



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO ALERGOLÓGICO DE UMA POPULAÇÃO
DE 28 CAVALOS, NA REGIÃO DE ÉVORA**

João Pedro Gomes Gonçalves Sancho Leocádio

Orientação | Prof. Dr. Luís Miguel Lourenço Martins

Dr. Tomé António Fino Vitorino

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2019



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO ALERGOLÓGICO DE UMA POPULAÇÃO DE 28 CAVALOS, NA REGIÃO DE ÉVORA

João Pedro Gomes Gonçalves Sancho Leocádio

Orientação | Prof. Dr. Luís Miguel Lourenço Martins

Dr. Tomé António Fino Vitorino

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2019

Constituição do Júri:

Presidente: Rita Payan Carreira

Professora Catedrática – Universidade de Évora

Arguente: Ana Mafalda Lourenço

Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Orientador: Luís Miguel Lourenço Martins

Professor Auxiliar da Universidade de Évora

“A maior glória não é ficar de pé, mas levantar-se cada vez que se cai.”

Confúcio

Agradecimentos

Cumprindo esta etapa a que me propus e que agora termino, não quero deixar de agradecer e lembrar todas as pessoas que me acompanharam desde o dia em que, ainda criança, decidi ser veterinário.

Mais do que tudo e por não terem tido a oportunidade de acompanhar de perto estes últimos anos, mas sempre a olharem por mim, quero agradecer primeiramente a duas pessoas extraordinariamente importantes. Ao meu avô Manuel, por me ter introduzido e incentivado desde cedo a seguir veterinária, pelos valores que me transmitiu, pelos objetivos que me foi traçando e sobretudo pela garra que sempre quis que eu tivesse. À minha avó Emília, pela devoção que sempre teve por mim, pelo carinho e por tudo aquilo que me deu.

À minha mãe, por ter sido sempre destemida, sacrificando-se por mim, pelo conforto, mesmo nos momentos menos bons, pelo apoio incondicional e, por ter permitido que tudo até aqui fosse possível.

À minha irmã, pela garra e exigência que me transmite, pela vontade insaciável de sempre me querer ver vencer, por também ela me traçar objetivos e estar sempre ao meu lado.

Ao meu cunhado, o irmão que nunca tive, pela coragem que me passa, pelas conversas profundas e sábios conselhos, e pelos bons momentos juntos.

Aos meus padrinhos, que estiveram sempre presentes, sobretudo durante estes últimos anos, ajudando e apoiando sempre que possível.

À Adelina, que me acompanha desde que nasci, achando que nunca comi o suficiente, mesmo quando já satisfeito.

À minha família francesa, Laurent. Por todo o carinho, pela forma fantástica com que fui tratado e por me terem permitido uma das melhores experiências da minha vida. Obrigado por me fazerem sentir parte da família. Com certeza também fazem parte da minha.

Aos meus orientadores, o Prof. Dr. Luís Martins e o Dr. Tomé Fino, pela disponibilidade que tiveram quando assim precisei, pelos conselhos que foram dando e pela paciência que tiveram no decorrer deste processo.

A toda a equipa da Equimuralha, por me ter aceite como estagiário, ajudando de sobremaneira na realização deste trabalho. Obrigado pelos valores que me foram transmitindo e por terem estado sempre disponíveis para me ensinar e corrigir.

A toda a equipa do Serviço de Cirurgia e Urgências da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, pela abertura que sempre tiveram para me receber e pelas oportunidades que me deram.

Aos Doutores Nuno Bernardes, Jérôme Clavel e Nicolas Belmaure, bem como, às equipas, quer do *Liphook Equine Hospital*, quer do Hospital Arco do Cego. Foram muito importantes na minha formação e deram-me a oportunidade de aprender bastante durante os estágios.

A todos professores da Universidade de Évora, que contribuíram igualmente para a minha formação académica.

A todos os meus amigos e amigas, que me acompanharam durante todo este tempo, tanto antes como durante o curso, contribuindo para momentos inesquecíveis. Agradecer, especialmente, à família que criei numa cidade que pouco conhecia, não só pelas horas intensas de estudo conjuntas, como também por toda a vida académica que passámos juntos.

Por último, agradecer ao meu sobrinho, que apesar de ainda não ter nascido, já é uma fonte de inspiração.

A todos um Muito Obrigado!

Resumo

Esta dissertação teve quatro objetivos principais: (i) verificação da validade diagnóstica dos testes intradérmicos; (ii) identificação das principais fontes alérgicas envolvidas na sensibilização desta população; (iii) identificação de associações entre os resultados intradérmicos, ambiente, sexo e sinais clínicos, e (iv) identificação de associações entre respostas aos extratos alérgicos.

Foram selecionados 28 equinos da região de Évora, Portugal, 21 com história clínica compatível com alergia (grupo alérgico) e sete sem suspeita alérgica (grupo controlo).

Concluiu-se que os testes intradérmicos são efetivamente uma ferramenta de diagnóstico capaz de discriminar entre animais sensibilizados e alérgicos, e animais saudáveis. Identificou-se maior sensibilização a culicídeos e fungos aerógenos, designadamente *Alternaria alternata*.

Não se observou qualquer relação entre resultados intradérmicos e tipo/intensidade de sinais clínicos, sexo ou ambiente. No entanto, observaram-se correlações significativas entre sensibilização aos ácaros do pó e de armazenamento, entre ácaros do pó e fungos e, ainda, entre ácaros e pólenes.

Palavras-chave: Alergia, equinos, hipersensibilidade, atopia, imunidade

Allergological study of a population of 28 horses from the region of Évora

Abstract

The main objectives of this dissertation were: (i) to verify the diagnostic value of intradermal tests; (ii) identification of the main sensitizing allergenic sources for this population; (iii) identification of associations between intradermal results and environment, gender and clinical signs and (iv) identification of associations between response to the different allergenic extracts.

Twenty-eight horses living in the region of Évora, Portugal, were selected, 21 with allergy-compatible clinical record (allergic group), and seven with no suspected allergy (control group).

It has been concluded that intradermal tests were an effective diagnostic tool, useful in differentiating between sensitized and allergic animals from healthy ones. Increased allergic sensitization to culicoides and molds, such as *Alternaria alternata*, was observed.

No relationship was observed between intradermal results and clinical signs type/severity, gender or environment. However, significant correlations were found between sensitization to dust mites and storage mites, dust mites and molds, and mites and pollens.

Keywords: Allergy, equine, hypersensibility, atopy, immunity

Índice Geral

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VI
Índice Geral	VII
Índice de Figuras.....	X
Índice de Tabelas	XIII
Índice de Gráficos	XV
Lista de Abreviaturas e Siglas	XVI
Prefácio.....	1
I. Casuística	2
II. Revisão Bibliográfica	3
1. Sistema Imunitário	3
1.1. Órgãos do Sistema Imunitário.....	3
1.1.1. Medula Óssea	4
1.1.2. Timo.....	4
1.1.3. Linfonodos.....	4
1.1.4. Baço	5
1.1.5. Tecidos Linfoides associados à Mucosa	6
1.2. Barreiras Anatômicas e Fisiológicas	7
1.3. Imunidade Inata	8
1.3.1. Células do Sistema Imunitário Inato	8
1.3.1.1. Neutrófilos.....	9
1.3.1.2. Monócitos	10
1.3.1.3. Macrófagos.....	10
1.3.1.4. Células Dendríticas	11
1.3.1.5. Mastócitos.....	12
1.3.1.6. Basófilos	13
1.3.1.7. Eosinófilos	13
1.3.1.8. Células Natural Killer (NK)	13
1.3.2. Reconhecimento de Microrganismos	14
1.3.3. Mecanismos Efetores da Imunidade Inata.....	15
1.3.4. Sistema Complemento	20
1.4. Imunidade Adaptativa	21
1.5. Bases Imunológicas de Doenças Alérgicas	26

2.	Respostas Imunoalergológicas em Equinos	30
2.1.	Anafilaxia	30
2.1.1.	Sinais Clínicos	31
2.1.2.	Etiopatogenia	31
2.1.3.	Diagnóstico	32
2.1.4.	Tratamento.....	33
2.1.5.	Prevenção.....	34
2.1.6.	Prognóstico.....	35
2.2.	Hipersensibilidade aos Culicídeos	35
2.2.1.	Sinais Clínicos	36
2.2.2.	Etiopatogenia	38
2.2.3.	Diagnóstico	39
2.2.4.	Tratamento.....	42
2.2.5.	Prevenção.....	44
2.2.6.	Prognóstico.....	44
2.3.	Doença Atópica Equina	45
2.3.1.	Etiopatogenia	45
2.3.2.	Dermatite Atópica	46
2.3.3.	Hipersensibilidade Alimentar	47
2.3.4.	Diagnóstico.....	47
2.3.5.	Prevenção e Tratamento.....	48
2.3.6.	Imunoterapia Alergénio-específica	50
2.4.	Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (RAO).....	51
2.4.1.	Sinais Clínicos	52
2.4.2.	Etiopatogenia	53
2.4.3.	Diagnóstico.....	55
2.4.4.	Diagnóstico Diferencial: Doença Inflamatória das Vias Aéreas.....	58
2.4.5.	Prevenção e Tratamento.....	59
2.4.6.	Prognóstico.....	61
III.	Trabalho Experimental	62
1.	Introdução	62
2.	Objetivos	63
3.	Materiais e Métodos	63
3.1.	Caracterização da População	63
3.2.	Extratos Alergénicos Utilizados	64
3.3.	Desenho Experimental	65

3.4.	Análise Estatística.....	66
4.	Resultados.....	67
4.1.	Anamnese e Exame Clínico.....	67
4.2.	Testes Intradérmicos - Grupo Controlo vs Alérgico.....	68
4.3.	Testes Intradérmicos – Grupo Alérgico.....	68
4.4.	Estudo da Relação entre os Resultados Intradérmicos e o Sexo.....	70
4.5.	Estudo da Relação entre os Resultados Intradérmicos e o Ambiente.....	71
4.6.	Estudo da Relação entre os Resultados Intradérmicos e o Tipo de Manifestação Clínica.....	73
4.7.	Determinação de Correlação entre os Resultados Intradérmicos.....	75
5.	Discussão.....	75
6.	Conclusão.....	79
	Bibliografia.....	81
	Anexos.....	i
	Anexo A.....	ii
	Anexo B.....	iii
	Anexo C.....	vi
	Anexo D.....	vii

Índice de Figuras

Figura 1 – As três maiores barreiras que protegem o animal contra a invasão microbiana. Cada barreira apresenta uma maior efetividade imunitária que a anterior (adaptado de Tizard, 2013)...	7
Figura 2 – A origem das células da medula óssea. De assinalar que as células linfoides se originam de um conjunto de células precursoras diferente das células mieloides (adaptado de Tizard, 2013).....	9
Figura 3 – Os monócitos no sangue podem-se diferenciar em vários tipos de macrófagos e ainda em células dendríticas (adaptado de Tizard, 2013).....	11
Figura 4 – Visão geral das características essenciais da inflamação aguda, com a atuação de mecanismos inatos mediados por células e outros mecanismos de defesa (adaptado de Tizard, 2013).....	16
Figura 5 – Funções e características de cada classe de imunoglobulinas (com base na informação disponibilizada em Tizard, 2013 e Callahan, 2014).....	23
Figura 6 – Resposta Imunitária Humoral Primária e Secundária. Após a exposição ao antigénio A no dia 0, ocorre uma resposta humoral primária para o antigénio A. Esta resposta dura cerca de 30-40 dias e é dominada por um tipo de imunoglobulina designada IgM. Quando ocorre uma nova exposição ao antigénio A e uma exposição a um novo antigénio (B), o animal produz uma resposta mais efetiva contra o antigénio A, mas uma resposta primária contra o antigénio B (adaptado de Callahan, 2014).....	25
Figura 7 – Fase de sensibilização da hipersensibilidade de tipo I. (1) o alergénio deposita-se sob a barreira epitelial (epiderme, mucosa intestinal ou bronquial); (2) Perda da integridade da barreira, permite a penetração do alergénio; (3) o alergénio encontra célula dendrítica epitelial (ex.: célula de Langerhans); (4) o alergénio encontra célula dendrítica subepitelial; (5) células dendríticas migram pelos vasos linfáticos para o linfonodo regional; (6) células dendríticas permanecem no paracórtex e apresentam péptido alergénico através de moléculas do MHC de classe II; (7) Linfócito T <i>naive</i> reconhece o complexo MHC-péptido através dos TCR; (8) Coestimulação direta pela célula dendrítica na diferenciação em linfócito Th2; (9) o linfócito Th2 ativo entra na região medular do linfonodo e estimula o linfócito B alergénio-específico; (10) o linfócito B ativo diferencia-se em plasmócito; (11) Plasmócitos secretam anticorpos alergénio-específicos, que entram em circulação; (12) IgE (ou IgG) alergénio-específicas ligam-se aos recetores dos basófilos circulantes ou aos mastócitos. O animal encontra-se sensibilizado, com a possibilidade de se desencadear uma reação de hipersensibilidade numa nova exposição ao alergénio (adaptado de Day, 2014).....	29

Figura 8 – Reações de hipersensibilidade imediata e retardada. (1) reexposição alérgica de um animal sensibilizado; (2) o alérgeno penetra a barreira epitelial e encontra IgE alérgeno-específica na superfície de mastócitos subepiteliais. Duas moléculas IgE mantêm uma ligação cruzada (<i>cross-link</i>) através dos epítomos de uma molécula alérgica; (3) Desgranulação dos mastócitos e libertação de mediadores bioativos; (4) Vasodilatação capilar, assim como outros efeitos da desgranulação dos mastócitos: (5), (6) e (7); (8) Quatro a 24 horas mais tarde, ocorre um influxo de eosinófilos, macrófagos e linfócitos geram uma resposta tardia (adaptado de Day, 2014).....	30
Figura 9 – Perda total de pêlo na crineira, com zonas de marcada alopecia, despigmentação e edema (adaptado de Littlewood, 2014).....	37
Figura 10 – Marcada alopecia e presença de lesões crostosas na rabada e garupa (adaptado de Lloyd et al., 2003).....	37
Figura 11 – <i>Sensibilização</i> dos mastócitos da pele e libertação de mediadores inflamatórios como resposta aos alérgenos salivares dos culicídeos. Durante a 1ª exposição, os cavalos são picados pelos insetos culicídeos e desenvolvem IgE para diferentes antigénios salivares (adaptado de Wagner, 2016).....	38
Figura 12 – Dermatite atópica com um padrão de distribuição lesional clássico na face, membros e tronco (adaptado de Rosenkrantz & White, 2014).....	46
Figura 13 – Edema ventral e urticária severa associados a dermatite atópica (adaptado de Rosenkrantz & White, 2014).....	46
Figura 14 – Realização de teste intradérmico com diferentes extratos alérgicos.....	48
Figura 15 – Descarga nasal serosa bilateral.....	52
Figura 16 – <i>Heave line</i> típica de cavalos severamente afetados com obstrução recorrente das vias aéreas (adaptado de Gerber, 2014).....	52
Figura 17 – <i>Rebreathing examination</i> , vulgarmente conhecido como “teste do saco”, é um dos métodos de diagnóstico essenciais deteção de sons pulmonares anormais.....	55
Figura 18 – Imagens de endoscopia respiratória, em que se pode observar: (a) carina adelgada e brônquios dilatados, típico de cavalos saudáveis e de cavalos com IAD; (b) carina espessada, brônquios estreitados e inflamação da mucosa respiratória, típico de cavalos com RAO (Allen & Franklin, 2009); (c) Acumulação excessiva de muco traqueal (adaptado de Gerber, 2014).....	56
Figura 19 – Imagem ecográfica do tórax (vista transversal). Verifica-se uma linha horizontal hiperecoica representativa da presença de ar no espaço pleural (setas vermelhas). As linhas perpendiculares, abaixo da superfície pulmonar designam-se por caudas de cometa (setas amarelas); (1) Parede torácica (adaptado de Couëttil & Hawkins, 2013).....	57

Figura 20 – Pannel de extratos alergénicos utilizados.....	65
Figura 21 – Resultado de um teste intradérmico, 15 minutos após as administrações.....	65
Figura 22 – Colheita de sangue para provas laboratoriais e futura realização de testes sorológicos.....	66
Figura 23 – Lesões cutâneas associadas a prurido encontradas em alguns dos cavalos do grupo alérgico.....	67

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Casuística acompanhada durante o estágio curricular.....	2
Tabela 2 – Algumas funções das citocinas TNF- α e IL-1 (adaptado de Tizard, 2013).....	17
Tabela 3 – Algumas moléculas vasoativas produzidas durante o processo inflamatório agudo (adaptado de Tizard, 2013).....	19
Tabela 4 – Sistema de classificação das reações de hipersensibilidade de acordo com Gell e Coombs (com base na informação disponibilizada em Felipe, 2016 e Day, 2014).....	26
Tabela 5 – Anti-histamínicos prescritos pelo autor, por ordem de preferência (adaptado de Yu, 2014).....	43
Tabela 6 – Síntese das principais características distintivas da obstrução recorrente das vias aéreas e da doença inflamatória das vias aéreas (adaptado de Tilley, 2011).....	59
Tabela 7 – Comparação do número de reações cutâneas positivas entre o grupo controlo e o grupo alérgico.....	68
Tabela 8 – Resultados obtidos a cada um dos extratos alergénicos utilizados nos testes intradérmicos. FA – Fungos Aerógenos; Aa – <i>Alternaria alternata</i> ; Af – <i>Aspergillus fumigatus</i> ; GS – Gramíneas selvagens; Qi – <i>Quercus ilex</i> ; Dg – <i>Dactylis glomerata</i> ; Pp – <i>Phleum pratense</i> ; C1- Cizânias I; CII – Cizânias II; Pj – <i>Parietaria judaica</i> ; Dp – <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> ; Df – <i>Dermatophagoides farinae</i> ; Ld – <i>Lepidoglyphus destructor</i> ; As - <i>Acarus siro</i> ; Tp – <i>Tyrophagus putrescentiae</i> ; Em – <i>Euroglyphus maynei</i>	68
Tabela 9 – Positividade apresentada em cada uma das categorias dos extratos alergénicos...69	69
Tabela 10 – Distribuição de frequências absolutas e relativas da positividade apresentada a <i>Alternaria alternata</i> consoante o sexo do cavalo.....	70
Tabela 11 – Teste Exato de Fisher para verificação de dependência entre a positividade apresentada a <i>Alternaria alternata</i> e o sexo do cavalo.....	70
Tabela 12 – Risco estimado para a ocorrência de positividade a <i>Alternaria alternata</i> , tendo em conta o sexo do cavalo.....	71
Tabela 13 - Teste de Kruskal-Wallis, agrupando os cavalos por sexo, para os vários extratos alergénicos utilizados nos TID.....	71
Tabela 14 - Distribuição de frequências absolutas e relativas da positividade apresentada a <i>Euroglyphus maynei</i> consoante o ambiente do cavalo.....	72

Tabela 15 - Teste Exato de Fisher para verificação de dependência entre a positividade apresentada a <i>Euroglyphus maynei</i> e o ambiente do cavalo.....	72
Tabela 16 – Teste de Kruskal-Wallis, agrupando os cavalos por ambiente, para os vários extratos alergénicos utilizados nos TID.....	72
Tabela 17 – Teste de Kruskal-Wallis, agrupando os cavalos por tipo de manifestação clínica, para os vários extratos alergénicos utilizados nos TID.....	73
Tabela 18 – Teste de Mann-Whitney, comparando a manifestação clínica respiratória com a dermatológica.....	74
Tabela 19 – Teste de Mann-Whitney, comparando a manifestação clínica respiratória com a mista.....	74
Tabela 20 – Teste de Mann-Whitney, comparando a manifestação clínica dermatológica com a mista.....	74

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Expressão de cada uma das áreas acompanhadas durante o estágio curricular.....	2
--	---

Lista de Abreviaturas e Siglas

Aa – *Alternaria alternata*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADT – Antidepressivos tricíclicos

Af – *Aspergillus fumigatus*

AINE – Anti-inflamatório não esteroide

APCs – *Antigen-presenting cells* (Células apresentadoras de antígeno)

ARN – Ácido ribonucleico

As – *Acarus siro*

ASIT – *Allergen-specific immunotherapy* (Imunoterapia alérgico-específica)

BAL – *Bronchoalveolar lavage* (Lavagem broncoalveolar)

BALF – *Bronchoalveolar lavage fluid* (Fluido de lavagem broncoalveolar)

BALT - *Bronchus-associated Lymphoid Tissues* (Tecidos Linfoides associados aos brônquios)

BCR – *B cell receptor* (Recetor das células B)

b.i.d – *bis in die* (Duas vezes por dia)

C – Complemento/componente do complemento

CD – *Cluster of differentiation* (Agrupamento de diferenciação)

CI – Cizânias I

CII – Cizânias II

COX – Cicloxigenase

DAMPs – *Damage-associated Molecular Patterns*

Df – *Dermatophagoides farinae*

Dg – *Dactylis glomerata*

Dp – *Dermatophagoides pteronyssinus*

DIVA – Doença Inflamatória das vias aéreas

EAACI – *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*

Em – *Euroglyphus maynei*

FA – Fungos Aerógenos

FcεRI – Recetor de alta afinidade para IgE

GALT – *Gut-associated Lymphoid Tissues* (Tecidos Linfoides associados ao intestino)

G-CSF – *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

GS – Gramíneas Selvagens

HRT – *Histamine release test*

IAD – *Inflammatory airway disease*

IFN-γ – Interferão-gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

Ld – *Lepidoglyphus destructor*

LT – Leucotrieno

MAC – *Membrane attack complex* (Complexo de ataque de membrana)

MALT – *Mucosa-associated Lymphoid Tissues* (Tecidos Linfoides associados à mucosa)

MHC – *Major complex of histocompatibility* (Complexo maior de histocompatibilidade)

NETs – *Neutrophil Extracellular Traps*

NK – *Natural Killer*

NLR – *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors*

NOD – *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*

OR – *Odds ratio*

ORBEA – Órgão Responsável pelo Bem-estar dos Animais da Universidade de Évora

ORVA – Obstrução recorrente das vias aéreas

PAF – *Platelet-activating factor*

PAMPs – *Pathogen-associated Molecular Patterns*

PG – Prostaglandina

Pj – *Parietaria judaica*

Pp – *Phleum pretense*

PRRs – *Pattern Recognition Receptors*

Qi – *Quercus ilex*

RAO – *Recurrent airway obstruction*

RIG – *Retinoic acid Inducible Gene*

RLR – *Retinoic acid Inducible Gene-like Receptors*

RR – Risco relativo

s.i.d – *semel in die* (Uma vez por dia)

SPAOP – *Summer pasture-associated obstructive pulmonar disease*

Tc – T citotóxico

TCP – Testes cutâneos por picada

TCR – *T cell receptor* (Recetor das células T)

TGF- β 1 – *Transforming growth factor- β 1* (Fator de crescimento transformador- β 1)

Th – *T helper*

t.i.d – *ter in die* (Três vezes por dia)

TID – Testes intradérmicos

TLR – *Toll-like Receptor*

TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

Tp – *Tyrophagus putrescentiae*

Treg – T regulador

Prefácio

A presente dissertação vem na sequência de um estágio curricular no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora. Este estágio teve uma duração de quatro meses, mais concretamente entre o dia um de dezembro de 2018 e o dia um de abril de 2019, na Equimuralha, em Évora.

