DOUCET, M.Y.; VIEL, L. Clinical, radiographic, endoscopic, bronchoalveolar lavage and lung biopsy findings in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 195-202, 2002.

DROST, E.M.; SKWARSKI, K.M.; SAULEDA, J.; SOLER, N.; ROCA, J.; AGUSTI, A.; MACNEE, W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. **Thorax**, v.60, n. 4, p.293-300, 2005.

DYRYNDA, E.A.; PIPE, R.K.; BURT, G.R.; RATCLIFFE, N.A. Modulations of the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. **Aquatic Toxicology**, v. 42, p.169-185, 1998.

ELFMAN, L.; RIIHIMÄKI, M.; PRINGLE, J.; WALINDER, R. Influence of horse stable environment on human airways. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 4, n. 10, p. 1-7, 2009.

EPP, T.S.; McDONOUGH P.; PADILLA, D.J.; GENTILE, J.M.; EDWARDS, K.L.; ERICKSON, H.H.; POOLE, D.C. Exercise-induced pulmonary haemorrhage during submaximal exercise. **Equine Veterinary Journal Suppl**, v. 36, p. 502-507, 2006.

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

ERICKSON, H.H.; EPP, T.S.; POOLE, D.C. Review of alternative therapies for EIPH. **Proceedings of the Congress of the American Association of Equine Practitioners**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2007. Doc. P8112.1207. Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2007/erickson/chapter.asp>>. Acesso em 23Set2009.

ERICKSON, H.H.; POOLE, D.C. Exercise-induced pulmonary hemorrhage: current concepts. In: LEKEUX, P. **Equine Respiratory Disease**. Ithaca, EUA: International Veterinary Information Service, 2007. Doc. B0320.0102. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/erickson/chapter.asp?LA=1> Acesso em: 06.set.2009.

EVANS, T.W.; CHUNG, K.F.; ROGERS, D.F.; BARNES, P.J. Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms. **Journal of Applied Physiology**, v. 63, n. 2, p. 479-484, 1987.

FAIRBAIRN, S.M.; MARR, K.A.; LEES, P.; CUNNINGHAM, F.M. Effects of platelet activating factor on the distribution of radiolabelled leukocytes and platelets in normal horses and asymptomatic horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Research in Veterinary Science**, v. 61, p.107-113, 1996.

FERNADES, W.R.; MORI, E.; SANCHES, A. Cytological evaluation of Rosenfeld-stained tracheobronchial washes and bronchoalveolar lavages, in healthy horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 52, n. 6, p. 604-609. 2000.

FINNEY-HAYWARD, T.K.; BAHRA, P.; LI, S.; POLL, C.T.; NICHOLSON, A.G.; RUSSELL, R.E.K.; FORD, P.A.; WESTWICK, J.; FENWICK, P.S.; BARNES, P.J.; DONNELLY, L.E. Leukotriene B4 release by human lung macrophages via receptor not voltage operated Ca²⁺ channels. **European Respiratory Journal**, v. 33, n. 5, p. 1105-1112, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GABRIJELCIC, J.; ACUÑA, A.; PROFITA, M.; PATERNÒ, A.; CHUNG, K.F.; VIGNOLA, A.M.; RODRÍGUEZ-ROISIN, R. Neutrophil airway influx by platelet-activating factor in asthma: role of adhesion molecules and LTB4 expression. **The European Respiratory Journal**, v. 22, n. 2, p. 290-297. 2003.

GAUDREULT, E.; STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Involvement of Leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 75, n. 1-4, p. 25-34, 2005.

GERBER, V.; KING, M.; SCHNEIDER, D.A.; ROBINSON, N.E. Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 5, p. 411-417. 2000.

GERBER, V. Mucus in equine lower airway disease. In: VIEL, L.; ROBINSON, N.E.; DUCHARME, N.G.; McGORUM, B.C. (Eds.). **Proceedings of the 2nd World Equine Airways Symposium**. Scotland, Edinburg, 2001. Disponível em <http://www.ivas.org/proceedings/weas/2001/Gerber.pdf>. Acesso em 09.jun.2009.

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.

GÖGGEL, R.; UHLIG, S. The inositol trisphosphate pathway mediates platelet-activating-factor-induced pulmonary oedema. **The European Respiratory Journal**, v. 25, n. 5, p. 849-857, 2005.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 9-17, 2007.