Apesar do estágio ter sido realizado em regime de ambulatório, a Equimuralha tinha as suas instalações divididas em dois locais: o escritório, situado no Hospital Muralha de Évora, e o centro de reprodução, composto por várias *boxes* e *paddocks*, onde não só eram mantidas as éguas para controlo reprodutivo, como também eram internados alguns cavalos, cujas condições assim o exigiam.

Durante o estágio, o estagiário teve a possibilidade de realizar uma série de procedimentos como anestésias perineurais, entubações nasogástricas, palpações transretais, administração de fármacos pelas diferentes vias, lavagens uterinas, colheitas de sémen, limpeza de feridas e a substituição de pensos. Foi também possível acompanhar alguns procedimentos cirúrgicos, tais como orquiectomias e a sutura de feridas.

Com o decorrer do estágio, verificou-se que existiam alguns casos suspeitos de doença alérgica, que já vinham a ser seguidos pelos clínicos durante algum tempo. Dada esta situação, em consonância com a equipa de trabalho da Equimuralha, decidiu-se realizar um estudo alergológico de uma população de cavalos suspeitos, mediante a realização de um questionário individual aos proprietários, exame clínico e testes intradérmicos.

Após análise dos resultados, houve oportunidade de realizar a seguinte comunicação preliminar em congresso internacional da especialidade:

Leocádio JG, Galhós A, Damásio L, Leal CR, Fino T, Martins LM. *Horse sensitization and allergy to mold, pollen, dust, and storage mites, and culicoides in a horse population from southern Portugal*. LBTP1876. *Thematic Poster Session 59 – Allergen extracts and molecules for veterinary allergology*. EAACI 2019, 1-5 June 2019, Lisbon, Portugal.

I. Casuística

Durante o estágio e paralelamente ao estudo que foi realizado, o estagiário teve a oportunidade de seguir vários casos clínicos de diferentes áreas, destacando-se sobretudo os casos relativos ao sistema locomotor e medicina desportiva, e também de odontologia.

Embora o período de estágio não tenha abrangido uma época mais favorável para a reprodução equina, foi possível acompanhar alguns procedimentos como colheitas de sêmen, inseminações e controlos reprodutivos das éguas.

A Tabela 1 apresenta de forma sumária os motivos de consulta e o respetivo número de casos acompanhados, enquanto o Gráfico 1 apresenta a expressão que cada uma das áreas teve durante o estágio.

Tabela 1 - Casuística acompanhada durante o estágio curricular.

MOTIVO DE CONSULTA	Nº DE CASOS
Profilaxia	39
Medicina Desportiva/Ortopedia/Locomotor	109
Gastroenterologia	13
Odontologia	32
Oftalmologia	2
Reprodução	26
Pneumologia	9
Dermatologia	18
Neonatologia	4
Geriatria	2
Reabilitação	15
Exame de Pré-compra	4
Neurologia	2
Total	275

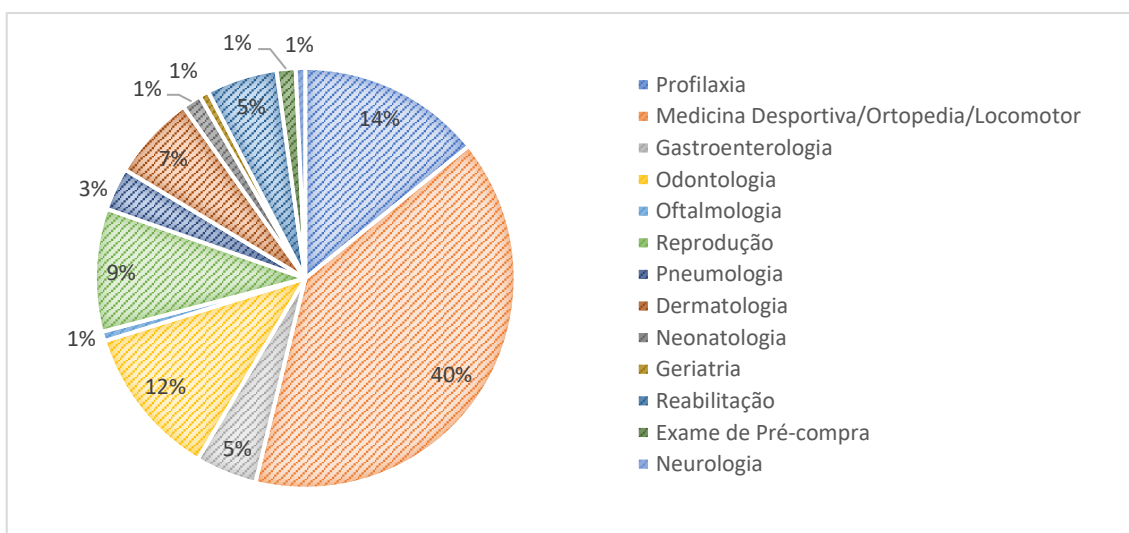


Gráfico 1 – Expressão de cada uma das áreas acompanhadas durante o estágio curricular.

II. Revisão Bibliográfica

1. Sistema Imunitário

Entende-se por sistema imunitário um conjunto de células e proteínas que, interagindo com os tecidos e órgãos, na presença de agentes invasores, desencadeia um conjunto de respostas que resultam na ativação das defesas intrínsecas ao organismo vivo, tendentes à eliminação dos agentes invasores e, subseqüentemente, ao aumento da resistência à infecção, através de um processo de memória imunitária (Tizard, 2013).

O sistema imunitário divide-se em dois subsistemas funcionais: imunidade inata e imunidade adaptativa (ou adquirida). A imunidade inata atua de forma imediata e inespecífica; esta resposta envolve mecanismos celulares e moleculares capazes de eliminar um grande número de agentes potencialmente patogênicos. Quanto à imunidade adaptativa, a sua ação é menos imediata, mas mais específica e dirigida ao agente em causa, resultando na produção de anticorpos e memória imunitária, com atuação dos linfócitos T (Callahan & Yates, 2014).

Os mecanismos imunológicos têm como objetivo reconhecer e atacar as moléculas estranhas ao organismo. Contudo, em caso de desregulação poderão ser desencadeados processos de imunodeficiência (resposta imunitária insuficiente) ou danificação imunomediada das moléculas próprias do organismo (ex.: doenças autoimunes e reações de hipersensibilidade) (Felippe, 2016).

1.1. Órgãos do Sistema Imunitário

Os órgãos do sistema imunitário encontram-se divididos em dois grupos: linfoides primários e linfoides secundários.

Os órgãos linfoides primários têm como função assegurar o desenvolvimento dos linfócitos. Os linfócitos T sofrem o seu processo de maturação no timo, enquanto para os linfócitos B o processo de maturação ocorre em órgãos diferentes, consoante a espécie.

Por sua vez, os órgãos linfoides secundários favorecem o encontro entre os linfócitos antígeno-específicos e os antígenos alvo. Contrariamente aos órgãos linfoides primários, surgem tardiamente durante o desenvolvimento fetal, persistem durante a vida adulta e aumentam de volume como resposta à estimulação antigénica. Neste grupo, estão incluídos o baço, linfonodos e outros tecidos linfoides presentes no trato intestinal, respiratório e urogenital.

Os órgãos linfoides secundários contêm células dendríticas que capturam e processam os antígenos, e linfócitos que medeiam as respostas imunitárias. A sua estrutura anatómica está projetada para facilitar a captura dos antígenos, providenciando um ambiente favorável para o início de uma resposta imunitária; por apresentarem uma ligação com ambos os sistemas,

circulatório e linfático, são também capazes de concentrar os antígenos circulantes (Tizard, 2013).

1.1.1. Medula Óssea

A medula óssea tem como principal função a produção de todas as células sanguíneas, quer sejam células imunitárias, eritrócitos ou plaquetas, através de um processo que dá pelo nome de hematopoiese.

Através da hematopoiese todas as células sanguíneas se originam de células estaminais hematopoiéticas comuns, que vão sofrendo sucessivos processos de diferenciação celular. Assim sendo, a medula apresenta três linhagens celulares precursoras distintas: eritroide, mieloide e linfoide.

A linhagem eritroide origina eritrócitos e plaquetas, e as duas últimas linhagens originam todas as células que irão participar na resposta imunitária. A maioria das células integrantes do sistema imunitário inato surge da linhagem mieloide, incluindo os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mastócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas.

Por outro lado, a linhagem linfoide origina os linfócitos B e T, que participam no sistema imunitário adaptativo, e as células *Natural Killer* (NK) que atuam na vertente inata (Yates, 2014).

De assinalar que algumas das células imunitárias, como por exemplo os linfócitos T e os mastócitos, só se tornam células efetoras após um processo de diferenciação noutros tecidos, como será abordado mais adiante.

1.1.2. Timo

Apesar de todos os linfócitos se originarem na medula óssea, os linfócitos T sofrem o seu processo de maturação no timo. Este processo é essencial para o desenvolvimento de um sistema imunológico funcional, capaz de reconhecer os agentes estranhos ao organismo.

Nos mamíferos, o timo localiza-se cranialmente ao coração e atinge uma maior extensão após o nascimento, diminuindo significativamente de tamanho e função ao longo da vida adulta do animal.

A região tímica, mais periférica, contém uma grande quantidade de células precursoras dos linfócitos T, designadas timócitos; quanto à região medular apresenta maioritariamente células epiteliais (Callahan, 2014).

1.1.3. Linfonodos

Os linfonodos apresentam tamanho variável e um formato arredondado ou semelhante a um feijão, estão localizados ao longo dos vasos linfáticos, o que lhes permite capturar os antígenos presentes na linfa. Possuem uma porção designada de hilo, por onde saem os vasos

linfáticos eferentes e entram os vasos sanguíneos que suprem o linfonodo. No lado oposto ao hilo, dá-se a entrada dos vasos linfáticos aferentes.

Os linfonodos consistem numa cápsula sob a qual há uma rede reticular, preenchida por linfócitos, macrófagos e células dendríticas, através da qual penetram os seios linfáticos. Logo abaixo do tecido conjuntivo capsular localiza-se o seio subcapsular.

No seu interior observam-se três zonas distintas: córtex, medula e paracórtex, que corresponde à área que delimita as duas regiões. Os linfócitos B predominam no córtex, onde se encontram agregados, formando estruturas a que se dá o nome de folículos. Alguns destes folículos, nos linfonodos que tenham sido previamente estimulados por antígenos, formam estruturas especializadas chamadas de centros germinais. Os centros germinais são locais onde os linfócitos B se desenvolvem e maturam. No paracórtex predominam os linfócitos T e as células dendríticas, encontrando-se dispostos em cordões entre os seios linfáticos. Na medula existem seios de drenagem linfática, separados por cordões medulares compostos por plasmócitos, macrófagos e linfócitos T de memória.

A função principal dos linfonodos passa por facilitar a interação entre as células apresentadoras de antígeno e os linfócitos T e B específicos para determinado antígeno. De modo a facilitar esta interação, uma complexa mistura de quimiocinas secretadas pelas células estromais e células dendríticas foliculares, atuam sobre os linfócitos conduzindo-os para as suas respetivas regiões.

As células dendríticas imaturas, após o encontro com um antígeno, são igualmente conduzidas para interior dos linfonodos através das quimiocinas secretadas. Como exemplo deste mecanismo, as células dendríticas podem ser atraídas para o paracórtex, onde apresentam o antígeno aos linfócitos T. Após a apresentação do antígeno tornam-se capazes de alterar o fenótipo do recetor de quimiocinas e sair do linfonodo (Tizard, 2013).

1.1.4. Baço

O baço pode ser considerado como um linfonodo especializado na filtração de antígenos presentes na corrente sanguínea, pois desempenha uma função similar à dos linfonodos relativamente à linfa. No entanto, apesar de ter vasos linfáticos eferentes, não é suprido de líquido linfático.

O processo de filtração esplénico envolve a remoção de partículas antigénicas presentes no sangue, tais como microrganismos, fragmentos celulares e eritrócitos envelhecidos. Este processo juntamente com o facto de se caracterizar por ser um tecido linfoide altamente organizado, torna o baço um órgão importante do sistema imunitário.

Além da sua função imunitária, o baço também armazena eritrócitos e plaquetas, recicla ferro e produz eritrócitos durante o desenvolvimento fetal. Como tal, o baço é constituído por dois tipos de tecido distintos: polpa vermelha, constituída por células apresentadoras de antígeno,

linfócitos e plasmócitos, sendo usada sobretudo para filtração sanguínea e armazenamento de eritrócitos; e polpa branca, rica em linfócitos B e T, mediadores das respostas imunitárias.

A polpa branca encontra-se separada da polpa vermelha através de uma região chamada de zona marginal. Esta região é constituída por macrófagos e células dendríticas, apresentando também uma vasta população de linfócitos B (Tizard, 2013).

1.1.5. Tecidos Linfoides associados à Mucosa

A mucosa epitelial de todos os animais encontra-se constantemente exposta a potenciais agentes infecciosos, especialmente bactérias. Como tal, as superfícies mucosas como os intestinos e os pulmões, contêm agregados linfoides especializados a que se dá o nome de *Mucosa-associated Lymphoid Tissues* ou Tecidos Linfoides associados à Mucosa, MALT.

Os constituintes do MALT encontram-se subdivididos em vários grupos, tais como o Tecido Linfoide associado ao intestino ou *Gut-associated Lymphoid Tissues* (GALT) ou Tecido Linfoide associado aos brônquios ou *Bronchus-associated Lymphoid Tissues* (BALT).

O GALT inclui as placas de Peyer presentes no intestino delgado, que são constituídas por um tecido linfoide altamente organizado (Callahan, 2014) e os complexos linfoglandulares, que se encontram na parede do intestino grosso e ceco de algumas espécies (Tizard, 2013).

As placas de Peyer têm como função monitorizar e atuar sobre os patógenos existentes no intestino, sem que seja afetada a flora intestinal normal. A existência de células especializadas no intestino, designadas células M, possibilita essa função, através da condução dos antigénios do lúmen intestinal para as áreas ricas em linfócitos pertencentes às placas de Peyer. Contudo, os mecanismos imunitários associados à mucosa permanecem relativamente pouco compreendidos (Callahan, 2014).

Relativamente à função dos complexos linfoglandulares, ela ainda é desconhecida. No entanto, contêm plasmócitos e células M, sugerindo serem locais de produção de anticorpos e de concentração de antigénios (Tizard, 2013).

No que diz respeito ao BALT, não é tão estruturado quanto o GALT, porém o processo no qual atuam sobre os agentes patogénicos inalados é relativamente similar.

Apesar das suas diferenças estruturais, os linfonodos, o baço e o MALT lidam com os antigénios de forma semelhante usando o mesmo tipo de células imunitárias (Callahan, 2014).

1.2. Barreiras Anatômicas e Fisiológicas

De modo a que a eliminação de um agente agressor seja bem-sucedida é necessário que o animal apresente diversas estratégias de defesa. O processo de defesa do organismo ocorre de forma sequencial (Figura 1) (Tizard, 2013), sendo a pele e as membranas mucosas que revestem as superfícies exteriores do animal, incluindo o trato gastrointestinal, respiratório e reprodutivo, as primeiras e mais evidentes barreiras contra agentes externos (Yates, 2014).

Adicionalmente, na pele, a presença de glândulas sebáceas especializadas associadas a folículos pilosos produzem sebo, que pela sua acidez, inibe o crescimento de alguns microrganismos (Callahan & Yates, 2014).

Caso a pele esteja danificada,

qualquer agente externo pode invadir o organismo, contudo, a cicatrização garante que a lesão que possa aí existir é rapidamente reparada (Tizard, 2013).

Para além das barreiras físicas, existem barreiras químicas capazes de eliminar potenciais agentes invasores, como por exemplo, as múltiplas secreções constituídas por proteínas antimicrobianas, como é o caso da lisozima que pode ser encontrada no leite, na saliva, nas lágrimas e no muco intestinal e apresenta afinidade para degradar o esqueleto peptidoglicano da parede celular das bactérias Gram negativas (Yates, 2014).

De igual forma, o trato gastrointestinal produz múltiplas secreções que não só são fundamentais na digestão, como também são essenciais na eliminação de uma série de microrganismos não desejados (ex.: as enzimas degradativas e o ácido clorídrico essencial para acidificação do meio) (Callahan & Yates, 2014).

Tanto o trato respiratório como o gastrointestinal apresentam mecanismos próprios de limpeza, como a tosse, os espirros e o fluxo normal de muco, assim como o reflexo de vômito e a diarreia, respetivamente.

A presença de microbioma na pele e no trato gastrointestinal também é um fator fundamental para a eliminação de potenciais agentes invasores, já que estando melhor adaptado a viver nas superfícies corporais conseguem sobrepor-se a estes (Tizard, 2013).

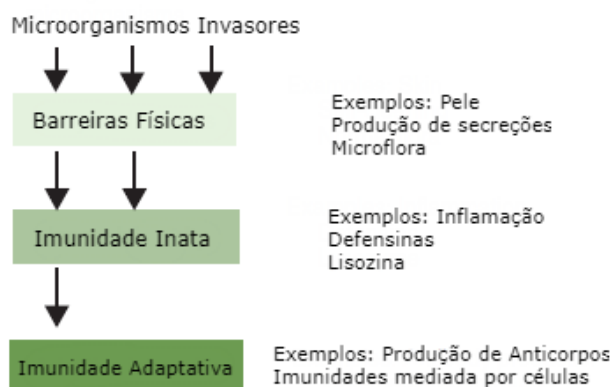


Figura 1 – As três maiores barreiras que protegem o animal contra a invasão microbiana. Cada barreira apresenta uma maior efetividade imunitária que a anterior (adaptado de Tizard, 2013).

1.3. Imunidade Inata

As barreiras externas, quer sejam físicas, químicas ou biológicas, apesar de essenciais como primeira linha de defesa contra potenciais agentes invasores, não são totalmente eficazes na exclusão dos mesmos. Ao longo do tempo e persistência, um determinado microrganismo invasor acabará por superar esta primeira linha de defesa, sendo necessário, uma segunda linha de defesa responsável pela eliminação do agente invasor.

Caracteristicamente, o sistema imunitário inato responde de forma idêntica e previsível a qualquer que seja o agente patogénico, não evolui com exposições repetidas ao mesmo agente, pois não desenvolve memória imunitária, mas atua de forma imediata contra qualquer agente patogénico (Tizard, 2013).

1.3.1. Células do Sistema Imunitário Inato

As células imunitárias originam-se dos precursores linfoides e mieloides presentes na medula óssea e seguem uma linhagem genética e epigeneticamente controlada a partir das células estaminais hematopoiéticas (Figura 2). A medula óssea apresenta zonas de linhagem de células que recebem e respondem a sinais sistémicos, como por exemplo hormonas e citocinas, com a produção de novas células hematopoiéticas.

As células mieloides maturam e dividem-se em neutrófilos, monócitos (que se diferenciam em macrófagos e células dendríticas), eosinófilos, basófilos e mastócitos. Estas células completam a maturação na medula óssea, mas a posterior diferenciação, após reconhecimento do antigénio, ocorre em zonas periféricas.