GRIMMINGER, F.; SPRIESTERSBACH, R.; WEISSMANN, N.; WALMRATH, D.; SEEGER, W. Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. **Journal of Applied Physiology**, v. 78, n. 4, p. 1509-1515, 1995.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n.6, p. 3440-3450, 1985.

HACKETT, R.P.; DUCHARME, N.G.; GLEED, R.D.; MITCHELL, L.; SODERHOLM, L.V.; ERICKSON, B.K.; ERB, H.N. Do Thoroughbred and Standardbred horses have similar increases in pulmonary vascular pressures during exertion? **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 291-296, 2003.

HALLSTRAND, T.S.; DEBLEY, J.S.; FARIN, F.M.; HENDERSON, W.R. Role of MUC5AC in the pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 5, p. 1092-1098, 2007.

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

HELMING, L.; GORDON, S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 33-42, 2007.

HEWSON, J.; VIEL, L. Sampling, microbiology and cytology of the respiratory tract. In: LEKEUX, P. **Equine Respiratory Diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002. Doc. 0308.0602. Disponível em <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/viel/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso 06Set2009.

HINCHCLIFF, K.W.; JACKSON, M.A.; MORLEY, P.S.; BROWN, J.A.; DREDGE, A.E.; O'CALLAGHAN, P.A.; McCAFFREY, J.P.; SLOCOMBE, R.E.; CLARKE, A.E. Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage and performance in Thoroughbred racehorses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 5, p. 768-774, 2005a.

HINCHCLIFF, K.W.; JACKSON, M.A.; BROWN, J.A.; DREDGE, A.E.; O'CALLAGHAN, P.A.; McCAFFREY, J.P.; MORLEY, P.S.; SLOCOMBE, R.E.; CLARKE, A.E. Tracheobronchoscopic assessment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 4, p. 596-598, 2005b.

HINCHCLIFF, K.W. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In: McGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON, N.E.; SCHUMACHER, J. **Equine Respiratory Medicine and Surgery**, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p. 617-629.

HINES, M.T.; SCHOTT II, H.C.; BAYLY, W.M.; LEROUX, A.J. Exercise and immunity: a review with emphasis on the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, p. 280-289, 1996.

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

HODGSON, D.R.; CHRISTLEY, R.M.; WOOD, J.L.N.; REID, S.W.J.; HODGSON, J.L. Relationship between coughing and airway inflammation in young racehorses. In: HOFFMAN, A.; ROBINSON, N.E.; WADE, J.F. **Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome**, Havemeyer Foundation Monograph Series N.º 9. Newmarket, UK: R & W Publications, p.16-18, 2003.

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

HODGSON, J.L.; HODGSON, D.R. Collection and analysis of respiratory tract samples. In: McGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON, N.E.; SCHUMACHER, J. **Equine Respiratory Medicine and Surgery**, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p. 119-150.

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

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

HOLCOMBE, S.J.; ROBINSON, N.E.; DERKSEN, F.J.; BERTOLD, B.; GENOVESE, R.; MILLER, R.; de FEITER-RUPP, H.; CARR, E.A.; EBERHART, S.W.; BORUTA, D.; KANEENE, J.B. Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n.4, p. 300-304, 2006.

HOLCOMBE, S.J.; DUCHARME, N.G. Disorders of the nasopharynx and soft palate. In: McGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON, N.E.; SCHUMACHER, J. **Equine Respiratory Medicine and Surgery**, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p. 437-457.

HOPKINS, S.R. The lung at maximal exercise: insights from comparative physiology. **Clinics in Chest Medicine**, v. 26, n. 3, p. 459-468, 2005.

HOPKINS, S.R.; SCHOENE, R.B.; HENDERSON, W.R.; SPRAGG, R.G.; MARTIN, T.R.; WEST, J.B. Intense exercise impairs the integrity of the pulmonary blood-gas barrier in elite athletes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 155, n. 3, p. 1090-1094, 1997.

HUGHES, K.J.; MALIKIDES, N.; HODGSON, D.R.; HODGSON, J.L. Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses 1. Evaluation of cytological stains and the percentage of mast cells and eosinophils. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. 11, p. 681-684, 2003.

HUSTON, L.; BAYLY, W.; LIGGITT, H. Alveolar macrophage function in Thoroughbreds after strenuous exercise. In: GILLESPIE, J.R.; ROBINSON, N.E. (eds.). **Equine Exercise Physiology 2**. Davis, CA: ICEEP, 1987, p. 243-253.