Os neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas são células fagocitárias, isto é, são capazes de reconhecer os patógenos, fagocitá-los e eliminá-los, mantendo-se ativados durante todo este processo e secretando citocinas e quimiocinas, que sinalizam outras células e expandem a resposta inflamatória (Felippe, 2016).

Por outro lado, existem as células linfoides que, por sua vez, desempenham um papel importante no sistema imunitário adaptativo e na defesa do organismo, estando divididas em três grandes grupos: i) células *Natural Killer* (NK) que atuam na imunidade inata; ii) linfócitos T, que regulam a imunidade adaptativa e são responsáveis pela resposta imunitária mediada por células; e iii) linfócitos B, responsáveis pela produção e libertação de imunoglobulinas (Tizard, 2013).

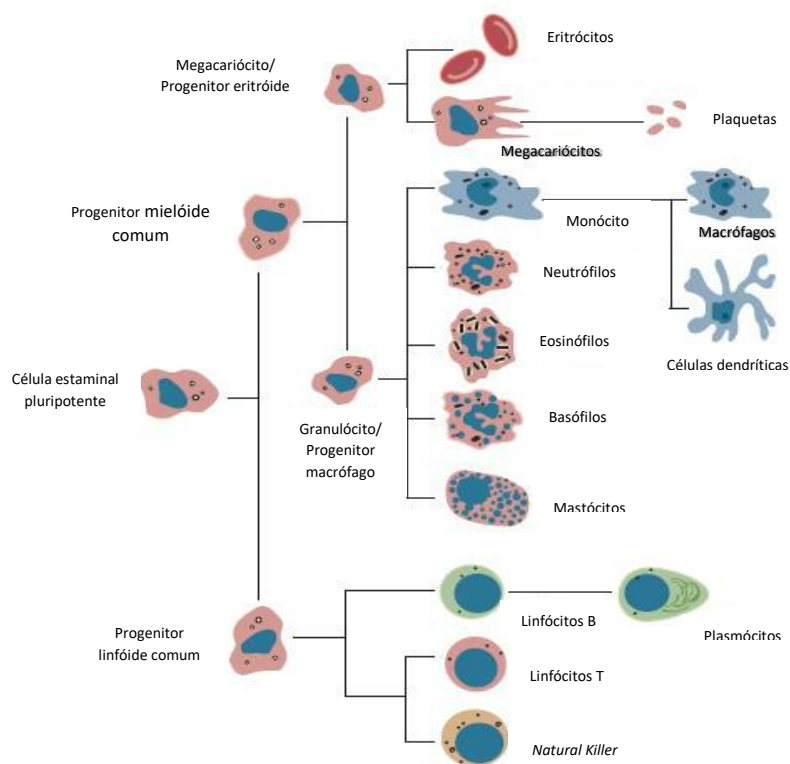


Figura 2 – A origem das células da medula óssea. De assinalar que as células linfóides se originam de um conjunto de células precursoras diferente das células mielóides (adaptado de Tizard, 2013).

1.3.1.1. Neutrófilos

Os neutrófilos são células com curto tempo de vida, que chegam rapidamente ao local de inflamação e que fagocitam e eliminam os agentes patogênicos, juntamente com os macrófagos (Felippe, 2016).

Estas células representam a maioria dos leucócitos que circulam na corrente sanguínea e, em condições normais, a maioria mantém-se no sangue em estado de repouso (inativos) durante todo o seu tempo de vida (alguns dias). No entanto, os neutrófilos circulantes têm a capacidade de se aglomerar em grande número nos tecidos inflamados, onde libertam toxinas antimicrobianas. Nestes casos, os neutrófilos morrem mais rapidamente, normalmente vítimas das próprias moléculas que libertam para o meio extracelular.

Durante o seu estado de repouso no sangue, os neutrófilos apresentam forma esférica, mas quando ativados assumem, com o extravasamento (saída da circulação sanguínea), uma forma ameboide, permitindo que as células, estimuladas por substâncias quimiotáticas, migrem para os espaços intersticiais, num processo designado por diapedese.

O grau de segmentação nuclear é um indicador de maturação dos neutrófilos, uma vez que neutrófilos imaturos apresentam núcleos não segmentados e os maduros apresentam núcleos altamente segmentados.

Os neutrófilos têm como principal função, a eliminação dos agentes patogênicos através de vários mecanismos efetores: através da fagocitose, os neutrófilos fagocitam os patógenos e destroem-nos em vesículas designadas por fagolisossomas; podem eliminar os patógenos extracelulares por desgranulação e secreção de proteínas antimicrobianas e liberação de metabólitos tóxicos; por último, libertam substâncias chamadas de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), constituídas por ADN (ácido desoxirribonucleico) e proteínas que auxiliam na eliminação dos patógenos.

Adicionalmente à eliminação de agentes patogênicos, os neutrófilos participam na coordenação da inflamação, através da liberação de mediadores inflamatórios (Yates, 2014).

A produção de neutrófilos pela medula óssea é regulada por uma citocina chamada *Granulocyte Colony-stimulating Factor* (G-CSF) que é libertada consoante a taxa de apoptose. Os neutrófilos mortos são fagocitados pelos macrófagos, que produzem interleucina-23 (IL-23) e à medida que o número de neutrófilos mortos aumenta, a produção de IL-23 aumenta de igual forma. Por sua vez, a IL-23 estimula a produção de interleucina-17 (IL-17) pelos linfócitos, responsável pela indução da produção de G-CSF e atividade das células estaminais ao nível da medula óssea (Tizard, 2013).

1.3.1.2. Monócitos

Os monócitos são precursores de outras células pertencentes do sistema imunitário (Figura 3) e circulam na corrente sanguínea durante alguns dias antes de se diferenciarem nos tecidos. Apesar de terem alguma função fagocitária e de produzirem citocinas, a sua ação não é muito eficiente. Contudo, na presença de um processo inflamatório são capazes de sair rapidamente da corrente sanguínea e ocupar os tecidos inflamados com um grande número de macrófagos (Yates, 2014).

1.3.1.3. Macrófagos

Os macrófagos resultam de um processo de diferenciação e maturação dos monócitos, que ocorre quando estes últimos migram da corrente sanguínea, onde circulam, para os tecidos e órgãos envolventes. Já nos tecidos são libertados fatores tecidulares específicos responsáveis por este processo de diferenciação dos monócitos, resultando assim em vários tipos de macrófagos consoante a sua localização, função e morfologia (Yates, 2014).

Os macrófagos podem então ser encontrados no tecido conjuntivo (histiócitos), nos sinusoides hepáticos (células de Kupffer), no cérebro (microglia), nos alvéolos e nos capilares pulmonares; um grande número pode ainda ser encontrado nos sinusóides do baço, medula óssea e linfonodos. Contudo, independentemente da sua localização, todos os macrófagos fazem parte do sistema fagocitário mononuclear, comumente apelidado de sistema reticuloendotelial.

As suas funções são variadas, tendo um papel fundamental não só na deteção e eliminação dos agentes patogênicos através da fagocitose, mas também quando estimulados,

na libertação de uma série de citocinas que promovem tanto a resposta imunitária inata como a resposta imunitária adaptativa. Além destas funções, controlam a resposta inflamatória, contribuem diretamente na reparação tecidual e no processo de cicatrização, são também células sentinela e *Antigen-presenting Cells* ou células apresentadoras de antígeno (APCs) (Tizard, 2013).

Apesar dos macrófagos pertencerem ao grupo das APCs, não conseguem ativar linfócitos T que nunca estiveram em contacto com um antígeno (linfócitos T *naive*), uma vez que não são capazes de estabelecer interações prolongadas com os mesmos. Adicionalmente, o processamento de antígenos pelos macrófagos é ineficiente, pois uma grande parte dos antígenos fagocitados é destruída por proteases lisossomais durante a fagocitose (Felippe, 2016).

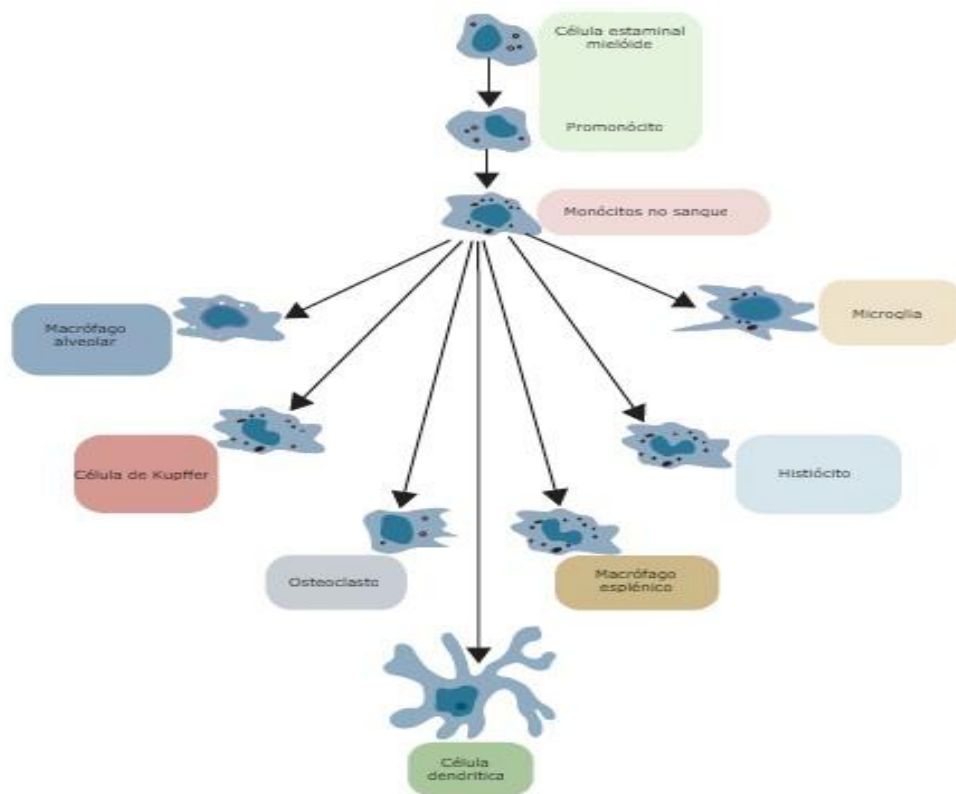


Figura 3 – Os monócitos no sangue podem-se diferenciar em vários tipos de macrófagos e ainda em células dendríticas (adaptado de Tizard, 2013).

1.3.1.4. Células Dendríticas

Tal como os macrófagos, as células dendríticas resultam de um processo de diferenciação dos monócitos quando saem da corrente sanguínea e estão presentes em praticamente todos os tecidos e órgãos do corpo.

Nos tecidos, as células dendríticas atuam como células sentinela, apresentando um grande número de recetores que detetam lesões tecidulares e infeções que como resposta, sintetizam citocinas que ativam outras células imunitárias. Assim como os macrófagos, também

são capazes de endocitar e fagocitar patógenos, contudo não são tão eficazes na sua eliminação nos fagolisossomas.

As células dendríticas têm igualmente como principal função, o processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T, desempenhando um papel fundamental na regulação da imunidade adaptativa, na medida em que determinam se um antígeno desencadeia uma resposta imunitária mediada por anticorpos ou mediada por células (Yates, 2014).

Estas células são muito mais eficientes no desempenho da função de APC, comparativamente com os macrófagos e os linfócitos B, pois conseguem transportar uma maior variedade de antígenos e apresentá-los aos linfócitos T; são igualmente as únicas células apresentadoras de antígeno capazes de ativar linfócitos T *naive*, o que as torna essenciais no desencadeamento de uma resposta imunitária primária, como irá ser referido mais adiante.

As células dendríticas são uma mistura de um conjunto de subpopulações diferentes, estando divididas em células dendríticas mielóides e células dendríticas plasmocitóides. Estas duas subpopulações diferem na morfologia, nos antígenos que apresentam à superfície e nas suas funções.

Existem igualmente outras subpopulações de células dendríticas especializadas na pele (células Langerhans) e nos órgãos linfóides secundários (células dendríticas foliculares) (Tizard, 2013).

1.3.1.5. Mastócitos

Os mastócitos, assim como as células dendríticas e os macrófagos são também células sentinela, que na presença de um agente patogénico libertam rapidamente potentes mediadores inflamatórios e têm um papel importante nas reações alérgicas, como será discutido mais adiante.

As células precursoras dos mastócitos surgem da medula óssea e migram para os tecidos de todo o corpo, especialmente para o tecido conjuntivo circundante dos vasos sanguíneos e dos nervos, assim como para a lâmina própria das superfícies mucosas, onde se diferenciam em mastócitos maduros.

Como os mastócitos atuam como células sentinela, expressam uma variedade de recetores capazes de detetar sinais de alerta inatos; apresentam também, recetores que reconhecem imunoglobulinas (Ig) E, o que é importante na resposta imunitária adaptativa contra parasitas e alérgenos.

O citoplasma de um mastócito maduro contém uma densidade acentuada de grânulos repletos de mediadores pró-inflamatórios (aminas vasoativas). Quando detetam a presença de um agente invasor, seja pela libertação de substâncias por outros leucócitos, seja pela ativação do sistema complemento, ocorre desgranulação dos mastócitos com libertação dos mediadores inflamatórios para o meio extracelular.

Os componentes destes grânulos juntamente com os mediadores lipídicos e as citocinas sintetizadas pelos mastócitos, atuam nas células locais e na vasculatura periférica, levando à dilatação e aumento da permeabilidade vascular. Desta forma, os mastócitos desempenham uma função não só de alerta do sistema imunológico, como também auxiliam no recrutamento de células efectoras no combate à eliminação dos agentes patogénicos, na coordenação de inflamações crónicas e na reparação tecidual (Yates, 2014).

1.3.1.6. Basófilos

Os basófilos atuam sobretudo durante infeções parasitárias multicelulares e reações alérgicas tardias, mas contrariamente aos mastócitos, estas células encontram-se em circulação, enquanto os mastócitos são células presentes maioritariamente nos tecidos.

Tal como os mastócitos, são importantes na coordenação da inflamação quando migram para os tecidos inflamados, promovem a resposta imunitária adaptativa, para eliminação de parasitas, apresentam grânulos contendo por mediadores pró-inflamatórios no seu citoplasma e apresentam recetores para as IgE.

Contudo, estas funções dos basófilos podem amplificar efeitos indesejados, associados às alergias (hipersensibilidade tipo I) (Yates, 2014).

1.3.1.7. Eosinófilos

Os eosinófilos são especialmente efetivos na eliminação de parasitas multicelulares, apresentam algumas características antivirais e são ativos em certas reações alérgicas, particularmente nos gatos e nos equinos. A sua função na imunidade tumoral é ainda pouco clara.

Contrariamente aos neutrófilos, os eosinófilos saem do sangue após um breve período em circulação, passando maioritariamente o seu tempo de vida em tecidos saudáveis, principalmente no tecido conjuntivo adjacente às superfícies mucosas.

Uma vez nos tecidos e ativados por parasitas ou por substâncias secretadas por outros leucócitos, os eosinófilos presentes nos tecidos e os recrutados da circulação são estimulados a libertar proteínas antiparasitárias e metabolitos tóxicos para o meio extracelular, de modo a eliminar os agentes parasitários multicelulares.

Como já referido, os eosinófilos podem também cooperar com os mastócitos e os basófilos, em reações alérgicas severas (Yates, 2014).

1.3.1.8. Células Natural Killer (NK)

Contrariamente às células anteriores, as células NK surgem da linhagem linfóide da medula óssea, passando por uma segunda fase de maturação nos tecidos linfóides secundários (linfonodos e baço), designando-se assim por células linfóides.

As células NK adquiriram este nome, por terem a capacidade de reconhecer e eliminar células hospedeiras anormais de forma inata, sem sensibilização prévia.

Estas células são maiores que a maioria dos linfócitos presentes na circulação e apresentam grânulos no seu citoplasma. Estes grânulos contêm proteínas, chamadas granzimas e perforinas, que são responsáveis pela capacidade citotóxica das células NK (Yates, 2014). No entanto, contrariamente aos linfócitos T e B, as células NK não apresentam recetores para antigénios, mas sim recetores que lhes conferem a capacidade de reconhecer células *self* de *non-self*, a partir de moléculas que são normalmente expressas em células saudáveis (Tizard, 2013).

As células NK constituem a primeira linha de defesa contra infeções virais e algumas células tumorais. Atendendo a que, os vírus se replicam no interior das células hospedeiras e uma grande parte das células tumorais diferir muito pouco das células normais, a maioria dos mecanismos imunitários inatos são ineficazes. No entanto, tanto as células tumorais como as células virais expressam moléculas anormais à sua superfície ou perdem marcadores que normalmente identificam as células saudáveis; é a partir destas moléculas e proteínas presentes na superfície celular que as células NK identificam as células virais e/ou tumorais.

Quando uma célula hospedeira aparenta ser anormal, as células NK aderem à célula alvo e secretam moléculas citotóxicas a partir dos seus grânulos citoplasmáticos, que forçam a apoptose (morte celular programada).

Os anticorpos produzidos durante uma resposta imunitária adaptativa podem também ativar as células NK, num processo designado por citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (Yates, 2014).

1.3.2. Reconhecimento de Microrganismos

O sistema imunitário inato é ativado quando o organismo percebe que está a ser atacado por agentes externos e, para isso, são necessários sinais de alarme de reconhecimento. Estes sinais são gerados por duas vias diferentes (Tizard, 2013):

- Através de moléculas produzidas pelos microrganismos invasores (sinais exógenos), coletivamente designados por *Pathogen-associated Molecular Patterns* ou padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs);
- através de moléculas libertadas por lesão ou morte celular (sinais endógenos), coletivamente designados por *Damage-associated Molecular Patterns* ou padrões moleculares associados a lesão (DAMPs).

De modo a reconhecer estes padrões moleculares, tanto os PAMPs como os DAMPs, existem recetores de reconhecimento padrão ou *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) responsáveis por ativar a resposta imunitária inata (Tizard, 2013).

Os recetores acima descritos encontram-se em maiores concentrações na superfície das células sentinela integrantes do sistema imunitário inato, incluindo macrófagos, células dendríticas e mastócitos (Callahan & Yates, 2014).

A principal função dos PRRs, após se ligarem aos PAMPs, passa por iniciar os mecanismos de sinalização intracelular, o que conduz à ativação da célula hospedeira. A ativação das células sentinela resulta na libertação de citocinas pró-inflamatórias, que alertam as outras células imunitárias da presença de produtos microbianos, que, por seu turno, acionam mecanismos de defesa imunitária.

As três maiores famílias dentro da categoria funcional PRRs são os *Toll-like Receptors* (TLRs), os *Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like Receptors* (NLRs) e os *Retinoic acid Inducible Gene (RIG)-like Receptors* (RLRs) (Yates, 2014).

Os TLRs estão presentes em vários tipos de células, sobretudo nas células sentinela, incluindo mastócitos, células dendríticas, macrófagos e células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório (Tizard, 2013); podem também estar presentes nos leucócitos (Yates, 2014). Alguns TLRs localizam-se na superfície celular, onde são responsáveis por detetar agentes patogénicos extracelulares, como são exemplo as bactérias e os fungos; outros TLRs localizam-se no meio intracelular, que por sua vez são responsáveis por detetar agentes patogénicos intracelulares, como por exemplo os vírus.

Os NLRs e os RLRs, contrariamente aos TLRs, apenas detetam agentes patogénicos no meio citoplasmático. Por um lado, os NLRs identificam bactérias, por outro os RLRs conseguem distinguir ácidos ribonucleicos (ARN) virais de não virais (Tizard, 2013).

Posteriormente ao reconhecimento e ativação das células sentinela, através da ligação dos DAMPs e PAMPs aos recetores PRR presentes na superfície celular das mesmas, serão desencadeados mecanismos como a síntese e libertação de mediadores pró-inflamatórios, a ativação da atividade fagocitária com destruição dos agentes patogénicos e a apresentação dos antígenos ao sistema imunitário adaptativo (Yates, 2014).

1.3.3. Mecanismos Efetores da Imunidade Inata

O sistema imunitário inato é constituído por um diverso número de subsistemas, sendo que o processo inflamatório configura o subsistema mais importante. A inflamação define-se como um mecanismo que estimula a concentração das células imunitárias e das moléculas

antimicrobianas nos locais de invasão microbiana, de modo a eliminar os agentes potencialmente patogênicos e reparar qualquer lesão tecidual subsequente (Figura 4).

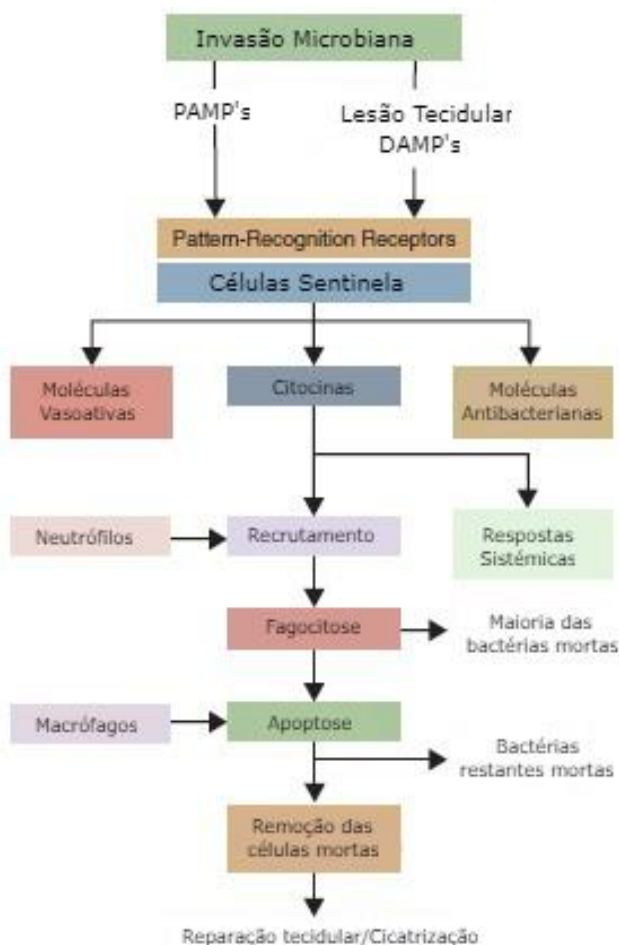


Figura 4 – Visão geral das características essenciais da inflamação aguda, com a atuação de mecanismos inatos mediados por células e outros mecanismos de defesa (adaptado de Tizard, 2013).

sintomas surge como consequência de alterações vasculares locais. Tanto o calor como o rubor advêm do aumento do fluxo sanguíneo para a zona afetada, associado a vasodilatação local, e o edema é explicado pelo aumento da permeabilidade vascular local. Relativamente à sensação de dor, deve-se à libertação de mediadores inflamatórios pelos tecidos afetados e células imunitárias ativas, como são exemplo as prostaglandinas, neuropéptidos e citocinas. Em conjunto, estes sintomas acabam por levar à perda de função da região afetada, associada a um comportamento instintivo de proteção por parte do animal (Yates, 2014).

Após o processo de reconhecimento do microrganismo, as células sentinela (macrófagos, células dendríticas e mastócitos) sintetizam e secretam uma série de moléculas mediadoras do processo inflamatório, designadas citocinas, que têm também como função inibir o crescimento microbiano e induzir os primeiros mecanismos da imunidade adaptativa.

As principais citocinas mediadoras secretadas pelas células sentinela ativas são: o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que é produzido precocemente na inflamação, a IL-1 e a IL-6. As

O processo inflamatório agudo desenvolve-se pouco tempo após ocorrer lesão tecidual. Além dos sinais de alarme de reconhecimento, previamente mencionados, a sensação de dor provocada por lesão tecidual força os nervos aferentes locais a libertar péptidos bioativos. Esta mistura complexa de moléculas atrai os leucócitos à região e simultaneamente têm uma ação efetiva sobre os vasos sanguíneos, de modo a facilitar a migração dos leucócitos, num processo que dá pelo nome de diapedese.

De igual forma, muitas moléculas antimicrobianas, como as imunoglobulinas e os constituintes do sistema complemento, que são normalmente encontrados na corrente sanguínea, só migram para os locais alvo no âmbito do processo inflamatório (Tizard, 2013).

A inflamação aguda apresenta cinco sintomas clássicos: calor, rubor, edema, dor e perda de função. A maioria destes

principais funções do TNF- α e da IL-1 encontram-se esquematizadas na Tabela 2, sendo, contudo, de assinalar que o TNF- α é um mediador essencial da inflamação, já que, em combinação com a IL-1, provoca alterações nas células endoteliais localizadas nos vasos sanguíneos de menores dimensões e, quando concentrado localmente, é responsável pelos sintomas clássicos da inflamação (Tizard, 2013).

As células sentinela sintetizam outro tipo de citocinas com propriedades quimiotáticas, as quimiocinas, que geram um gradiente de concentração, de modo a atrair outras células imunitárias, como os neutrófilos, aos locais de inflamação ou de invasão microbiana. A mistura de quimiocinas secretadas para o meio extracelular nos tecidos infetados ou lesionados, acaba por regular a composição da população celular no local alvo, o que permite que o organismo ajuste a resposta inflamatória, de modo a combater mais eficientemente o eventual agente invasor.

Entre as células sentinela, os mastócitos são células que conseguem rapidamente amplificar os sinais pró-inflamatórios, como resposta às citocinas secretadas pelos macrófagos, como a IL-1. A partir da desgranulação dos mastócitos, os grânulos ricos em histamina e serotonina, ambos com propriedades vasoativas, passam para o meio extracelular, resultando na alteração da vasculatura local, que é essencial na inflamação.

Tabela 2 – Algumas funções das citocinas TNF- α e IL-1 (adaptado de Tizard, 2013).

TNF - α	IL-1
<ul style="list-style-type: none"> • Ativa outras células (linfócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais) • Elimina células tumorais • Estimula a reabsorção óssea e a síntese de colagénio • Estimula a migração leucocitária • Promove a formação de granuloma • Induz a produção de IL-1, IL-6 e IL-8 	<ul style="list-style-type: none"> • Elimina células tumorais • Promove: <ul style="list-style-type: none"> • Síntese de colagénio • Atividade dos condrócitos e fibroblastos • Reabsorção óssea • Desgranulação dos eosinófilos, basófilos e mastócitos • Provoca febre e perda de apetite

A desgranulação dos mastócitos pode também ser induzida pela ligação de IgE aos recetores da superfície celular dos mastócitos após deteção de antígenos específicos, processo este que é comum das reações alérgicas, como irá ser abordado mais adiante.

Outro grupo importante de mediadores da inflamação aguda são os eicosanóides, em particular, os leucotrienos e as prostaglandinas. Contrariamente às citocinas, que são proteínas, os eicosanóides são derivados oxidados dos ácidos gordos. Estes compostos apresentam um curto tempo de semivida e atuam de forma parácrina e autócrina nos tecidos inflamados. Após deteção dos estímulos inflamatórios (citocinas ou trauma), tanto os mastócitos como os macrófagos sintetizam leucotrienos e prostaglandinas a partir de constituintes da membrana nuclear e celular, como são exemplo o diacilglicerol e os fosfolípidos, respetivamente.

Através da ação das fosfolipases, estes constituintes são convertidos em ácido araquidónico, que é o principal precursor dos leucotrienos e das prostaglandinas. Por sua vez, o ácido araquidónico pode sofrer conversão pela enzima lipoxigenase, dando origem aos leucotrienos, ou pela enzima cicloxigenase (COX) que origina as prostaglandinas (Yates, 2014).

Entre os leucotrienos existem quatro elementos com uma função principal na inflamação, através da ativação e recrutamento leucocitário, sendo o leucotrieno B₄ (LTB₄) o mais importante, já que é um potente ativador e agente quimiotático dos neutrófilos e eosinófilos, produzido pelos neutrófilos, mastócitos e macrófagos.

Quanto às prostaglandinas, existem quatro grupos com ação pró-inflamatória, designadamente a prostaglandina (PG) E₂, a PGF₂, os tromboxanos e as prostaciclina (PGI₂). De um modo geral, as prostaglandinas podem ser produzidas pela maioria das células nucleadas, as prostaciclina sintetizadas pelas células do endotélio vascular e os tromboxanos produzidos pelas plaquetas. A função de cada um destes grupos é bastante variado e, tendo em conta que num processo inflamatório são libertados em conjunto por diferentes células, o seu efeito torna-se bastante complexo. Contudo, podem ser observados na Tabela 3 os diferentes mediadores inflamatórios, bem como a sua origem.

Quando ativados, os neutrófilos podem também sintetizar um mediador inflamatório designado *platelet-activating factor* (PAF) ou fator de ativação plaquetária, que é igualmente sintetizado pelos mastócitos, plaquetas e eosinófilos. Este mediador facilita a adesão e migração dos neutrófilos, atuando sobre as células endoteliais e estimulando a agregação plaquetária e consequente secreção de moléculas vasoativas e de tromboxanos (Tizard, 2013).

Relativamente aos mecanismos para eliminação dos microrganismos, estes são diversos e estão dependentes do tipo de infeção, sobretudo da localização e tamanho do agente patogénico, assim como das células do sistema imunitário inato, que irão responder à infeção. De um modo geral, os mecanismos de eliminação microbiana podem ser categorizados da seguinte forma (Yates, 2014):

- Fagocitose pelas células fagocitárias e destruição do patógeno no fagolisossoma;
- libertação de substâncias antimicrobianas para eliminação de patógenos extracelulares;
- eliminação direcionada de células hospedeiras infetadas, pelas células NK.

A fagocitose, como já referido, é realizada por células fagocitárias, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Este processo, juntamente com a presença de recetores específicos na superfície celular, permite que os fagócitos sejam capazes de degradar seletivamente os agentes patogénicos (Yates, 2014).

De modo a iniciar a fagocitose os recetores específicos presentes na superfície celular dos fagócitos ligam-se diretamente ao determinante antigénico (epítipo) do patógeno, contudo em alguns casos estes recetores não são capazes de fazer esta ligação, pelo que é requerido um processo de opsonização do patógeno com a atuação de imunoglobulinas ou das proteínas constituintes do sistema complemento (Felippe, 2016).

Tabela 3 – Algumas moléculas vasoativas produzidas durante o processo inflamatório agudo (adaptado de Tizard, 2013).

Mediador Inflamatório	Principal origem	Função
Histamina	Mastócitos, Basófilos e Plaquetas	Aumento da permeabilidade vascular Sensação de dor
Serotonina	Mastócitos, Basófilos e Plaquetas	Aumento da permeabilidade vascular
Prostaglandinas	Ácido Araquidónico	Vasodilatação Aumento da permeabilidade vascular
Tromboxanos	Ácido Araquidónico	Aumento da agregação plaquetária
Leucotrieno B₄	Ácido Araquidónico	Quimiotaxia neutrofílica Aumento da permeabilidade vascular
Leucotrienos C, D e E	Ácido Araquidónico	Contração da musculatura lisa Aumento da permeabilidade vascular
Fator de ativação plaquetária	Células fagocitárias	Secreção plaquetária e neutrofílica Aumento da permeabilidade vascular
C3a e C5a	Presentes no soro	Desgranulação dos mastócitos Contração da musculatura lisa Quimiotaxia neutrofílica (C5a)

Uma vez que os patógenos tenham sido fagocitados, as células fagocitárias conseguem destruir e digerir os produtos fagocitados, a nível intracelular, no fagolisossoma. Esta estrutura permite que as células sejam capazes de destruir os agentes patogénicos, usando altas concentrações de compostos tóxicos e enzimas, minimizando danos colaterais para com células hospedeiras vizinhas.

A fagocitose é constituída por três fases distintas (Yates, 2014):

- a) Adesão e reconhecimento do patógeno a partir dos recetores presentes na membrana citoplasmática da célula fagocitária;

- b) reorganização membranar e do citoesqueleto, de modo a endocitar o patógeno e formar o fagossoma;
- c) maturação do fagossoma com fusão lisossomal, originando o fagolisossoma.

Em alguns casos, pela existência de um grande número de patógenos ou pelas suas dimensões, as células fagocitárias não são capazes de atuar de forma efetiva, pelo que os neutrófilos ou os eosinófilos podem também libertar substâncias químicas antimicrobianas e antiparasitárias para o meio extracelular (Callahan & Yates, 2014).

Outro grupo de células que participam na imunidade inata são as células NK tendo como função, a defesa contra agentes patogénicos intracelulares, tal como são exemplo os vírus. As células NK conseguem diferenciar se uma célula é normal ou não, indicando se está infetada por um vírus ou se é uma célula neoplásica. Quando são identificadas células suspeitas é induzida a apoptose, de modo a limitar a disseminação do vírus ou da neoplasia (Callahan & Yates, 2014).

Em conjunto, estes mecanismos são fundamentais para eliminar quaisquer agentes invasores, quer sejam intracelulares ou extracelulares, sem que, por isso, seja necessário a ação do sistema imunitário adaptativo. Contudo, por vezes, os mecanismos do sistema imunitário inato atuam, concomitantemente, com o sistema imunitário adaptativo que desempenha um papel importante nestes casos, como intensificador da eficiência da imunidade inata (Yates, 2014).

1.3.4. Sistema Complemento

O sistema complemento define-se por um sistema de defesa inato, que tem como principais funções a proteção contra infeções, a regulação do processo inflamatório, a remoção de células lesionadas e/ou alteradas, a sinalização dos agentes invasores através da opsonização, e a regulação da resposta imunitária adaptativa (Tizard, 2013); este mecanismo é constituído por cerca de 16 proteínas plasmáticas e glicoproteínas, que, tal como uma grande parte das outras proteínas existentes no plasma, são na sua maioria sintetizadas no fígado; no entanto, monócitos, macrófagos e certas células epiteliais podem igualmente contribuir para a sua produção (Yates, 2014).

As proteínas constituintes do sistema complemento circulam no sangue na forma inativa, sendo ativadas através de PAMPs existentes na superfície dos agentes patogénicos (Tizard, 2013) ou a partir de anticorpos (particularmente IgM e IgG) ligados a antígenos (complexos imunes). A partir do momento em que uma das proteínas é ativada, gera-se um efeito de cascata, em que as proteínas vão sendo ativadas sequencialmente (Yates, 2014).

A ativação do sistema complemento pode ocorrer através de três vias diferentes, conhecidas por via alternativa, clássica e da lectina:

- Via clássica é iniciada quando o complexo C1 se liga aos complexos imunes formados no decurso de uma resposta imunitária humoral;

- via da lectina é ativada durante uma resposta imunitária inata, em que ocorre a ligação de lectinas (ex.: *mannose-binding protein* e a ficolina) com substâncias específicas na superfície celular do patógeno (Felippe, 2016) e
- via alternativa, cuja ativação, tal como na via anterior, decorre de uma resposta imunitária inata, não requerendo, porém, um reconhecimento específico da superfície microbiana, quer por imunoglobulinas, quer por lectinas (Yates, 2014); a sua ativação dá-se a partir da interação entre constituintes da parede celular microbiana (ex.: Lipopolissacarídeos das bactérias Gram negativas e ácidos teicoicos das bactérias Gram positivas) e as proteínas do complemento presentes na corrente sanguínea (Tizard, 2013).

Apesar das suas diferenças as três vias consistem numa cascata proteolítica que permite a amplificação do sinal; resultam na criação das enzimas C3 e C5 convertase, que clivam as proteínas do complemento C3 e C5, respetivamente, e terminam numa via comum, conhecida por via do complexo de ataque de membrana (MAC), que provoca a lise osmótica do agente invasor (Yates, 2014).

Mais importante do que a lise causada pelo MAC é o efeito pró-inflamatório muito potente dos pequenos péptidos C3a e C3b, formados durante a cascata. Estes péptidos induzem a desgranulação dos mastócitos, estimulam as plaquetas a libertar moléculas vasoativas, como histamina e serotonina, desencadeiam a inflamação, são quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos, aumentam a permeabilidade vascular e provocam a libertação de enzimas lisossomais dos neutrófilos e tromboxanos pelos macrófagos.

Outro mecanismo importante do complemento é a opsonização. Os péptidos C3b e C4b são opsoninas, isto é, ligam-se de forma covalente à superfície dos microrganismos, marcando-os como estranhos (Tizard, 2013).

1.4. Imunidade Adaptativa

Além da imunidade inata, como resposta mais imediata à presença de um agente patogénico, é necessário um sistema de defesa que reconheça e elimine o patógeno em causa e que seja capaz de aprender com o processo, para que, numa nova entrada desse agente no organismo, seja eliminado de forma mais efetiva. A imunidade adaptativa desenvolve-se lentamente, mas apresenta uma maior variedade de mecanismos de defesa (Tizard, 2013).

A resposta imunitária adaptativa é também designada de adquirida, pois os animais não herdaram diretamente estes mecanismos, adquirem-nos aquando da exposição a agentes patogénicos ao longo da sua vida (Callahan & Yates, 2014); é, portanto, a última barreira de defesa imunitária, como tal o seu comprometimento perante uma ameaça desencadeia, invariavelmente, um processo infeccioso ou até mesmo a morte (Tizard, 2013).

A imunidade adaptativa pode ser acionada a partir de antígenos exógenos, ou seja, antígenos de bactérias que invadem o organismo a partir do exterior e que se desenvolvem nos tecidos e nos fluidos extracelulares, e por antígenos endógenos, como são exemplo as proteínas

sintetizadas por células infectadas por vírus. O processamento de antígenos para posterior apresentação a outras células efectoras difere consoante o seu tipo. Assim, os antígenos exógenos são processados por células especializadas para a apresentação de antígenos e os antígenos endógenos são processados exatamente pelas mesmas células que os produzem (Tizard, 2013).

Como já referido anteriormente, a imunidade adaptativa apresenta diferentes mecanismos de defesa, sendo composta por duas subdivisões distintas (Tizard, 2013):

- Imunidade humoral, que está diretamente relacionada com os agentes invasores extracelulares, em que são libertados anticorpos (proteínas solúveis) capazes de levar à sua eliminação e
- imunidade mediada por células, que está relacionada com os agentes invasores intracelulares, em que células especializadas são recrutadas para eliminar células infectadas ou anormais, já que os anticorpos não atuam no meio intracelular.

A resposta imunitária adaptativa tem como base a ação dos linfócitos B e T, já que são as únicas células capazes de reconhecer e responder especificamente aos antígenos que desencadeiam a resposta imunitária (Callahan & Yates, 2014). A especificidade característica da ação linfocítica deve-se à existência de recetores específicos para antígenos, presentes na superfície celular dos linfócitos B e T, a que abreviadamente se dá o nome de TCR (*T cell receptors*) e BCR (*B cell receptors*).

Estas células linfoides distribuem-se sistemicamente, nos órgãos linfoides, no sangue e dispersas pelas superfícies mucosas. Apesar da sua aparência uniforme, existe uma variedade de subpopulações, que são distinguíveis, não pela estrutura que apresentam, mas pelas moléculas presentes na superfície celular, assim como pelo seu comportamento. Cada molécula que apresentam à superfície tem uma designação química e funcional própria, a que se dá o nome de *cluster of differentiation* (CD).

Assim sendo, o que diferencia os TCRs dos BCRs são as proteínas que apresentam na sua estrutura e o facto dos BCRs solúveis serem encontrados livremente no sangue, designando-se genericamente por anticorpos. Em todos os TCRs podem ser encontradas proteínas transdutoras de sinalização, globalmente se designadas por complexo CD3. Outras proteínas que podem ser encontradas nos recetores dos linfócitos T são a CD4 (presente nos TCRs dos linfócitos T *helper*) e a CD8 (presente nos TCRs dos linfócitos T citotóxicos) (Tizard, 2013).

Os linfócitos T representam uma população de células linfoides que está subdividida em: linfócitos T *helper* (Th) que regulam a resposta imunitária, estimulando a ação de células efectoras; linfócitos T citotóxicos (Tc) com um papel essencial na eliminação de células que expressam antígenos endógenos, e, por fim, linfócitos T reguladores (Treg) que, como o próprio nome indica, desempenham uma função reguladora da resposta imunitária, de forma passiva, mantendo o equilíbrio entre a imunidade e a tolerância imunitária, evitando possíveis processos

autoimunes e respostas alérgicas adversas (Tizard, 2013); a sua ação passa sobretudo por suprimir linfócitos T autorreativos que se encontram em circulação (Callahan, 2014).

Os linfócitos T *helper* ainda se podem diferenciar noutras subpopulações, como são o caso, os linfócitos Th1, capazes de ativar macrófagos, células NK e linfócitos B e assistindo por vezes, os linfócitos T citotóxicos; Th2 que conduzem a multiplicação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos; Th17 que promovem a inflamação; e Th3 que podem auxiliar na supressão da autoimunidade (Callahan, 2014).

Os linfócitos B são encontrados sobretudo no córtex dos linfonodos, na região marginal do baço, na medula óssea, em todo o intestino, nas placas de Peyer e alguns circulam na corrente sanguínea. Quando um antigénio é capaz de se ligar aos recetores existentes à superfície da célula, os linfócitos B, juntamente com uma apropriada co-estimulação por parte dos linfócitos T *helper*, são ativados, diferenciam-se em plasmócitos e secretam imunoglobulinas (BCRs solúveis) que apresentam a mesma especificidade que os recetores celulares e que desempenham um papel fundamental nalguns mecanismos da resposta imunitária, como pode ser observado na Figura 5 (Tizard, 2013).