ISHII, S.; NAGASE, T.; SHINDOU, H.; TAKIZAWA, H.; OUCHI, Y.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine asthma model. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 7095-7102, 2004.

IWAMOTO, J.; MORIN, F.C. 3rd. Nitric oxide inhibition varies with hemoglobin saturation. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 5, p. 2332-2336, 1993.

Jl, L.L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 142-152, 2008.

JIANG, Y.; WEN, K.; ZHOU, X.; SCHWEGLER-BERRY, D.; CASTRANOVA, V.; HE, P. Three-dimensional localization and quantification of PAF-induced gap formation in intact venular microvessels. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n.2, p. H898-H906, 2008.

KIKUCHI, M.; SHIRASAKI, H.; HIMI, T. Platelet-activating factor (PAF) increases NO production in human endothelial cells-real-time monitoring by DAR-4M AM. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 78, n. 4-5, p. 305-309, 2008.

KINDIG, C.A.; ERICKSON, H.H.; POOLE, D.C. Dissociation of exercise-induced pulmonary hemorrhage and pulmonary artery pressure via nitric oxide synthase inhibition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 11, p. 715-721, 2000.

KINDIG C.A.; MCDONOUGH P.; FINLEY G.; BEHNKE B.J.; RICHARDSON T.E.; ERICKSON H.H.; POOLE D.C. NO inhalation reduces pulmonary arterial pressure but not hemorrhage in maximal exercising horses. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n.6, p. 2674-2678, 2001.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxiaditive stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 2, p. 476-494, 2006.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 178-191, 2008.

KIZAKI, T.; TAKEMASA, T.; SAKURAI, T.; IZAWA, T.; HANAWA, T.; KAMIYA, S.; HAGA, S.; IMAIZUMI, K.; OHNO, H. Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 152-156, 2008.

KLEIBER, C.; MCGORUM, B.C., HOROHOV, D.W., PIRIE, R.S.; ZURBRIGGEN, A.; STRAUB, R. Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horse with recurrent airway obstruction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 91-97. 2005.

KWASNIEWSKI, F.H.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S. Small bowel injury associated to allergy is triggered by platelet-activating factor, mast cells, neutrophils and protected by nitric oxide. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 371-378, 2008.

LAPOINTE, J.M.; VRINS, A.; MCCARVILL, E. A survey of exercise-induced pulmonary haemorrhage in Quebec standardbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 6, p. 482-485, 1994.

LEARY, P.J.; RAJASEKARAN, S.; MORRISON, R.R.; TUOMANEN, E.I.; CHIN, T.K.; HOFMANN, P.A. A cardioprotective role for platelet-activating factor through NOS-dependent S-nitrosylation. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.294, n. 6, p. H2775-H2784, 2008.

LEE, Y.M.; HYBERTSON, B.M.; CHO, Y.G.; REPINE, J.E. Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 140, n.5, p. 312-319, 2002.

LEMAIRE, I.; FALZONI, S.; LEDUC, N.; ZHANG, B.; PELLEGATTI, P.; ADINOLFI, E.; CHIOZZI, P.; DI VIRGILIO, F. Involvement of the purinergic P2X7 receptor in the formation of multinucleated giant cells. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 7257-7265, 2006.

LESSA, D.A.B.; MORI, E.; VIANA, E.B.; SANTOS, O.J.; MOREIRA, J.F.E.; FERNANDES, W.R. Lavado broncoalveolar em equinos: revisão de literatura parte 1: técnicas de colheita. **Arquivo em Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 213-217, 2005.

LINDBERG, A.; ROBINSON, N.E.; NÄSMAN-GLASER, B.; JENSEN-WAERN, M.; LINDGREN, J.A. Assessment of leukotriene B4 production in leukocytes from horses with recurrent airway obstruction. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 3, p. 289-295, 2004.

LORA, J.M.; ZHANG, D.M.; LIAO, S.M.; BURWELL, T.; KING, A.M.; BARKER, P.A.; SINGH, L.; KEAVENEY, M.; MORGENSTERN, J.; GUTIÉRREZ-RAMOS, J.C.; COYLE, A.J.; FRASER, C.C. Tumor necrosis factor- α triggers mucus production in airway epithelium through an I κ B kinase β -dependent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 43, p. 36510-36517, 2005.