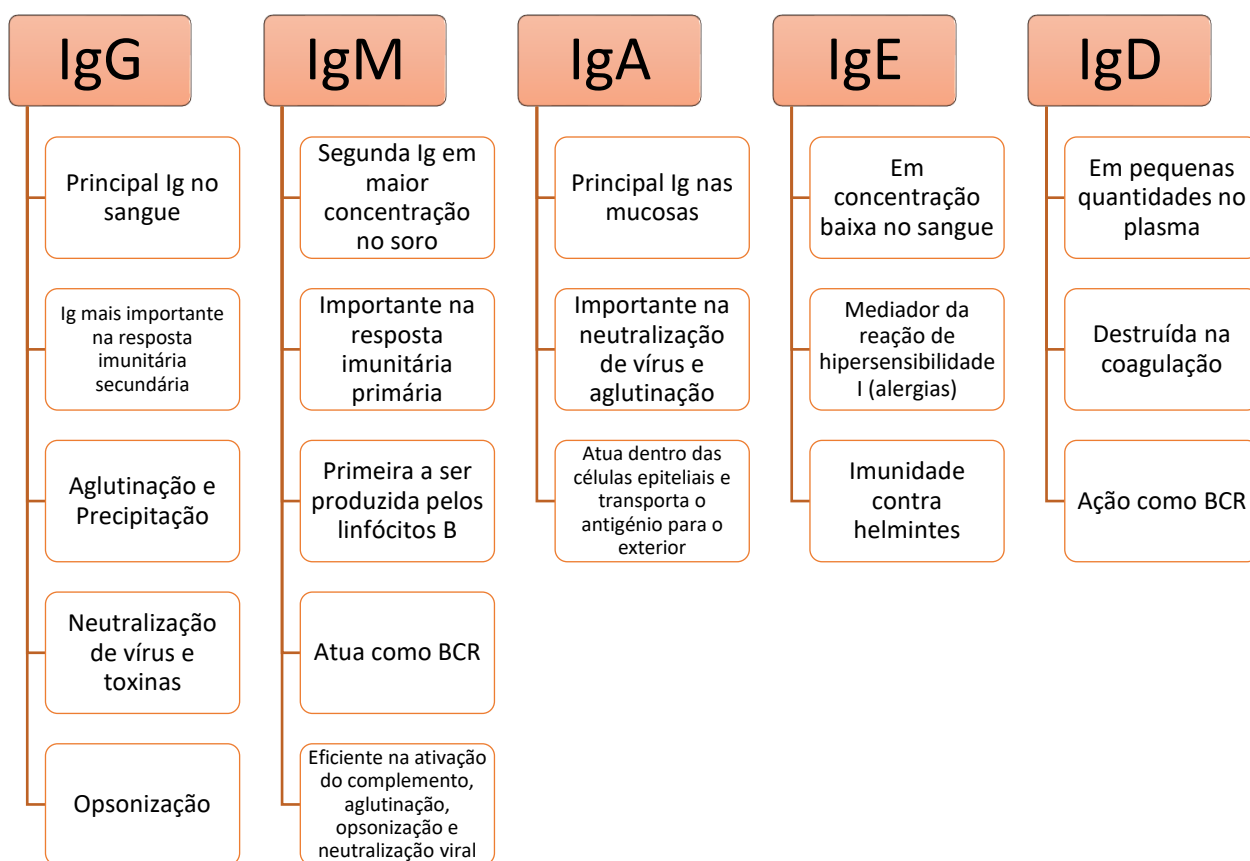


Figura 5 – Funções e características de cada classe de imunoglobulinas (com base na informação disponibilizada em Tizard, 2013 e Callahan, 2014).

Contrariamente aos linfócitos B, a ativação dos linfócitos T é realizada pela apresentação de antígenos por parte das células apresentadoras de antígeno (APCs), que fagocitam e processam os patógenos, apresentando o antígeno à superfície (Callahan & Yates, 2014). De assinalar que os linfócitos B podem igualmente funcionar como células apresentadoras de antígeno, apesar não possuírem capacidade fagocitária (Felippe, 2016).

O surgimento dos linfócitos B e T mediadores da imunidade adaptativa, num animal não sensibilizado, é explicado pela Teoria da Seleção Clonal, na qual, após o contato primário do organismo com o antígeno (desencadeando a resposta imunitária primária), os linfócitos T e B são ativados e estimulados a dividirem-se e a diferenciarem-se (Callahan & Yates, 2014).

Após a multiplicação ativa dos linfócitos previamente ativados pelo contato direto ou indireto com os antígenos, cada clone diferencia-se em células efetoras (plasmócitos ou linfócitos T ativos) e em células de memória, que, embora sensibilizadas, não entram em atividade num primeiro contato com o antígeno em causa. Os plasmócitos resultantes do processo de diferenciação dos linfócitos B ativos terão como função libertar anticorpos específicos para o antígeno em causa (Callahan & Yates, 2014).

Exatamente por se tratar de uma resposta imunitária primária, toda esta atuação do sistema imunológico demora algum tempo, no entanto num segundo contacto com o agente patogénico em causa (resposta imunitária secundária), a resposta torna-se bastante mais rápida e eficaz, já que a imunidade adaptativa (ou adquirida) tem como característica o desenvolvimento de memória imunitária (Tizard, 2013). Assim sendo, pode ser encontrada na Figura 6, uma diferenciação da resposta primária e secundária no que respeita à sua efetividade imunitária, relativamente à ação dos linfócitos B na libertação de imunoglobulinas.

A ativação da imunidade adaptativa depende assim, da ação das células apresentadoras de antígenos, APCs, que capturam, processam e apresentam os antígenos às células que são capazes de os reconhecer.

Estas células são atraídas por produtos provenientes dos agentes patogénicos e de lesão tecidual, sendo ativadas exatamente pelos mesmos estímulos que iniciam o processo inflamatório. Como já referido anteriormente, as células dendríticas e os macrófagos são células sentinela e células apresentadoras de antígeno, como tal o processamento dos antígenos para posterior apresentação pode ser iniciado ao mesmo tempo que os agentes patogénicos vão sendo eliminados pelos mecanismos inatos (Tizard, 2013).

O processamento de antígenos pelas APCs envolve a divisão de moléculas proteicas de grandes dimensões em moléculas mais pequenas, que posteriormente são ligadas a glicoproteínas codificadas geneticamente, especializadas para apresentação de antígenos, designadas por moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC). Após a ligação entre os péptidos e as moléculas MHC, este complexo é levado até à superfície da célula apresentadora.

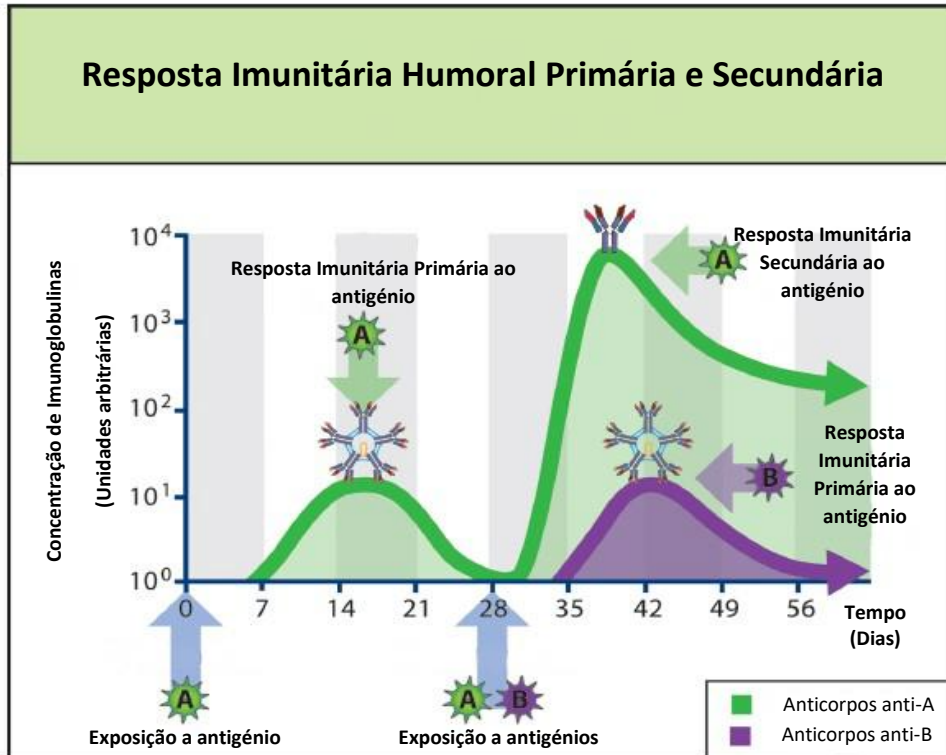


Figura 6 – Resposta Imunitária Humoral Primária e Secundária. Após a exposição ao antígeno A no dia 0, ocorre uma resposta humoral primária para o antígeno A. Esta resposta dura cerca de 30-40 dias e é dominada por um tipo de imunoglobulina designada IgM. Quando ocorre uma nova exposição ao antígeno A e uma exposição a um novo antígeno (B), o animal produz uma resposta mais efetiva contra o antígeno A, mas uma resposta primária contra o antígeno B (adaptado de Callahan, 2014).

As moléculas MHC encontram-se divididas em três classes distintas (Yates, 2014):

- Moléculas MHC classe I com localização na maioria das células nucleadas, expressas em células tumorais e virais, ligam-se a antígenos endógenos e têm como recetores as moléculas CD8 dos linfócitos T citotóxicos;
- moléculas MHC classe II, que estão restritas às células especializadas para apresentação e processamento de antígenos, tendo como recetores as moléculas CD4 dos linfócitos T *helper* e ligando-se a antígenos exógenos, e
- moléculas MHC classe III, que representam uma grande variedade de proteínas entre as quais algumas pertencentes ao sistema complemento.

A imunidade adaptativa é então ativada quando estes complexos MHC-péptidos são reconhecidos pelos recetores específicos presentes nos linfócitos T, que são os responsáveis

por se ligarem e responderem aos péptidos que foram corretamente processados e apresentados. Este processo garante que a resposta imunitária adaptativa atue de forma específica e dirigida ao agente em causa (Tizard, 2013).

Apesar de ser feita uma distinção e separação entre os dois tipos de mecanismos imunológicos, inatos e adaptativos, a realidade é que não ocorre nenhuma resposta imunitária adaptativa na ausência de uma resposta imunitária inata (Callahan & Yates, 2014).

1.5. Bases Imunológicas de Doenças Alérgicas

A homeostase está amplamente dependente da ação protetora e equilibrada do sistema imunitário, ação esta que envolve uma série de mecanismos inflamatórios e reguladores. Ocasionalmente, o sistema imunológico reage contra moléculas próprias ou, de forma inadequada, a sinais de ameaça ao organismo, quer seja por não desencadear uma resposta eficiente (imunodepressão ou imunossupressão), quer seja por atuar errada e exacerbadamente (autoimunidade) (Felippe, 2016).

A estas desregulações imunitárias designamos de doenças imunomediadas (alérgicas, autoimunes, imunodeficientes ou neoplásicas) ou hipersensibilidades, que são por definição complexas e multifatoriais. Embora algumas doenças imunomediadas não pertençam a nenhuma das categorias, as reações de hipersensibilidade foram divididas em quatro tipos distintos, segundo a classificação de Gell e Coombs, como pode ser observado na Tabela 4 (Day, 2014).

Tabela 4 – Sistema de classificação das reações de hipersensibilidade de acordo com Gell e Coombs (com base na informação disponibilizada em Felippe, 2016 e Day, 2014).

Tipo	Nome	Caracterização	Exemplos
Tipo I	Hipersensibilidade imediata	Mediada por IgE ligada aos mastócitos nos tecidos ou basófilos presentes na circulação; reação em minutos/horas; requiere sensibilização prévia	Anafilaxia; Hipersensibilidade provocada por insetos; Alergia alimentar
Tipo II	Citotóxica, dependente de anticorpos	Envolve destruição das células-alvo pelo efeito direto dos anticorpos (IgG ou IgM) e moléculas do sistema complemento; reação em poucos dias	Anemia hemolítica imunomediada; Glomerulonefrite; Pemphigus; Vasculite
Tipo III	Dependente de complexos imunes	Complexos imunes formados localmente nos tecidos ou na circulação sanguínea, que conduzem a inflamação local ou sistémica; reação em poucos dias	Purpura hemorrágica; Vasculite
Tipo IV	Hipersensibilidade retardada independente de anticorpos	Mediada por linfócitos T CD4 que ativam macrófagos, levando a lesão tecidual ou granuloma; reação mais morosa	Dermatite por contacto

Os tipos I, II e III são reações de hipersensibilidade imediata, que envolvem a atuação de anticorpos; após uma exposição inicial ao antígeno, estes anticorpos atingem níveis elevados no soro e nos tecidos, capazes de desenvolver uma resposta imunitária rapidamente. Relativamente às reações de hipersensibilidade de tipo IV são mediadas por linfócitos T, em que mesmo após uma exposição inicial ao antígeno, demora algum tempo até ser atingido um nível suficiente de linfócitos T, capaz de gerar uma resposta imunitária (hipersensibilidade retardada) (Callahan, 2014).

No que respeita às doenças alérgicas, tal como qualquer outra reação de hipersensibilidade, após a exposição repetida de um animal a um determinado alérgico leva a que, numa nova exposição ao agente em causa, seja desencadeada uma reação imunológica inadequada e excessiva. As doenças alérgicas são mediadas sobretudo por mecanismos de hipersensibilidade de tipo I, mas também podem ser mediadas por mecanismos de tipo III, no caso da alergia alimentar e de tipo IV, no caso da dermatite alérgica por contacto. Os alérgicos envolvidos são frequentemente ambientais e ubiqüitários, apenas sensibilizando indivíduos geneticamente predispostos. Contudo, a resposta clínica (alergia clínica) só ocorrerá nos animais que apresentem a combinação de fatores genéticos predisponentes para sensibilização e desencadeamento reacional (desregulação imunológica) e que, adicionalmente, contactem com as moléculas implicadas (influência ambiental) (Day, 2014).

Relativamente à componente genética, é evidente a existência de uma maior prevalência de certas doenças alérgicas em determinadas raças de cães e equinos, havendo uma menor evidência de predisposição genética nos gatos; são exemplos deste fenómeno a predisposição das raças *Golden Retriever* (Shaw *et al.*, 2004; citado por Day, 2014) e *West Highland white terrier* (De Boer & Hill, 1999; citado por Day, 2014) à dermatite atópica, e nos equinos, a raça *Icelandic pony*, que apresenta predisposição para hipersensibilidade provocada pela picada dos insetos (*Culicoides spp.*) (Marti *et al.*, 2008; citado por Day, 2014).

Contudo, a heritabilidade não constitui, por si só, uma garantia de que o animal desenvolva doença alérgica, já que o contacto com potenciais alérgicos é também essencial, pois permite a sensibilização e conseqüente hipersensibilidade do animal. A exposição aos alérgicos pode estar relacionada com o espaço geográfico (ex.: distribuição global de certas plantas e respetivos pólenes; influência climática na distribuição de ectoparasitas) ou com o equilíbrio entre o tempo que o animal ocupa no exterior e no interior das instalações (Day, 2014).

Os pôneis *Icelandic* são um exemplo ilustrativo da simultaneidade existente entre a componente genética e a exposição às fontes alérgicas. Esta raça é originária da Islândia, onde não ocorrem os *Culicoides spp.* causadores de hipersensibilidade à picada dos insetos, desenvolvendo-a apenas quando são exportados para outros países, onde os insetos em causa são endémicos. No entanto, foi verificado que apenas 50% dos pôneis exportados são suscetíveis, sugerindo predisposição genética (Marti *et al.*, 2008; citado por Day, 2014).

Para o desenvolvimento de sensibilização é necessário que a superfície cutânea, respiratória ou intestinal esteja em contacto com quantidades suficientes das moléculas alergénicas. Geralmente, é assumido que algum tipo de defeito na barreira epitelial permite um melhor acesso dos alergénios às camadas mais profundas da pele (Marsella *et al.*, 2011; citado por Day, 2014).

Nesta medida, foram sugeridos alguns mecanismos que explicam a possível disfunção das barreiras epiteliais. Por exemplo, em alguns humanos com quadro atópico foi verificado que apresentavam mutações no gene profilagrina, que codifica um precursor da proteína filagrina, importante na manutenção da integridade da estrutura da epiderme superior (Novak & Leung, 2011; citado por Day, 2014).

De igual forma, a existência de defeitos nas moléculas de adesão epitelial, causadores de disfunção da barreira mucosa, foi proposta como explicação à origem de doença alérgica associada a sintomatologia respiratória ou intestinal. Porém, não é claro se estes defeitos constituem uma causa ou se surgem conseqüentemente a uma resposta inflamatória. Como exemplo, foi aferido que o alergénio *Dermatophagoides pteronyssinus* cisteína-protease quebra enzimaticamente as junções epiteliais existentes na via respiratória (Gregory & Lloyd, 2011; citado por Day, 2014).

Assim que o alergénio ultrapassa a barreira epitelial entra em contacto com as células de Langerhans ou com as células dendríticas subepiteliais (Figura 7). Desta forma, é realizado o reconhecimento do antigénio a partir da interação entre os recetores das células apresentadoras de antigénio (PRRs) e os PAMPs.

As células dendríticas transportam o antigénio por via linfática até ao tecido linfoide secundário mais próximo (ex.: linfonodos subcutâneo, bronquial ou mesentérico), onde permanecem no paracórtex (área com maior concentração de linfócitos T).

Durante a migração as células dendríticas processam o antigénio capturado através de um processo intracelular de degradação enzimática lisossomal, em que o alergénio é fragmentado em pequenas porções peptídicas. Os péptidos resultantes do processamento ligam-se a uma região específica de uma molécula do MHC de classe II, que será expressa na superfície celular durante a apresentação do antigénio a diferentes linfócitos T.

Um animal que não apresente qualquer tipo de desregulação imunitária não desenvolve uma resposta alérgica, nas concentrações comuns (tolerância imunológica). Esta tolerância é obtida através da ativação de um conjunto de células dendríticas tolerantes ou imaturas, responsáveis por estimular e manter as populações de linfócitos Treg. Na possibilidade de alguns linfócitos T alergénio-específicos serem inadequadamente ativados, são amplamente controlados pelos linfócitos Treg circulantes designados para a prevenção alérgica ou autoimune (Day, 2014).

Porém, foi verificado por diferentes autores que alguns animais alérgicos apresentavam uma diminuição na quantidade de linfócitos T reguladores, o que sugere ser uma explicação para o desenvolvimento de resposta alérgica (Heinmann *et al.*, 2011).

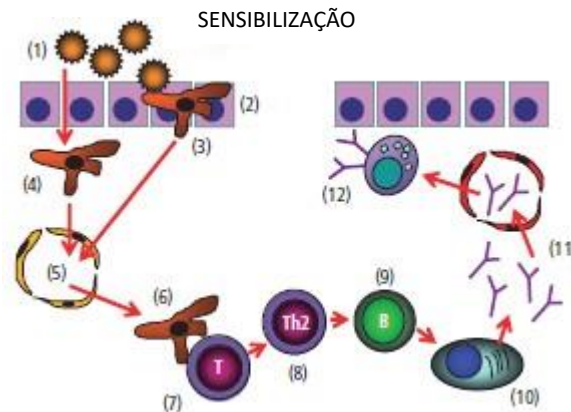


Figura 7 – Fase de sensibilização da hipersensibilidade de tipo I. **(1)** o alérgénio deposita-se sob a barreira epitelial (epiderme, mucosa intestinal ou bronquial); **(2)** Perda da integridade da barreira, permite a penetração do alérgénio; **(3)** o alérgénio encontra célula dendrítica epitelial (ex.: célula de Langerhans); **(4)** o alérgénio encontra célula dendrítica subepitelial; **(5)** células dendríticas migram pelos vasos linfáticos para o linfonodo regional; **(6)** células dendríticas permanecem no paracórtex e apresentam péptido alérgénico através de moléculas do MHC de classe II; **(7)** Linfócito T naive reconhece o complexo MHC-péptido através dos TCR; **(8)** Coestimulação direta pela célula dendrítica na diferenciação em linfócito Th2; **(9)** o linfócito Th2 ativo entra na região medular do linfonodo e estimula o linfócito B alérgénico-específico; **(10)** o linfócito B ativo diferencia-se em plasmócito; **(11)** Plasmócitos secretam anticorpos alérgénico-específicos, que entram em circulação; **(12)** IgE (ou IgG) alérgénico-específicas ligam-se aos recetores dos basófilos circulantes ou aos mastócitos. O animal encontra-se sensibilizado, com a possibilidade de se desencadear uma reação de hipersensibilidade numa nova exposição ao alérgénio (adaptado de Day, 2014).

Em suma, a exposição a quantidades significativas de alérgénios, a existência de defeito na barreira epitelial e de células dendríticas não tolerantes, e a ausência de inibição pelos linfócitos Treg, em conjunto com a ação de citocinas pró-inflamatórias, permitem uma ativação inapropriada dos linfócitos Th que promovem a resposta alérgica.

Por outro lado, para que os linfócitos B sejam ativados é necessário que as partículas alérgénicas intactas sejam transportadas para o mesmo linfonodo. Após a sua chegada, entram na região medular, onde interagem com os recetores dos linfócitos B, sendo totalmente ativados após libertação de interleucinas pelos linfócitos Th2.

A ativação dos linfócitos B alérgénico-específicos resulta na produção de IgE e IgG, que circulam na corrente sanguínea, podendo ligar-se aos recetores de alta afinidade para IgE (FcεRI) presentes na superfície celular dos mastócitos e basófilos circulantes.

Os complexos IgE-mastócito residem normalmente abaixo da superfície epitelial da pele, do trato respiratório e intestinal, admitindo-se a partir deste ponto que o animal se encontra sensibilizado.

Como pode ser observado na Figura 8, após nova exposição ao alergénio, a manifestação clínica evidencia-se, através da ligação cruzada entre os complexos IgE-mastócito e as partículas alergénicas. Esta ligação cruzada tem como resultado a desgranulação dos mastócitos com libertação de mediadores bioativos, responsáveis pela vasodilatação, edema local, prurido ou broncoconstrição, no caso de doença respiratória (Day, 2014).

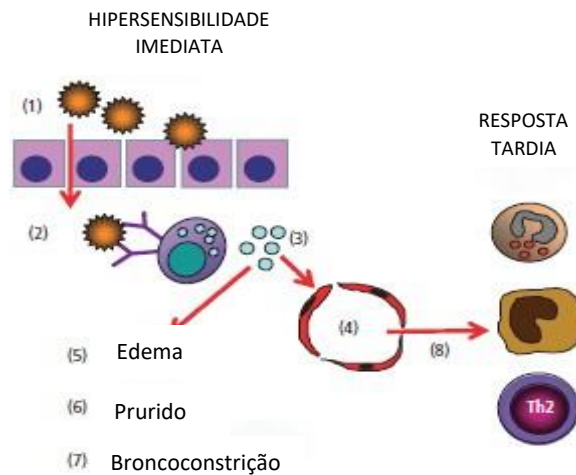


Figura 8 – Reações de hipersensibilidade imediata e retardada. (1) reexposição alergénica de um animal sensibilizado; (2) o alergénio penetra a barreira epitelial e encontra IgE alergénio-específica na superfície de mastócitos subepiteliais. Duas moléculas IgE mantêm uma ligação cruzada (*cross-link*) através dos epítopos de uma molécula alergénica; (3) Desgranulação dos mastócitos e libertação de mediadores bioativos; (4) Vasodilatação capilar, assim como outros efeitos da desgranulação dos mastócitos: (5), (6) e (7); (8) Quatro a 24 horas mais tarde, ocorre um influxo de eosinófilos, macrófagos e linfócitos gerando uma resposta tardia (adaptado de Day, 2014).

2. Respostas Imunoalergológicas em Equinos

2.1. Anafilaxia

Tal como já foi referido, as reações de hipersensibilidade surgem, via de regra, a partir de uma resposta imunitária adaptativa prévia. Quando uma reação de hipersensibilidade imediata é sistémica e potencialmente fatal designa-se por choque anafilático ou anafilaxia alérgica (Day & Schultz, 2011).

A anafilaxia constitui a manifestação alérgica mais relevante e pode ser desencadeada por reações não dependentes da produção de IgE. Estas reações designam-se por anafilactóides e levam de igual forma, à libertação de mediadores inflamatórios pelos mastócitos e basófilos (Louzada *et al.*, 2003).

2.1.1. Sinais Clínicos

A anafilaxia contrariamente a outras reações de hipersensibilidade tipo I provoca uma reação alérgica sistêmica e não meramente local, como é o caso da dermatite atópica e da hipersensibilidade à picada dos insetos (Radcliffe, 2016), como será abordado mais adiante.

O grau de severidade dos sinais clínicos está dependente da dose de antigénio a que o animal está exposto, do tipo e quantidade de mediadores inflamatórios secretados, do processo de ativação do antigénio e da resposta inflamatória individual do animal (Tizard, 2013). O quadro clínico pode ser classificado em ligeiro, moderado ou severo.

Um quadro clínico ligeiro inclui o desenvolvimento de urticária e rinite. Já sinais clínicos como angioedema, diarreia e dor abdominal estão associados a um quadro clínico moderado. Entendem-se por reações severas, sinais clínicos como dispneia (cavalo em posição ortopneica), hipotensão, colapso e morte súbita. De um modo geral, quanto mais precoce for a manifestação dos sinais clínicos, mais provável será o desenvolvimento de uma reação anafilática severa (Radcliffe, 2016).

A quantidade, persistência e via de exposição ao antigénio têm uma influência direta no quadro clínico apresentado. A exposição por inalação está normalmente associada a inflamação do trato respiratório superior, broncoconstricção e conjuntivite, enquanto a exposição tópica se associa mais frequentemente a urticária, eritema e prurido, e a exposição por via parenteral e oral, a vários sinais sistémicos (Swiderski, 1995; citado por Radcliffe, 2016).

Os sinais clínicos mais críticos das reações anafiláticas sistémicas são a dispneia e a hipotensão, na medida em que refletem asfixia (secundária ao aumento do tónus do músculo liso brônquico e secreção mucosa, e ao edema laríngeo e pulmonar) e choque distributivo (secundário a intensa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, diminuição do retorno venoso e arritmia cardíaca) (Swiderski, 1995; citado por Radcliffe, 2016).

A prevalência das reações anafiláticas em cavalos é desconhecida. No entanto, alguns autores verificaram uma incidência de 16% de reações a transfusões sanguíneas em cavalos adultos (Hurcombe *et al.*, 2007; citado por Radcliffe, 2016) e aproximadamente 6 - 10% de reações a administração de fármacos, sendo a penicilina o fármaco mais vezes implicado (Dowling, 2004; citado por Radcliffe, 2016).

2.1.2. Etiopatogenia

A manifestação de anafilaxia sistêmica primária em cavalos dá-se no decurso de hipersensibilidade a vários fármacos, vacinas e derivados sanguíneos (ex.: plasma). Tal como qualquer outra reação de hipersensibilidade imediata desencadeia-se a partir da sensibilização antigénica e posterior desgranulação mastocitária, conseqüente a reexposição ao antigénio (Radcliffe, 2016).

Após a desgranulação dos mastócitos ocorre a secreção de uma série de mediadores inflamatórios e vasoativos (ver ponto 1.10), que, em conjunto, são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, quimiotaxia, alteração das funções plaquetárias e ativação da coagulação e do sistema complemento (Lieberman, 2006). Embora os mastócitos e basófilos sejam os protagonistas do início da reação anafilática, os macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e plaquetas têm um papel de expansão e manutenção da cascata inflamatória (Radcliffe, 2016).

A histamina e a serotonina são os mediadores primários das reações anafiláticas em cavalos (Tizard, 2013). Além das funções já descritas, a histamina tem ação cronotrópica e inotrópica positiva, fundamentais para o aumento da eficácia de oxigenação dos tecidos (Radcliffe, 2016). Além destes mediadores inflamatórios, os mastócitos secretam, de igual forma, proteases (ex.: triptase), citocinas e produtos metabólicos do ácido araquidônico (Lieberman, 2006).

Por outro lado, existem reações anafilactóides que não são classificadas como reações de hipersensibilidade tipo I. Apesar das diferenças nos mecanismos de ativação, comparativamente à anafilaxia, os sinais clínicos são semelhantes. Como exemplo de reações anafilactóides, temos a ativação do sistema complemento e reações alérgicas mediadas por IgG, decorrentes do uso de vários fármacos e/ou derivados sanguíneos, e anomalias no metabolismo do ácido araquidônico, induzidas pela terapêutica instituída com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (Lieberman, 2006).

Alguns mecanismos não imunológicos e não alérgicos podem igualmente induzir diretamente a desgranulação dos mastócitos e basófilos (ex.: opióides, meios de contraste, luz solar, temperaturas extremas e excesso de exercício). Nestes casos, quando não é possível identificar o agente etiológico, designa-se por anafilaxia idiopática (Simons, 2013).

2.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico é baseado sobretudo na história e apresentação clínica do cavalo. Na história clínica deve ser tomada em consideração a recente administração de alguma substância medicamentosa ou vacinação, possíveis alterações na dieta e qualquer evidência clínica de hipersensibilidade à picada dos insetos. Quanto à apresentação clínica, frequentemente estão envolvidos mais do que um sistema, incluindo o cardiovascular, o respiratório, o gastrointestinal e o cutâneo. O surgimento súbito de dispneia, hipotensão, urticária e colapso são considerados sinais patognomônicos de anafilaxia sistêmica (Radcliffe, 2016).

Na medicina humana, de forma a possibilitar um diagnóstico rápido, foram estabelecidos critérios clínicos específicos, que de alguma forma, poderão ser extrapolados para a prática veterinária. A suspeita de anafilaxia é reforçada, no caso de ocorrência de pelo menos um dos seguintes critérios (Sampson *et al.*, 2006; citado por Radcliffe, 2016):

- a) Surgimento agudo de sinais clínicos, com envolvimento da pele e/ou mucosa concomitante com dificuldade respiratória ou redução da pressão sanguínea;
- b) Após exposição a um possível alergénio, desenvolve dois ou mais dos seguintes sintomas: envolvimento da pele/mucosa, comprometimento respiratório, redução da pressão sanguínea ou sintomas gastrointestinais persistentes;
- c) Redução da pressão sanguínea após exposição a um alergénio conhecido.

Na endoscopia respiratória, caso seja possível realizar, a confirmação de edema laríngeo está muitas das vezes associada à anafilaxia (Schaer & Orsini, 2014).

Os testes laboratoriais são igualmente uma opção, no entanto a sua utilização é mais comum na medicina humana. A quantificação de triptase sérica é considerada o teste *gold standard* para a confirmação de anafilaxia em humanos (Vitte & Bongrand, 2013; citado por Radcliffe, 2016). A determinação da histamina plasmática é também uma hipótese, contudo a triptase mantém-se elevada durante mais tempo do que a histamina, oferecendo maior janela de oportunidade diagnóstica (Lieberman, 2006).

2.1.4. Tratamento

Nem todos os casos de anafilaxia alérgica requerem tratamento de emergência. Nos casos mais ligeiros, apenas é recomendada a monitorização e o tratamento com anti-histamínicos (Divers, 2014).

Nos casos mais severos é fundamental um reconhecimento precoce dos sinais clínicos e uma atuação rápida, já que a anafilaxia é súbita e progressiva. Após diagnóstico ou suspeita de manifestação anafilática, devem ser realizados os seguintes passos (Schaer & Orsini, 2014):

1. Interromper a exposição ao agente responsável (ex.: descontinuar a administração endovenosa de qualquer fármaco).
2. Análise rápida do estado do cavalo:
 - a. Respiração, circulação e nível de consciência;
 - b. monitorizar os parâmetros vitais (frequência cardíaca e respiratória, e pressão sanguínea);
 - c. caso ocorra dispneia extrema associada a edema laríngeo severo, deve ser realizada entubação endotraqueal ou traqueostomia.
3. Administração de epinefrina (Divers, 2014):
 - a. Provoca broncodilatação e aumento do débito cardíaco (Radcliffe, 2016);
 - b. em poldros, uma dose de 0,01-0,02 mg/kg, via endovenosa de forma lenta;
 - c. em cavalos adultos, uma dose de 0,01 mg/kg, via endovenosa de forma lenta, e
 - d. em alguns casos pode ser recomendada por via intramuscular ou endotraqueal (Lavoie *et al.*, 2014).
4. Oxigenoterapia, a uma taxa de 5-10L/min em poldros, e 10-15L/min em cavalos adultos.

5. Fluidoterapia com soluções cristaloides e/ou coloides, nos casos refratários ao tratamento com epinefrina (Lavoie *et al.*, 2014):
 - a. Solução cristalóide a uma taxa de 50-80 mL/kg em poldros, divididos em bolus, e a uma taxa de 10-20 mL/kg/h em cavalos adultos;
 - b. solução hipertónica pode também ser uma escolha em cavalos com choque, a uma taxa de 2-4 mL/kg; em conjunto, deve ser administrado aproximadamente 10L de solução cristalóide, por cada litro de solução hipertónica, ou
 - c. solução colóide, a uma taxa de 2-10 mL/kg/dia, combinada com uma solução cristalóide, pode também ser uma opção para restaurar e manter o volume intravascular.

Outros tratamentos podem ser necessários, conforme a resposta ao tratamento inicial. Vasopressores, como a dobutamina, dopamina e vasopressina devem ser considerados nos casos em que ocorre hipotensão refratária à epinefrina e à fluidoterapia. Nestes casos, assim como no tratamento inicial, pretende-se uma pressão arterial média superior aos 60-70 mmHg. Atendendo a que alguns destes fármacos têm efeito pró-arrítmico, é recomendável realizar monitorização cardíaca, através de eletrocardiografia (Radcliffe, 2016).

O tratamento inalatório com broncodilatadores (ex.: albuterol) constitui também uma opção quando na presença de broncoespasmo renitente a doses repetidas de epinefrina (Radcliffe, 2016). Nos casos com edema pulmonar severo é aconselhável a utilização de furosemida (Lavoie *et al.*, 2014). Os anti-histamínicos e os glucocorticoides podem também ser recomendáveis (Radcliffe, 2016).

2.1.5. Prevenção

Cavalos suspeitos de reação anafilática associada a alergia alimentar e cavalos com história de hipersensibilidade à picada dos insetos, devem evitar o contacto com as respetivas fontes alergénicas. A execução de testes cutâneos ou a determinação de IgE alergénio-específicas podem auxiliar na investigação diagnóstica, de forma a ser efetuada uma prevenção mais eficaz.

Quando é administrado a um cavalo com história de anafilaxia, um fármaco, ao qual existe apreciável probabilidade de sensibilização, mas se desconhece a sua existência, deverá ser realizada monitorização do animal durante 20-30 minutos após a administração, sobretudo se injetável. No caso de um tratamento requerer a administração de um fármaco associado a reação anafilática, é de especial interesse realizar pré-medicação combinada com flunixin meglumina e anti-histamínico, ou anti-histamínico e corticosteroide. A administração por via oral deve ser escolhida sempre que possível, uma vez que é menos suscetível de causar reações severas do que a via parenteral (Radcliffe, 2016).

Alguns autores têm referido uma relação entre a administração de penicilina G procaína e o desenvolvimento de reações adversas (anafilaxia, toxicidade à penicilina ou procaína e embolia

pulmonar aguda). Assim sendo, é sugerido que as injeções sejam realizadas em locais diferentes de forma lenta (Dowling, 2004; citado por Radcliffe, 2016).

2.1.6. Prognóstico

O prognóstico é variável e depende do tipo e grau de severidade do episódio anafilático, prontidão do diagnóstico, resposta ao tratamento e possíveis complicações que advenham da reação.

Nos casos mais ligeiros, apenas com reações locais, o prognóstico é mais favorável e reflete a resposta ao tratamento. Por outro lado, reações sistêmicas, particularmente aquelas que se caracterizam por comprometimento cardiorrespiratório, apresentam um elevado risco de vida, pelo que é de extrema importância realizar um diagnóstico e tratamento de emergência, ou seja, o mais precocemente possível (Radcliffe, 2016).

2.2. Hipersensibilidade aos Culicídeos

A Hipersensibilidade aos culicídeos constitui uma dermatite alérgica recorrente, mediada por IgE, e caracteriza-se por ser sazonal (Wagner, 2016), com manifestações clínicas entre a primavera e o outono nos climas temperados, e durante todo o ano nos climas tropicais e subtropicais (Littlewood, 2014).

Esta doença alérgica é conhecida por diferentes nomes, tais como: eczema de verão, dermatite recorrente sazonal, *sweet itch*, hipersensibilidade à picada dos insetos, entre outros. A hipersensibilidade aos culicídeos afeta todas as raças de equinos, sendo descrita com maior relevância nas raças *Icelandic*, Árabe, Quarto de Milha, Frísia e *warmblood*, assim como nalgumas raças de pôneis.

A doença ocorre nos países em que os insetos do género *Culicoides sp.* são endêmicos. Apesar do seu papel etiológico na hipersensibilidade equina, é de assinalar que os culicídeos também servem de vetor de doenças infecciosas, como são exemplo a Língua Azul em ovinos e a Peste Equina Africana (Mellor *et al.*, 2000; Wagner, 2014).

A sua prevalência é bastante variável nos diferentes países, o que pode ser explicado pelos vários fatores que influenciam o desenvolvimento da doença alérgica (Schaffartzika *et al.*, 2012). Com base no que foi referido no ponto 1.10, a variação da prevalência deve-se aos seguintes fatores (Wagner, 2016):

- Ambiente e exposição aos insetos;
- tempo que o cavalo passa no exterior, já que, cavalos que maioritariamente estabulados encontram-se menos expostos (ex.: cavalos usados para alta competição passam mais tempo estabulados do que os cavalos de lazer);
- idade até aos dois a quatro anos, apesar de poder ocorrer em qualquer altura (Littlewood, 2014), e
- predisposição genética.

Os culicídeos podem ser encontrados quer em países tropicais, quer em regiões temperadas e existem mais de 1400 espécies espalhadas por todo o mundo, exceto na Antártida, Islândia e Nova Zelândia.

O ciclo de vida dos culicídeos exige que se reproduzam em locais com águas estagnadas, como zonas pantanosas, lagos e riachos, assim como em zonas com estrume animal e vegetação ou frutos em putrefação. A maioria dos culicídeos adultos alimenta-se durante o início e o fim do dia, sendo que apenas as fêmeas são hematófagas (Wagner, 2014).

Além dos culicídeos, a hipersensibilidade à picada também se pode dever à *mosca-dos-chifres* (*Haematobia sp.*), mosquitos, *mosca-dos-cervos* (*Chrysops sp.*), *mosca-dos-estábulo* (*Stomoxys sp.*) simúlideos e aos tabanídeos. Cada um deles apresenta alturas do dia e localizações para se alimentar preferencialmente diferentes (Rees, 2005).

2.2.1. Sinais Clínicos

Como as reações de hipersensibilidade se originam a partir da resposta imunitária para proteínas existentes na saliva dos culicídeos, a distribuição das lesões na pele dos animais afetados é bastante variável, pois estão dependentes dos locais preferenciais de alimentação de cada uma das espécies existentes (Rees, 2005). Assim sendo, é natural que durante o ano, em certos locais onde existem diferentes espécies de culicídeos, o padrão lesional seja misto e diferente de animal para animal (Fadok, 2013).

A distribuição das lesões pode então ser dividida em três tipos distintos, incluindo a distribuição dorsal ou ventral e uma combinação de ambas. O padrão da distribuição dorsal consiste em lesões na cabeça, orelhas, pescoço, garrote, garupa e base da cauda. O padrão de distribuição ventral inclui, por sua vez, lesões nos membros, virilhas, axilas, espaço intermandibular, tórax e abdómen ventral. O padrão de distribuição misto apresenta características de ambas as distribuições, dorsal e ventral (Rees, 2005).

As manifestações clínicas, como já referido, podem ocorrer em qualquer idade, embora tendam a agravar ao longo do tempo (Littlewood, 2014). Não existe qualquer associação conhecida com o sexo ou a pelagem do animal (Steinman *et al.*, 2003; citados por Littlewood, 2014), mas existe uma tendência hereditária para o desenvolvimento de doença alérgica (Gerber, 1989; citado por Littlewood, 2014).

A condição mais relevante, associada à hipersensibilidade aos culicídeos, é o prurido, que usualmente é mais intenso ao fim do dia, altura preferencial de alimentação dos insetos. Inicialmente, o seu desenvolvimento resulta na formação de lesões papulares com marcada hiperestesia da zona afetada. Ao longo do tempo, o animal tende a coçar-se em qualquer estrutura conveniente para o efeito, o que leva inevitavelmente ao desenvolvimento de lesões secundárias, como são exemplo a alopecia, a formação de crostas e as escoriações.

O prurido e a coceira intensa também pode levar a infecções bacterianas secundárias, tais como: lesões crostosas associadas a foliculite superficial, pioderma da cauda ou extensas áreas cutâneas com inflamação severa e exsudação.



Figura 9 – Perda total de pêlo na crineira, com zonas de marcada alopecia, despigmentação e edema (adaptado de Littlewood, 2014)

Os cavalos que apresentam prurido crônico desenvolvem áreas alopécicas mais extensas, com escamação e liquenificação. Animais severamente afetados podem manifestar perda total de pêlo na crineira e também no terço proximal da rabada (Figura 9 e 10, respetivamente). Podem também observar-se despigmentações cutâneas.

Além das lesões cutâneas, os cavalos afetados podem demonstrar uma série de distúrbios comportamentais, tais como: ansiedade, nervosismo, agressividade e inquietação. Este comportamento animal pode levar a perda de peso e condição física, tornando o cavalo inapto para o trabalho (Littlewood, 2014).

A hipersensibilidade aos culicídeos pode estar associada a obstrução recorrente das vias aéreas (*recurrent airway disease*, RAO) (Lanz *et al.*, 2017). Algumas investigações epidemiológicas verificaram que cavalos com um quadro clínico dermatológico, como a hipersensibilidade à picada dos insetos, ou urticária, apresentam um risco aumentado de desenvolverem RAO, assim como o seu inverso (Kehrli *et al.*, 2015; Lanz *et al.*, 2017).

Assim como os culicídeos, existem outros insetos que originam hipersensibilidade à picada em equinos. Por exemplo, a *mosca-dos-estábulos* (*Stomoxys sp.*) é conhecida por possuir uma toxina salivar, a qual, ao ser inoculada repetidamente, através de múltiplas picadas, pode resultar em problemas cardiorrespiratórios, choque, ou até mesmo a morte (Perris, 1995; citado por Rees, 2005).