LOU, Y.P.; TAKEYAMA, K.; GRATTAN, K.M.; LAUSIER, J.A.; UEKI, I.F.; AGUSTÍ, C.; NADEL, J.A. Platelet-activating factor induces goblet cell hyperplasia and mucin gene expression in airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 6, p. 1927-1934, 1998.

LUNDBORG, M.; BOUHAFS, R.; GERDE, P.; EWING, P.; CAMNER, P.; DAHLÉN, S.E.; JARSTRAND, C. Aggregates of ultrafine particles modulate lipid peroxidation and bacterial killing by alveolar macrophages. **Environmental Research**, v. 104, n. 2, p. 250-257, 2007.

LUNN, D.P.; BREATHNACH, C.; SOBOLL, G. Immunology and Immunopathology. In: MCGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON, N.E.; SCHUMACHER, J. **Equine Respiratory Medicine and Surgery**. Philadelphia: Elsevier, 2007, p. 71-81.

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

MALIKIDES, N.; HUGHES, K.J.; HODGSON, J.L. Comparison of tracheal aspirates before and after high-speed treadmill exercise in racehorses. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 10, 2007.

MANOHAR, M.; GOETZ, T.E. L-NAME does not affect exercise-induced pulmonary hypertension in Thoroughbred horses. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, p. 1902-1908, 1998.

MANOHAR, M.; GOETZ, T.E. Pulmonary vascular pressures of strenuously exercising Thoroughbreds during intravenous infusion of nitroglycerin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 11, p. 1436-1440, 1999.

MANOHAR, M.; GOETZ, T.E.; HASSAN, A.S. Nitric oxide synthase inhibition in thoroughbred horses augments O₂ extraction at rest and submaximal exercise, but not during short-term maximal exercise. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 36, p. 481-486, 2006.

MARATHE, G.K.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A.; McINTYRE, T.M. Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.11, p.139-142, 2001.

MARR, K.A.; FOSTER, A.P.; LEES, P.; CUNNINGHAM, F.M.; PAGE, C.P. Effect of antigen challenge on the activation of peripheral blood neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Research in Veterinary Science**, v. 62, p. 253-260, 1997.

MARR, K.A.; LEES, P.; CUNNINGHAM, F.M. Antigen challenge increases adherence of circulating neutrophils in horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 65-70, 2002.

MASTALOUDIS, A.; MORROW, J.D.; HOPKINS, D.W.; DEVARAJ, S.; TRABER, M.G. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 10, p. 1329-1341, 2004.

MAZAN, M.R.; HOFFMAN, A.M. Clinical Techniques for diagnosis of inflammatory airway disease in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, n. 3, p. 238-257, 2003.

McGORUM, B.C.; DIXON, P.M. Clinical examination of the respiratory tract. In: McGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON, N.E.; SCHUMACHER, J. **Equine Respiratory Medicine and Surgery**. Philadelphia: Elsevier, 2007, p. 103-117.

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

McPHERSON, E.A.; THOMSON, J.R. Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 1: Nature of the disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n.3, p. 203-206, 1983.

MEYER, T.S.; FEDDE, M.R.; GAUGHAN, E.M.; LANGSETMO, I.; ERICKSON, H.H. Quantification of exercise-induced pulmonary haemorrhage with bronchoalveolar lavage. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n.4, p. 284-288, 1998.

MICHELOTTO JÚNIOR, P.V.; BIAVA, J.S.; GONÇALVES, R.C.; CASSOU, F.; BONFÁ, A.F.; MACHADO, C.D. Aspirado traqueal de cavalos clinicamente sadios da raça quarto de milha após prova de três tambores. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 1-7, 2007.

MILLS, P.C.; HIGGINS, A.J. Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: implications for the exercising horse. **The Veterinary Journal**, v. 153, p.125-148, 1997.

MILLS, P.C.; MARLIN, D.J.; DEMONCHEAUX, E.; SCOTT, C.; CASAS, I.; SMITH, N.C.; HIGENBOTTAM, T. Nitric oxide and exercise in the horse. **The Journal of Physiology**, v. 495, p.863-874, 1996.

MIYAZAKI, H.; OH-ISHI, S.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; TOSHINAI, K.; HA, S.; HAGA, S.; JI, L.L.; OHNO, H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 1-2, p. 1-6, 2001.

MORI, E.; MORI, C.M.C.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; LARA, M.C.C.S.H.; FERNANDES, W.R. Evaluation of alveolar macrophage function after experimental infection with equine herpesvirus-1 in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 271-278, 2003.