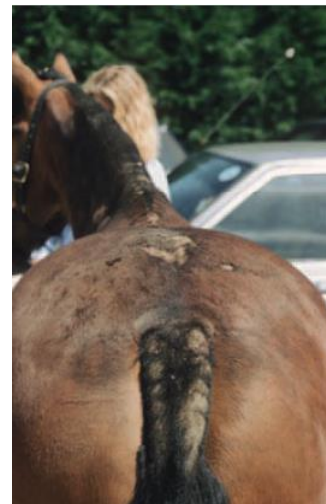


Figura 10 – Marcada alopecia e presença de lesões crostosas na rabada e garupa (adaptado de Lloyd *et al.*, 2003)

2.2.2. Etiopatogenia

Os dois maiores intervenientes na patogénese da hipersensibilidade aos culicídeos são a IgE e os alérgenos salivares dos culicídeos, necessários para a hipersensibilidade de tipo I (Figura 11) (Wagner, 2016). Porém, esta doença alérgica pode também resultar de uma reação de hipersensibilidade retardada (tipo IV) (Rees, 2005), por intermédio da ação de linfócitos Th2 e dos eosinófilos (Jonsdottir *et al.*, 2019). De um modo geral, os mecanismos imunológicos das alergias mediadas por IgE nos cavalos são similares aos dos humanos (Schaffartzika *et al.*, 2012).

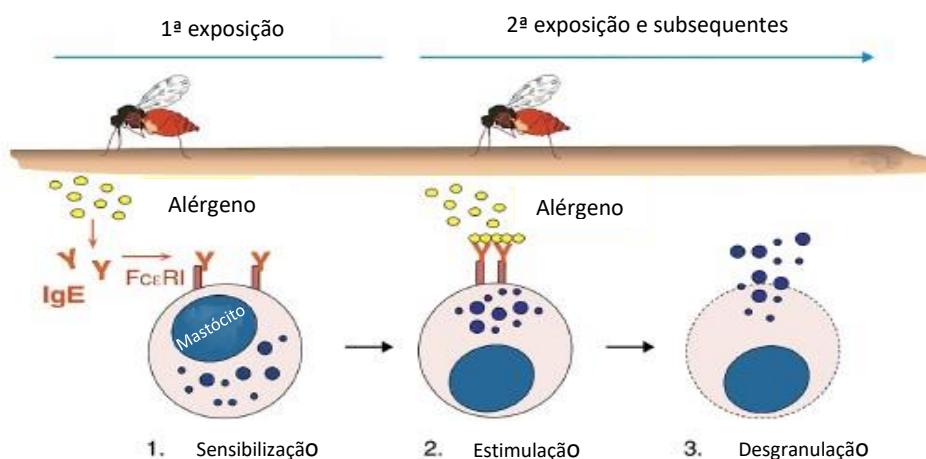


Figura 11 – *Sensibilização* dos mastócitos da pele e libertação de mediadores inflamatórios como resposta aos alérgenos salivares dos culicídeos. Durante a 1ª exposição, os cavalos são picados pelos insetos culicídeos e desenvolvem IgE para diferentes antígenos salivares (adaptado de Wagner, 2016)

Como já foi abordado no ponto 1.10, os mecanismos imunitários envolvidos no desenvolvimento desta doença alérgica incluem a secreção de IgE específicas, a sensibilização e desgranulação mastocitária, e a consequente libertação de mediadores inflamatórios, como histamina, leucotrienos e prostaglandinas, e citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13. Desta forma, a desgranulação dos mastócitos inicia uma reação inflamatória imediata ao nível pele (Wagner, 2016).

A *sensibilização* dos mastócitos e dos basófilos circulantes constitui um processo essencial ao desenvolvimento de alergia e precede sempre o desencadeamento das manifestações clínicas (Wagner, 2014). No entanto, a *sensibilização* mastocitária com IgE alérgeno-específicas pode não resultar numa resposta alérgica. Alguns estudos comprovaram que muitos dos cavalos clinicamente saudáveis, estão sensibilizados a alérgenos de culicídeos e não desenvolvem hipersensibilidade, pois ocorre um equilíbrio das respostas imunológicas, não manifestando alergia (Wagner *et al.*, 2009).

A explicação mais apoiada para o desencadeamento de hipersensibilidade aos culicídeos passa pela existência de um desequilíbrio imunológico, caracterizado pelo aumento da quantidade de linfócitos Th2 alérgeno-específicos, combinada com uma redução da quantidade

ou capacidade dos linfócitos Treg, nos cavalos afetados (Heinmann *et al.*, 2011). Assim, a diminuição da capacidade de regulação dos mecanismos imunológicos resulta numa maior atividade dos linfócitos Th2 e na produção de IgE alérgico-específica, com desencadeamento da resposta alérgica (Wagner, 2016).

O efeito da diminuição das funções de imunorregulação em cavalos alérgicos é sustentado por resultados experimentais, os quais mostraram que citocinas reguladoras, secretadas pelos linfócitos Treg, como a IL-10 e o fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1) podem reduzir a produção de IL-4, *in vitro*, pelos linfócitos Th2 de cavalos alérgicos (Hamza *et al.*, 2008). A estimulação de células mononucleares sanguíneas periféricas com extratos de culicídeos também revelou menores taxas de linfócitos Treg em cavalos alérgicos, que em cavalos clinicamente saudáveis (Hamza *et al.*, 2011; citados por Wagner, 2016).

A maioria das investigações relacionadas com mecanismos imunológicos envolvidos na hipersensibilidade aos culicídeos têm vindo a ser realizadas em cavalos da raça *Icelandic*. Em algumas dessas investigações verificou-se que cavalos alérgicos exportados da Islândia apresentavam taxas superiores de linfócitos Th2 alérgico-específicos, do que cavalos da raça *Icelandic* nascidos na Europa continental (Hamza *et al.*, 2008). Esta observação sugere que o aumento da prevalência alérgica nos cavalos *Icelandic* exportados poderá ser influenciado por uma exposição mais tardia aos culicídeos (Wagner, 2016).

A resposta imunitária dos poldros difere em vários aspetos da imunidade dos cavalos adultos. A exposição numa fase mais prematura parece constituir efeito protetor relativamente ao possível desenvolvimento de doença alérgica no futuro. Poldros jovens exibem uma menor atividade dos linfócitos Th2 comparativamente com os cavalos adultos (Wagner *et al.*, 2010; citados por Wagner, 2016) e também, não produzem IgE durante vários meses, no decurso do primeiro ano de vida (Wagner *et al.*, 2009).

2.2.3. Diagnóstico

O diagnóstico de hipersensibilidade aos culicídeos é realizado a partir da análise da história clínica, sinais clínicos, resposta ao controlo da exposição aos insetos e testes de alergia, quer sejam *in vitro* ou *in vivo* (Fadok, 2013).

Numa primeira fase é necessário excluir todos os diagnósticos diferenciais que incluam alergia alimentar, atopia, infeção cutânea bacteriana ou fúngica, ectoparasitismo e hipersensibilidade à picada de outros insetos.

A existência de prurido, a localização geográfica em que o animal vive, a correlação com a sazonalidade e a distribuição das lesões são extremamente importantes na avaliação diagnóstica. Apesar de qualquer cavalo poder ser afetado, é importante verificar também se existem fatores de risco associados, ou seja, se pertence a uma raça predisposta ao desenvolvimento de hipersensibilidade aos culicídeos, a idade e o histórico familiar (Bergvall, 2014).

Vários testes de alergia têm vindo a ser utilizados na deteção de IgE alérgico-específicas circulantes, ou fixadas à superfície dos mastócitos ou basófilos (Wagner, 2009). O seu principal objetivo passa pela identificação dos alérgenos causadores de sintomatologia clínica, de modo a desenvolver planos de prevenção e hipossensibilização (Wagner, 2016).

Ao longo de vários anos, os testes intradérmicos, assim como alguns testes sorológicos, baseados na metodologia *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), têm sido utilizados no diagnóstico alergológico (Fadok & Greiner, 1990; Lebis *et al.*, 2002; Lorsch *et al.*, 2001c; Knottenbelt, 2009).

Relativamente aos TID, têm como finalidade mimetizar uma reação alérgica em cada um dos locais onde foram inoculadas, em doses baixas, diferentes preparações alérgicas potencialmente causadoras de alergia. Após a inoculação e a ocorrência do *cross-link* antigénio-IgE específicas à superfície dos mastócitos cutâneos, são libertados mediadores inflamatórios, que levam a formação papular (Wagner *et al.*, 2006). O principal propósito da sua utilização passa pela deteção de *sensibilização* específica dos mastócitos da pele, que constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de doença alérgica. No entanto, como referido anteriormente, a *sensibilização* dos mastócitos ou basófilos com IgE alérgico-específica não significa necessariamente que o cavalo seja alérgico (Kolm-Stark & Wagner, 2002; Lebis *et al.*, 2002; citado por Wagner, 2016). Como tal, o diagnóstico deve ser sempre realizado, tendo em conta a apresentação clínica do animal (Wagner, 2016).

Apesar da sua utilização, os TID têm apresentado alguma falibilidade nos resultados. Cavalos sintomáticos, com hipersensibilidade aos culicídeos ou urticária, tendem a reagir mais frequentemente a alérgenos que dificilmente são desencadeadores de alergia, do que cavalos saudáveis (Larsen *et al.*, 1988; Lorsch *et al.*, 2001a; citado por Wagner, 2016).

As limitações dos testes intradérmicos tornam os testes sorológicos como o método ELISA, uma promissora alternativa de diagnóstico. Como suporte a esta afirmação, demonstrou-se o papel fundamental da IgE no desenvolvimento de hipersensibilidade (Wagner *et al.*, 2006) e verificou-se uma correlação entre os resultados positivos nos ELISA e a apresentação clínica (Kalina *et al.*, 2003).

Os testes sorológicos alergológicos medem a concentração de IgE alérgico-específicas séricas (Lorsch *et al.*, 2001c), identificando secundariamente as IgE pela utilização de anticorpos anti-IgE ou do recetor de alta afinidade para a IgE humana (FcεR1α). Os testes, recorrendo à anti-IgE equina como anticorpo secundário são efetuados da seguinte forma (Wagner, 2016):

- a) Na fase sólida do ensaio são colocadas, separadamente, várias preparações alérgicas (são frequentemente usadas placas ELISA);
- b) é adicionada à placa, soro dos animais suspeitos de doença alérgica. Durante esta etapa a IgE liga-se aos alérgenos para os quais é específica e

- c) por fim, adiciona-se um reagente anti-IgE equina, para detetar a quantidade de IgE que se ligou na placa.

Todavia, os testes de quantificação de IgE alérgico-específica apresentam um conjunto de limitações que os torna duvidosos e incapazes de substituir os testes intradérmicos (Morgan *et al.*, 2007). A baixa especificidade de alguns reagentes anti-IgE e a falta de qualidade de alguns extratos alérgicos configuram algumas dessas limitações (Wagner, 2016).

A especificidade dos reagentes anti-IgE é o parâmetro mais importante para melhorar a fiabilidade dos testes sorológicos de alergia. Nestes ensaios *in vitro*, têm sido utilizados diversos reagentes para deteção de IgE equina, incluindo anticorpos monoclonais anti-IgE (Langner *et al.*, 2008), anticorpos policlonais anti-IgE (Eder *et al.*, 2000) e a cadeia humana FcεR1α (Frey *et al.*, 2008).

Além do papel importante da IgE na hipersensibilidade, Ziegler *et al.* (2017) demonstraram que, em cavalos da raça *Icelandic*, uma das subclasses da IgG, mais especificamente a IgG5, está envolvida no desenvolvimento de alergia. Neste estudo, a determinação da IgG5 alérgico-específica sugeriu também apresentar algum valor preditivo para hipersensibilidade aos culicídeos. Por outro lado, o aumento da IgE alérgico-específica sérica, embora refletisse a condição clínica do animal, não apresentou qualquer valor preditivo como biomarcador no futuro desenvolvimento de hipersensibilidade (Ziegler *et al.*, 2017). Assim sendo, e tendo em conta que a concentração sérica de IgG é superior à concentração sérica de IgE, esta situação configura mais uma limitação dos testes sorológicos (Langner *et al.*, 2008).

O método ELISA tem sido o teste sorológico mais estudado como alternativa aos TID, não só pela sua facilidade de execução comparativamente com outros testes sorológicos, mas também por ser mais económico. No entanto, outros testes têm sido realizados, como por exemplo o teste de libertação de histamina ou *Histamine release test* (HRT). O HRT indicou apresentar uma sensibilidade superior e ser mais fiável do que o método ELISA no diagnóstico de hipersensibilidade aos culicídeos. Porém, quando testados com uma amostragem mais representativa, o método ELISA apresentou uma especificidade e sensibilidade bastante superiores. Neste estudo provou-se igualmente a interferência da IgG na libertação de histamina (van der Meide *et al.*, 2012).

Contrariamente à medição da IgE alérgico-específica sérica, a medição da IgE total sérica não constitui um parâmetro relevante no diagnóstico. As concentrações séricas de IgE têm provado não diferirem entre cavalos alérgicos e cavalos saudáveis (Scharrenberg *et al.*, 2010) e serem influenciadas pelo endoparasitismo (Hamza *et al.*, 2010; citado por Bergvall, 2014).

A histopatologia, a partir de biópsias de pele, poderá ser um outro método de diagnóstico, contudo não fornece muita informação complementar, útil. A sua utilização confirma apenas de que se trata de uma reação de hipersensibilidade, sendo que a predominância de eosinófilos e células mononucleares pode sugerir reação à picada dos insetos (Bergvall, 2014).

Em suma, os testes intradérmicos continuam a ser considerados o *gold standard* no diagnóstico de hipersensibilidade aos culicídeos, apesar das suas limitações (Liphook Equine Hospital, 2016). Adicionalmente, pode ser utilizado o método *FcεRIα-based* ELISA, que apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, assim como uma boa correlação com os resultados dos TID (Lorsch *et al.*, 2001c).

A título de curiosidade, têm sido desenvolvidas outras técnicas mais eficazes de diagnóstico *in vitro*, a partir de microarranjos ou *microarrays* proteicos compostos por extratos complexos e proteínas puras (Marti *et al.*, 2015).

2.2.4. Tratamento

O tratamento de alergia mediada por IgE é maioritariamente sintomático. Atualmente, não existem tratamentos totalmente capazes de reverter o quadro clínico do animal. Deste modo, são utilizados mais frequentemente glucocorticoides e/ou anti-histamínicos, como forma de reduzir sinais clínicos severos (Wagner, 2016).

Os glucocorticoides têm feito parte da terapêutica comum dos cavalos alérgicos. A sua função passa sobretudo pelo controlo dos sinais clínicos associados à hipersensibilidade, inibindo direta ou indiretamente, a produção de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, fatores do complemento e a síntese de prostaglandinas e leucotrienos (Yu, 2014). Ainda assim, a sua utilização excessiva pode levar a vários efeitos secundários, tais como: hepatopatia induzida por corticosteroides, laminite e hiperadrenocorticismismo iatrogénico (Cohen & Carter, 1992; Johnson *et al.*, 2002; citado por Yu, A.A., 2014).

Os glucocorticoides mais usados no tratamento a curto prazo da hipersensibilidade aos culicídeos, são (Yu, 2014):

- Prednisolona, numa dosagem de 0,5-1,5 mg/kg/dia durante sete a 14 dias, e posteriormente baixar para uma dosagem de manutenção de 0,2-0,5 mg/kg a cada dois dias, durante duas a cinco semanas; a prednisona pode ser uma alternativa, contudo apresenta uma menor biodisponibilidade em cavalos (Peroni *et al.*, 2002);
- dexametasona, quer seja por via endovenosa ou oral, numa dosagem de 0,05-0,1 mg/kg/dia durante três a sete dias, e posteriormente baixar para uma dosagem de manutenção de 0,01-0,02 mg/kg, com 48 a 72 horas de intervalo; a escolha deste plano terapêutico pode ser particularmente útil nos casos mais refratários.

Por sua vez, os anti-histamínicos são uma alternativa não esteroide para um controlo a longo prazo das reações alérgicas em cavalos, embora a sua eficácia se mantenha indeterminada (Yu, 2014). Tal como nos humanos e noutras espécies domésticas, existe uma enorme variação da sua resposta, que se encontra dependente da severidade e do tipo de lesões (Olsén *et al.*, 2008).

Estudos prévios mostraram que a cetirizina poderá ser uma boa opção no tratamento de hipersensibilidade aos culicídeos (Olsén *et al.*, 2011), no entanto podem ser utilizados outros anti-histamínicos, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Anti-histamínicos prescritos pelo autor, por ordem de preferência (adaptado de Yu, 2014)

Anti-histamínico	Dose	Frequência
Cetirizina	0,2-0,4 mg/kg	Duas vezes ao dia (b.i.d)
Hidrocloridrato de Hidroxizina	0,5-1,0 mg/kg	Três vezes ao dia (t.i.d)
Clorfeniramina	0,25 mg/kg	b.i.d
Difenidramina	0,75-1 mg/kg	b.i.d
Fexofenadina	10 mg/kg	t.i.d
Maleato de Pirilamina	1 mg/kg	b.i.d

De um modo geral, os anti-histamínicos na hipersensibilidade aos culicídeos, devem ser usados numa fase precoce da doença alérgica, quando os sinais clínicos são menos severos, ou numa fase mais tardia do plano terapêutico instituído, quando a dosagem de glucocorticoides é reduzida.

Relativamente à administração tópica de anti-histamínicos, de um modo geral é ineficaz, porém um estudo referente à utilização tópica de clorfeniramina demonstrou ter bons resultados em pôneis com hipersensibilidade à picada dos insetos (Foster *et al.*, 1998; citado por Yu, 2014). As melhores opções para administração tópica com efeito antiprurítico são os sprays, loções ou champôs constituídos por aveia, pramocaina e hidrocortisona (Rees, 2005).

Embora os anti-histamínicos apresentem menos efeitos secundários comparativamente com os glucocorticoides, é preciso ter em consideração as suas propriedades anticolinérgicas, sobretudo em cavalos com glaucoma, arritmias cardíacas ou atonia gastrointestinal (Yu, 2014).

A opção por ácidos gordos essenciais tem vindo a ser estudada como forma de diminuir o prurido, mas apresenta resultados contraditórios (O'Neill *et al.*, 2002). A sua utilização tem um efeito aditivo antiprurítico quando combinado com corticosteroides ou anti-histamínicos (Rees, 2005).

Uma das medidas que tem vindo a ser desenvolvida conjuntamente com o aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico é a imunoterapia alérgico-específica. Os resultados demonstrados na sua utilização têm sido bastante contraditórios no tratamento da hipersensibilidade aos culicídeos (Yu, 2014). Por exemplo, Anderson *et al.* (1996) verificaram uma resposta positiva de 90%, após um ano de tratamento. Contrastando com este estudo, Ginel *et al.* (2014) mostraram que a sua utilização durante o mesmo período não apresentou qualquer benefício (Ginel *et al.*, 2014).

Alguns estudos mostraram que, no caso da hipersensibilidade aos culicídeos, as inoculações intralinfáticas constituem uma alternativa mais eficaz comparativamente com a via subcutânea, sendo que a tolerância imunitária é adquirida de forma mais rápida e com um menor número de injeções. A eficácia da aplicação sublingual, comumente utilizada na imunoterapia

alergénio-específica em humanos, também tem vindo a ser avaliada na prática veterinária, neste caso em particular, nos cavalos (Jonsdottir *et al.*, 2019).

Outra opção terapêutica que foi recentemente desenvolvida tem que ver com a utilização de vacinas constituídas por partículas virais que induzem a produção de anticorpos contra as citocinas IL-5 e IL-31, que conseqüentemente origina uma diminuição na concentração sérica de eosinófilos e uma redução do prurido associado (Jonsdottir *et al.*, 2019).

2.2.5. Prevenção

No que diz respeito à prevenção, a medida mais efetiva consiste em evitar o contato com os alergénios causadores de doença alérgica. No caso da hipersensibilidade aos culicídeos, esta prevenção envolve manter os cavalos estabulados durante o início e o fim do dia, que correspondem às duas alturas preferenciais de alimentação dos culicídeos (Wagner, 2014). O facto dos culicídeos adultos serem maus voadores, sugere que a instalação de ventilação adequada no interior dos estábulos seja igualmente uma medida de prevenção a ter em conta.

Algumas medidas de prevenção adicionais podem também ser tomadas, incluindo o controlo de insetos através da utilização de pulverizadores ou *sprays* repelentes, máscaras ou coberturas de corpo inteiro (Wagner, 2016).

Os repelentes inseticidas mais tradicionalmente usados pertencem à família piretróide, como são exemplo a permetrina e a ciperpermetrina. A sua eficácia tem vindo a ser investigada, sendo possível verificar que apresentam resultados variáveis, possivelmente pela diferente suscetibilidade entre diferentes espécies de insetos (Bourdeau *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2010; citados por Yu, 2014). A frequência da aplicação tópica dos repelentes ou inseticidas está dependente do produto escolhido, distribuição geográfica dos insetos, altura do ano e da severidade da condição clínica (Yu, 2014).