MUEHLMANN, L.A.; ZANATTA, A.L.; FARIAS, C.L.A.; BIEBERBACH, E.W.; MAZZONETTO, A.C.; MICHELOTTO JR, P.V.; FERNANDES, L.C.; NISHIYAMA, A. Dietary supplementation with soybean lecithin increases pulmonary PAF bioactivity in asthmatic rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Apr 14, 2009 [Epub ahead of print].

NAKAJIMA, T.; ITO, M.; TCHOUA, U.; TOJO, H.; HASHIMOTO, M. Phospholipase A₂-mediated superoxide production of murine peritoneal macrophages induced by chrysotile stimulation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 779-787, 2000.

NEVIN, B.J.; BROADLEY, K.J. Nitric oxide in respiratory diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 95, p. 259-293, 2002.

NEWTON, J.R.; WOOD, J.L. Evidence of an association between inflammatory airway disease and EIPH in young Thoroughbreds during training. **Equine Veterinary Journal Suppl**, v. 34, p. 417-424, 2002.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 403-409, 1994.

OHAR, J.A.; WALLER, K.S.; PANTANO, J.; DEMELLO, D.E.; DAHMS, T.E. Chronic platelet-activating factor induces a decrease in pulmonary vascular compliance, hydroxyproline, and loss of vascular matrix. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, n.6, p. 1628-1634, 1994.

OWEN, J.S.; BAKER, P.R.S.; O'FLAHERTY, J.T.; THOMAS, M.J.; SAMUEL, M.P.; WOOTEN, R.E.; WYKLE, R.L.. Stress-induced platelet-activating factor synthesis in human neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1733, p.120-129, 2005.

PARK, J.Y.; FERRELL, R.E.; PARK, J.J.; HAGBERG, J.M.; PHARES, D.A.; JONES, J.M.; BROWN, M.D. NADPH oxidase p22phox gene variants are associated with systemic oxidative stress biomarker responses to exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, p. 1905-1911, 2005.

PEREZ-MORENO, C.I.; COUËTIL, L.L.; PRATT, S.M.; OCHOA-ACUÑA, H.G.; RASKIN, R.E.; RUSSELL, M.A. Effect of furosemide and furosemide-carbazochrome combination on exercise-induced pulmonary hemorrhage in Standardbred racehorses. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 8, p. 821-827, 2009.

PETERS-GOLDEN, M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 31, p. 3-7, 2004.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.

PICKLES, K.; PIRIE, R.S.; RHIND, S.; DIXON, P.M.; McGORUM, B.C. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: comparison of sequential and pooled aliquots. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 288-291. 2002a.

PICKLES, K.; PIRIE, R.S.; RHIND, S.; DIXON, P.M.; McGORUM, B.C. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 2: comparison of smear and cytocentrifuged preparations, **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 292-296. 2002b.

PICKLES, K.; PIRIE, R.S.; RHIND, S.; DIXON, P.M.; McGORUM, B.C. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: the effect of time, temperature and fixatives, **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 297-301. 2002c.

PINHO, R.A.; CHIESA, D.; MEZZOMO, K.M.; ANDRADES, M.E.; BONATTO, F.; GELAIN, D.; DAL PIZZOL, F.; KNORST, M.M.; MOREIRA, J.C.F. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. **Respiratory Medicine**, v. 101, p. 1830-1835, 2007.

PIRRONE, F.; ALBERTINI, M.; CLEMENT, M.G.; LAFORTUNA, C.L. Respiratory mechanics in Standardbred horses with sub-clinical inflammatory airway disease and poor athletic performance. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 144-150, 2007.

PORTIER, K.; de MOFFARTS, B.; FELLMAN, N.; KIRSCHVINK, N.; MOTTA, C.; LETELLIERW, C.; RUELLAND, A.; van ERCK, E.; LEKEUX, P.; COUDER, J. The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 36, p. 279-284, 2006.

RACKESTRAW, P.; HACKETT, R.; DUCHARME, N.; NIELAN, G.; ERB, H. Arytenoid cartilage movement in resting and exercising horses. **Veterinary Surgery**, v. 20, p. 122-177, 1991.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 222-239, 2006.

RAIDAL, S.L.; LOVE, D.N.; BAILEY, G.D.; ROSE, R.J. The effect of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL-derived lymphocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 68, p. 249-253, 2000.

RAIDAL, S.L.; ROSE, R.J.; LOVE, D.N. Effects of training on resting peripheral blood and BAL-derived leucocyte function in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 3, p. 238-243, 2001.

RAKER, C.W.; BOLES, C.L. Pharyngeal lymphoid hyperplasia in the horse. **Journal of Equine Medicine and Surgery**, v. 2, p. 202-207, 1978.

RAMIREZ, R.; CHONG, T.; VICTORINO, G.P. Angiotensin II effect on hydraulic permeability: interaction with endothelin-1, nitric oxide, and platelet activating factor. **The Journal of Surgical Research**, v. 134, n. 2, p. 259-264, 2006.

REDINGTON, A.E. Modulation of nitric oxide pathways: therapeutic potential in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 263-276, 2006.

RICHARD, E.A.; FORTIER, G.D.; LEKEUX, P.M.; ERCK, E.V. Laboratory findings in respiratory fluids of poorly-performing horse. **The Veterinary Journal**, 2009 [Epub ahead of print].

RIIHIMÄKI, M.; RAINE, A.; ELFMAN, L.; PRINGLE, J. Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, p.432-439, 2008a.

RIIHIMÄKI, M.; LILLIEHÖÖK, I.; RAINE, A.; BERG, M.; PRINGLE, J. 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, p. 52-55, 2008b.

ROBINSON, N.E. Workshop summary. In: HOFFMAN, A.; ROBINSON, N.E.; WADE, J.F. **Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome**, Havemeyer Foundation, Monograph Series n. 9, R & W Publications, p. 89-91, 2003.

ROBINSON, N.E.; BERNEY, C.; DEFEIJTER-RUPP, H.; JEFcoat, A.M.; CORNELISSE, C.; GERBER, V. Mucus, cough, airway obstruction and inflammation. In: HOFFMAN, A.; ROBINSON, N.E.; WADE, J.F. **Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome**, Havemeyer Foundation, Monograph Series n. 9. Newmarket, UK: R & W Publications, p.13-15, 2003.

ROBINSON, N.E. Tracheal mucus and inflammation: prevalence and consequences in midwestern horses. **Proceedings of the Third World Equine Airways Symposium**, Cornell University, July 20-22, p.45-48, 2005.

ROBINSON, N.E.; KARMAUS, W.; HOLCOMBE, S.J.; CARR, E.A.; DERKSEN, F.J. Airway inflammation in Michigan pleasure horses: prevalence and risk factors. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 4, p. 293-299, 2006.

ROBINSON, N.E. How horses breathe: the respiratory muscles and the airways. In: MCGORUM, B.C.; DIXON, P.M.; ROBINSON, N.E.; SCHUMACHER, J. **Equine Respiratory Medicine and Surgery**. Philadelphia: Elsevier, 2007, p. 19-31.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 166, p. 1685-1701, 1987.

SÁNCHEZ, A.; COUËTIL, L.L.; WARD, M.P.; CLARK, S.P. Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 87-92, 2005.

SANTUS, P.; SOLA, A.; CARLUCCI, P.; FUMAGALLI, F.; GENNARO, A.D.; MONDONI, M.; CARNINI, C.; CENTANNI, S.; SALA, A. Lipid peroxidation and 5-lipoxygenase activity in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 838-843, 2005.

SHAO, M.X.G.; NADEL, J.A. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF- α -converting enzyme. **The Journal of Immunology**, n.175, p.4009-4016, 2005.

SHIBAMOTO, T.; YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, T. Jr; SAEKI, Y.; KAWAMOTO, M.; KOYAMA, S.; PAF increases capillary pressure but not vascular permeability in isolated blood-perfused canine lungs. **American Journal of Physiology**, v. 264, p.H1454-H1459, 1993.

SHIBAMOTO, T.; LIU, W.; CUI, S.; ZHANG, W.; TAKANO, H.; PAF, rather than histamine, participates in mouse anaphylactic hypotension. **Pharmacology**, v. 82, p. 114-120, 2008.

SHINDO, K.; KOIDE, K.; FUKUMURA, M.; Platelet-activating factor increases leukotriene B₄ release in stimulated alveolar macrophages from asthmatic patients. **European Respiratory Journal**, v. 11, p. 1098-1104, 1998.

STAFFORINI, D.M.; McINTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M. Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 40, n. 6, p. 643-672, 2003.

STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 22, p. 7738-7742, 1985.

SUMITA, C.; YAMANE, M.; MATSUDA, T.; MAEDA, M.; NARIAI, T.; FUJIO, Y.; AZUMA, J. Platelet activating factor induces cytoskeletal reorganization through Rho family pathway in THP-1 macrophages. **FEBS Letters**, v. 579, p. 4038-4042, 2005.

THACKER, E.L. Lung inflammatory responses. **Veterinary Research**, v. 37, p. 469-486, 2006.

THORNTON, D.J.; SHEEHAN, J.K. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. **Proceedings of the American Thoracic Society**, n.1, p.54-61, 2004.

TSANGARIS, I.; LEKKA, M.E.; KITSIOULI, E.; CONSTANTOPOULOS, S.; NAKOS, G. Bronchoalveolar lavage alterations during prolonged ventilation of patients without acute lung injury. **The European Respiratory Journal**, v. 21, n. 3, p. 495-501, 2003.

UHLIG, S.; GÖGGEL, R.; ENGEL, S. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 206-221, 2005.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VANDENPUT, S.; DUVIVIER, D.H.; VOTION, D.; ART, T.; LEKEUX, P. Environmental control to maintain stable COPD horses in clinical remission: effects on pulmonary function. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 2, p. 93-96. 1998.

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

VIEL, L.; HEWSON, J. Bronchoalveolar Lavage. In: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine**, 5.ed., St. Louis: Saunders, 2003, p.407-411.

VOYNOW, J.A.; FISCHER, B.M.; MALARKEY, D.E.; BURCH, L.H.; WONG, T.; LONGPHRE, M.; HO, S.B.; FOSTER, W.M.. Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. **American Journal of Physiology and Lung Cell Molecular Physiology**, n. 287, p. L1293-L1302, 2004.

WEST, J.B. Pulmonary capillary stress failure. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, p. 2483-2489, 2000.

WEST, J.B.; MATHIEU-COSTELLO, O.; JONES, J.H.; BIRKS, E.K.; LOGEMANN, R.B.; PASCOE, J.R.; TYLER, W.S. Stress failure of pulmonary capillaries in racehorses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n.3, p. 1097-1109, 1993.

WEST, J.B.; MATHIEU-COSTELLO, O. Stress failure of pulmonary capillaries as a mechanism for exercise induced pulmonary haemorrhage in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 6, p. 429-431, 1994.

WEST, J.B.; MATHIEU-COSTELLO, O. Stress failure of pulmonary capillaries as a limiting factor for maximal exercise. **European Journal of Applied Physiology Occupational Physiology**, v. 70, n. 2, p. 99-108, 1995.

WEST, J.B.; TYLER, W.S.; BIRKS, E.K.; MATHIEU-COSTELLO, O. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In: RANTANEN, N.W.; HAUSER, M.L. **Dubai International Equine Symposium: The Diagnosis and Treatment of Respiratory Disease**. USA: Neyenesch Printers Inc., 1997, p. 353-368.

WEST, J.B.; MATHIEU-COSTELLO, O. Structure, strength, failure, and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 543-572, 1999.

WILSHER, S.; ALLEN, W.R.; WOOD, J.L. Factors associated with failure of thoroughbred horses to train and race. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 2, p. 113-118, 2006.

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.

WOOD, L.G.; GIBSON, P.G.; GARG, M.L. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. **European Respiratory Journal**, v. 21, p. 177-186, 2003.

WOODS, P.S.; ROBINSON, N.E.; SWANSON, M.C.; REED, C.E.; BROADSTONE, R.V.; DERKSEN, F.J. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. **Equine Veterinary Journal**, v.25, n. 3, p. 208-213, 1993.

XU, W.; ZHENG, S.; DWEIK, R.A.; ERZURUM, S.C. Role of epithelial nitric oxide in airway viral infection. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n.1, p. 19-28, 2006.

ZHANG, Y.; GU, Y.; LUCAS, M.J.; WANG, Y. Antioxidant superoxide dismutase attenuates increased endothelial permeability induced by platelet-activating factor. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 10, n.1, p. 5-10, 2003.

ZHU, L.; SCHWEGLER-BERRY, D.; CASTRANOVA, V.; HE, P. Internalization of caveolin-1 scaffolding domain facilitated by Antennapedia homeodomain attenuates PAF-induced increase in microvessel permeability. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, p. H195-H201, 2004.