Como forma de diminuir o prurido, minimizar possíveis infeções secundárias e acelerar o processo de recuperação é recomendável evitar que cavalos afetados se mantenham próximos de superfícies rugosas que permitam que o animal se coce (Wagner, 2016).

A imunoterapia alergénio-específica também tem vindo a ser estudada como opção profilática em cavalos que apresentem um elevado um risco de sensibilização, como é o caso da raça *Icelandic*, ou em cavalos que apesar de não apresentarem manifestação clínica, têm níveis séricos de IgE específica, aumentados (Jonsdottir *et al.*, 2019).

2.2.6. Prognóstico

A Hipersensibilidade aos culicídeos não tem cura inequivocamente reconhecida e apresenta tendência para se desenvolver durante a época veranil, ou sempre que o cavalo se encontre exposto à fonte alérgica. Em alguns casos, os sinais clínicos podem ser mais severos ao longo do tempo. A recidiva dos sinais clínicos pode não ocorrer, caso seja feita uma total prevenção da exposição ao agente alérgico durante um longo período (Wagner, 2016).

A implementação de um plano terapêutico multimodal conjuntamente com a tomada de medidas preventivas, é a forma mais eficaz para uma diminuição sintomática da hipersensibilidade aos culicídeos (Yu, 2014).

2.3. Doença Atópica Equina

A doença atópica equina não está tão bem caracterizada como no homem e nas outras espécies domésticas. Tal como as outras espécies, a doença começa por ser sazonal, e vai progredindo de modo a durar todo o ano, com máximos de intensidade sazonais. Porém, esta doença alérgica poderá não ser sazonal, uma vez que depende dos agentes alérgicos envolvidos (Rosenkrantz & White, 2014).

De um modo geral, a doença atópica é considerada uma condição de base genética, com elevada heritabilidade, associada à produção de IgE específicas contra alérgenos de fontes ambientais, como os pólenes e os ácaros do pó doméstico (Jensen-Jarolim *et al.*, 2015).

2.3.1. Etiopatogenia

No passado admitia-se que os mecanismos imunológicos envolvidos na atopia se limitavam à produção de IgE alérgeno-específicas e posterior ligação aos recetores FcεRI à superfície dos mastócitos e basófilos (Fadok, 2013). Contudo, as IgG alérgeno-específicas também parecem participar na patogénia da dermatite atópica.

Teoricamente, as proteínas alérgicas eram inaladas e, de alguma forma, transportadas para a pele e membranas mucosas, onde se ligariam aos complexos IgE-mastócito (Fadok, 2014). Como abordado no ponto 1.10, o processo resultaria na libertação de histamina, bem como de outros mediadores inflamatórios.

Embora este processo imunológico ocorra, atualmente é entendido que a patogénia associada à doença atópica, que envolve uma série de doenças alérgicas caracterizadas pela hiperreactividade a diferentes alérgenos de fontes ambientais, é bastante mais complexa.

Como anteriormente descrito, a ocorrência de defeitos na barreira epitelial é sugerida como explicação para a absorção cutânea de proteínas alérgicas, que são posteriormente transportadas pelas células dendríticas até aos linfócitos T. Uma vez que os linfócitos T sejam ativados, e atendendo que a resposta imunitária é maioritariamente mediada por linfócitos Th2, é induzida a produção de IgE e uma variedade de citocinas, tais como IL-6, IL-13 e IL-31. A ausência de inibição pelos linfócitos Treg está igualmente incluída no processo alérgico, apesar de ainda não ser claro se a diminuição da ação dos linfócitos Treg configure uma causa ou uma consequência da doença (Fadok, 2014).

Adicionalmente, ocorre uma interação complexa entre os sistemas imunológico e nervoso, que promove a sensação de prurido. A IL-31, citocina secretada pelos linfócitos Th2, estimula diretamente o prurido através da sua ligação aos recetores das fibras nervosas. No entanto, é de assinalar, que existem outros mediadores responsáveis pelo aumento da intensidade prurítica

(ex.: histamina, proteases, substância P e opióides). Ao longo do tempo, a doença alérgica evolui para uma condição crônica, passando a ser mediada pelos linfócitos Th1, com uma predominância da citocina TNF- α .

Resumidamente, a doença atópica equina, mais especificamente a dermatite atópica, surge na sequência da produção de IgE alérgico-específica, num desequilíbrio entre a quantidade de linfócitos Th2 e Th1, e na existência de um defeito na barreira epitelial, que propicia a absorção de alérgenos através da pele (Fadok, 2013).

2.3.2. Dermatite Atópica

A dermatite atópica em cavalos é reconhecida como uma potencial causa de prurido (White, 2005) o qual, que contrariamente à maioria das espécies, não ocorre na generalidade dos casos. Quando presente, o prurido, normalmente apresenta-se na face, região distal dos membros e tronco (Figura 12), podendo também ser mais generalizado e apresentar um padrão de distribuição similar ao da hipersensibilidade à picada dos insetos.

Tipicamente, cavalos com dermatite atópica apresentam pápulas, eritema, alopecia e urticária (Rosenkrantz & White, 2014). A urticária é caracterizada por lesões que afetam vastas áreas do corpo, podendo surgir em várias localizações e de múltiplas formas (Wagner, 2016). As lesões de urticária por vezes são severas, sem prurido associado, e podem estar associadas a edema ventral, como ilustrado na Figura 13. Caso ocorra prurido intenso, poderão ser evidentes lesões secundárias (Rosenkrantz & White, 2014).

O desenvolvimento de urticária recorrente poderá estar associado à exposição a alérgenos alimentares, insetos ou alérgenos ambientais. Por outro lado, a urticária aguda ocorre como resposta à administração de fármacos ou vacinas, e a transfusões sanguíneas (Wagner, 2016).

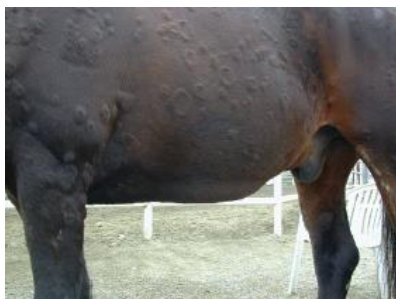


Figura 13 – Edema ventral e urticária severa associados a dermatite atópica (adaptado de Rosenkrantz & White, 2014)



Figura 12 – Dermatite atópica com um padrão de distribuição lesional clássico na face, membros e tronco (adaptado de Rosenkrantz & White, 2014)

A dermatite atópica pode estar implicada RAO ou na doença inflamatória das vias aéreas (IAD) (Rosenkrantz & White, 2014). Segundo alguns autores, a hipersensibilidade aos insetos e a alérgenos ambientais pode ocorrer no mesmo animal (Stepnik *et al.*, 2011).

Para o diagnóstico de dermatite atópica é fundamental ter em conta os sinais clínicos apresentados e a exclusão de outros diagnósticos diferenciais, especialmente da hipersensibilidade aos culicídeos (White, 2005).

2.3.3. Hipersensibilidade Alimentar

Atualmente, apesar de ser reconhecida a ocorrência de afeção cutânea associada a alergia alimentar, ainda pouco se sabe sobre a sua prevalência, patogenia e potenciais agentes causadores (Fadok, 2014).

Alguns estudos sugeriram que cavalos com hipersensibilidade alimentar poderiam desenvolver urticária recorrente e prurido anal ou generalizado, mediados pela produção de IgE alérgico-específica, porém ainda não é totalmente claro (Francqueville & Sabbah, 1999; Francqueville & Sabbah, 2004; citados por Fadok, 2013). A aveia, o milho, a luzerna e o alho foram alguns dos alimentos descritos como potenciais agentes causadores de alergia alimentar em cavalos (Miyazawa *et al.*, 1991; Hallebeek & Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1995; citados por Fadok, 2013). O trigo tem sido igualmente apontado como um possível agente alergizante (Pali-Schöll *et al.*, 2017).

Como já referido no ponto 1.10, existem algumas evidências relativas à origem das respostas imunológicas se dever a uma ruptura da barreira mucosa, o que poderá constituir uma causa de alergia alimentar.

Embora, nos cavalos, o conhecimento relativamente aos mecanismos imunológicos envolvidos seja escasso, é sabido que a alergia alimentar humana pode ser mediada por respostas imunitárias humorais ou celulares (Fadok, 2014). Muitos dos mecanismos que medeiam a atopia cutânea da pele e do trato respiratório têm sido demonstrados no trato gastrointestinal, suspeitando-se assim da ação dos linfócitos Th2 na alergia alimentar equina (Kim & Sampson, 2012; citados por Fadok, 2013).

De forma a identificar o(s) alimento(s) causador(es) de hipersensibilidade alimentar é recomendável a verificação do tipo de dieta do animal, bem como a realização de testes de provocação alimentar (Fadok, 2013).

Uma vez que é sugerido que o estabelecimento de tolerância imunológica está relacionado com a microflora intestinal, a utilização de probióticos tem mostrado também ser benéfica na prevenção de alergia alimentar (Gigante *et al.*, 2011; citados por Fadok, 2014).

2.3.4. Diagnóstico

Para um correto diagnóstico de dermatite atópica será necessário levar em conta o histórico clínico do animal, os sinais clínicos apresentados e a exclusão de outros diagnósticos diferenciais (Rosenkrantz & White, 2014), especialmente a hipersensibilidade aos culicídeos (White, 2005).

Os testes intradérmicos e os testes sorológicos constituem métodos de diagnóstico válidos para a doença atópica equina (Rosenkrantz & White, 2014), mas também poderão ser úteis na identificação de espécies alérgicas passíveis de serem incluídas na imunoterapia alérgico-específica (White, 2005).

A realização de testes intradérmicos (Figura 14), como já referido, continua a ser o *gold standard* no diagnóstico, tanto de doença atópica equina como da hipersensibilidade aos culicídeos (Liphook Equine Hospital, 2016).

Nos TID deverão ser incluídos extratos alérgicos correspondentes a diferentes ácaros, pólenes e fungos potencialmente desencadeadores de quadro clínico (Rosenkrantz & White, 2014). Neste painel, será aconselhável a inclusão de um extrato alergénico correspondente aos *Culicoides spp.*, uma vez que por vezes o padrão lesional dermatológico de dermatite atópica é similar ao da hipersensibilidade aos culicídeos (Rosenkrantz & White, 2014). Note-se também que as duas condições alérgicas não são mutuamente exclusivas (Lebis *et al.*, 2002).



Figura 14 – Realização de teste intradérmico com diferentes extratos alergénicos

A alternativa aos TID são os testes sorológicos, que apresentam uma eficácia duvidosa. Tal como abordado no ponto 2.2.3, estes testes *in vitro* apresentam fragilidades devido à baixa especificidade dos reagentes anti-IgE, à participação da IgG nas reações alérgicas (Wagner *et al.*, 2006), à falta de critério entre os diferentes laboratórios e à formulação de extratos alérgicos de baixa qualidade.

A maioria dos laboratórios utilizam reagentes constituídos por anticorpos policlonais anti-IgE, nos testes sorológicos. Porém, a especificidade e afinidade destes reagentes é algo variável entre os diferentes laboratórios (Rosenkrantz & White, 2014), além de que os reagentes constituídos pela cadeia humana FcεRIα mostraram uma maior eficácia e correlação com os resultados verificados nos TID (Lorsch *et al.*, 2001c).

Atualmente, não existe nenhum método de diagnóstico *in vitro* ou *in vivo* indicado para os casos de alergia alimentar em equinos. A única forma referida para o seu diagnóstico passa pela alteração da dieta ou através de testes de provocação alérgica, de modo a que seja possível identificar o agente alimentar responsável (Rosenkrantz & White, 2014).

2.3.5. Prevenção e Tratamento

A doença atópica equina é comumente considerada uma alergia crónica e que, por isso, exige a tomada de medidas preventivas e/ou terapêuticas que perduram toda a vida do animal. Estas medidas incluem medicação sistémica, seja através da opção por glucocorticoides, anti-histamínicos ou da combinação entre eles, assim como de medicação tópica e evicção alergénica (Stepnik *et al.*, 2011).

Idealmente, a prevenção da exposição aos alergénios constitui a melhor forma de evitar as reações de hipersensibilidade. A mudança para um ambiente completamente diferente, em alguns casos, poderá ser a melhor opção, o que, na maioria das vezes, não é logisticamente viável (Rosenkrantz & White, 2014).

Apesar de não ser possível eliminar totalmente os ácaros do pó e os fungos ambientais, podem ser tomadas algumas medidas preventivas, que reduzem substancialmente a sua quantidade. A substituição do material das camas por tapetes de borracha ou aparas (Fleming *et al.*, 2008) e a disponibilização de alimento de baixa pulverulência, através do humedecimento da forragem ou pela opção por ração granulada (Kirschvink *et al.*, 2002) são algumas dessas medidas.

Na prevenção da exposição, tanto aos ácaros de armazenamento (*Tyrophagus*, *Blomina*, *Acarus*), como aos ácaros do pó (*Dermatophagoides farinae* e *D. pteronyssinus*), inclui-se (Rosenkrantz & White, 2014):

- Lavagem dos cobrejões com água bem quente (>55°C), já que concentram grandes quantidades de ácaros do pó;
- utilização de produtos acaricidas nos estábulos antes da mudança das camas e
- caso seja possível, colocação do cavalo *a campo*.

O tratamento sintomático sistêmico, caso necessário, é em tudo semelhante ao tratamento sintomático da hipersensibilidade aos culicídeos. Aqui se incluem, os anti-histamínicos já apresentados na Tabela 5, os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os glucocorticoides, que são regularmente requeridos nos casos de dermatite atópica. Os anti-histamínicos e os ADT têm uma menor probabilidade de provocar efeitos secundários, comparativamente aos glucocorticoides, embora apresentem menor eficácia terapêutica (Rosenkrantz & White, 2014).

As dosagens dos glucocorticoides estão dependentes da severidade do quadro clínico apresentado. Na maioria dos casos, é necessário um período de introdução com duração de sete a 14 dias, seguido de um período de redução (duas a cinco semanas), e por fim um período de manutenção que poderá durar alguns meses ou por tempo indefinido, dependendo da severidade e sazonalidade do caso clínico (Rosenkrantz & White, 2014). A prednisolona e a dexametasona são os mais utilizados, de acordo com o que foi referido no ponto 2.2.4.

A opção por inibidores da fosfodiesterase, como a pentoxifilina (Samlaska & Winfield, 1994; Marks *et al.*, 2001; citados por Rosenkrantz & White, 2014), e pela suplementação com ácidos gordos no tratamento sintomático de dermatite atópica, são também válidas já que apresentam alguma ação anti-inflamatória (King *et al.*, 2008).

O tratamento tópico deve ser realizado com o objetivo de providenciar um efeito hidratante e antiprurítico, capaz de melhorar a integridade da barreira epidérmica. A seleção de produtos tópicos, como são exemplo os champôs, deve ter em conta a condição clínica de pele do animal.

Na maioria dos casos, os champôs optados devem incluir produtos coloidais constituídos por aveia, com ou sem ação anestésica local (cloridrato de pramoxina). Alguns poderão incluir também glucocorticoides, para um maior controlo do prurido, ou agentes antimicrobianos, como o peróxido de benzoílo e a clorexidina, essenciais nos casos em que ocorre infeção secundária.

Embora ainda não seja totalmente claro, acredita-se que os duches, mesmo sem aplicação de champôs, favorecem a remoção e redução da concentração de alérgenos na superfície da pele, que não só contribuem para o aumento da sua hidratação, como também minimizam a absorção percutânea. Em particular, acredita-se que os duches de água fria reduzem o prurido (Rosenkrantz & White, 2014).

2.3.6. Imunoterapia Alérgico-específica

Uma boa parte das opções terapêuticas acima descritas, originam reações adversas e apresentam limitações em cavalos de alta competição. O controle ambiental, com o objetivo de evitar a exposição aos alérgenos, apesar de ser a melhor forma de prevenir o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade, também apresenta, em certos casos, algumas limitações práticas (Rosenkrantz & White, 2014).

Atendendo às limitações inerentes a estas opções terapêuticas, a imunoterapia alérgico-específica (ASIT) tem-se revelado uma alternativa válida no tratamento da dermatite atópica equina (Scott & Miller, 2011). A sua utilização pode ser alargada também aos casos de hipersensibilidade aos culicídeos (Yu, 2014). Porém, como referido no ponto 2.2.4, existe uma fraca evidência quanto à sua eficácia nestes últimos, sobretudo pela falta de qualidade dos extratos alérgicos, que na sua grande maioria, incluem apenas uma pequena fração de proteínas antigénicas que têm efetiva implicância no desenvolvimento de sensibilização e alergia clínica (Jonsdottir *et al.*, 2019).

As maiores vantagens da utilização da ASIT estão relacionadas com a escassa associação a efeitos secundários, e com o facto de originar tolerância imunitária. A ASIT permite assim que os cavalos em causa sejam expostos a grandes quantidades de alérgenos, sem que por isso desenvolvam algum tipo de sintomatologia compatível com hipersensibilidade (Rosenkrantz & White, 2014).

Para uma correta identificação dos alérgenos que deverão ser incluídos na ASIT, é fundamental ter em consideração os resultados obtidos nos TID e/ou nos testes sorológicos (White *et al.*, 2005). Alguns autores preferem combinar os resultados obtidos em ambos, apesar de não se ter verificado qualquer diferença entre os mesmos (Stepnik *et al.*, 2011).

A maioria dos autores refere que 60 a 71% dos cavalos que realizam ASIT baseada nos resultados obtidos nos TID, apresentam uma melhoria clínica significativa (Fadok, 2003; Rees, 2001; Scott & Miller, 2011). Radwanski *et al.* (2011) sugeriram que esta eficácia no tratamento da dermatite atópica equina poderá resultar da redução da concentração sérica de IgE e IgG alérgico-específica. Alguns estudos revelaram uma taxa de sucesso bastante superior, porém os seus resultados pareceram sobrestimar os benefícios da imunoterapia (Tallarico & Tallarico, 1998; Stepnik *et al.*, 2011).

Geralmente, a eficácia do tratamento da dermatite atópica com ASIT deverá ser avaliada no prazo mínimo de um ano, sendo que a maioria dos cavalos apresenta uma melhoria clínica

notória nos primeiros seis meses de tratamento (Rees, 2001; White, 2005). Excepcionalmente, foi possível verificar uma melhoria clínica logo aos dois meses (Rees, 2001).

A maioria dos cavalos requiere injeções subcutâneas com sete a 14 dias de intervalo e com um volume variável, de 0,5 – 1 mL. As injeções são realizadas no terço médio da tábua do pescoço, sendo que as reações adversas são relativamente raras e quando presentes resolvem-se no prazo de um a dois dias (Rosenkrantz & White, 2014).

Normalmente, cavalos que respondam positivamente ao tratamento necessitam de continuar as injeções durante o resto da sua vida, podendo eventualmente reduzir a frequência da administração (uma a três vezes por mês) (White, 2005). No entanto, já se verificou que nem sempre os sinais clínicos recidivam após descontinuação da ASIT (Stepnik *et al.*, 2011).

Em suma, a imunoterapia alérgico-específica constitui um método seguro e razoavelmente efetivo, com aproximadamente 60% de eficácia como tratamento único. Quando optado como terapêutica adicional a taxa de sucesso é bastante superior (Stepnik *et al.*, 2011).

2.4. Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (RAO)

A RAO ou *heaves*, como correntemente designada, ou também, obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) é uma condição comum em cavalos estabulados, caracterizada por hipersensibilidade mediada por inflamação neutrofílica, associada a obstrução das vias respiratórias inferiores (Pirie, 2013).

A RAO ocorre sobretudo em cavalos suscetíveis, expostos a feno e palha de má qualidade (Tahon *et al.*, 2009). Caracteristicamente, cavalos com RAO apresentam dificuldade respiratória, mesmo quando em repouso (Tizard, 2013). Mais comum em países de clima temperado durante a época de inverno, pode também ocorrer durante a época de verão, em cavalos mantidos no exterior, designando-se, nestes casos, por doença pulmonar obstrutiva associada à pastagem de verão ou *summer pasture-associated obstructive pulmonary disease* (SPAOP) (Bullone & Lavoie, 2016). No entanto, as duas doenças não são mutuamente exclusivas, pois podem ser observadas no mesmo cavalo (Dixon & McGorum, 1990; citados por Bullone & Lavoie, 2016).

Além da RAO, existe uma outra doença pulmonar crónica que ocorre em cavalos, que dá pelo nome de doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) ou *inflammatory airway disease* (IAD). Ambas são formas de bronquiolite crónica associada a exposição a fungos e alérgenos aerógenos. A IAD normalmente afeta cavalos de qualquer idade, enquanto que a RAO afeta sobretudo cavalos mais velhos, porém as suas diferenças serão referidas mais adiante (Tizard, 2013).

2.4.1. Sinais Clínicos

De um modo geral, cavalos com RAO apresentam tosse seca ocasional ou paroxística, aumento do esforço e frequência respiratória, e por vezes descarga nasal serosa ou mucopurulenta, uni ou bilateral (Figura 15) (Bullone & Lavoie, 2016). A tosse ocorre perante a exposição aos alérgenos, no início do exercício, durante o repouso, e pode ser facilmente induzida mediante o teste reflexo da tosse (Christmann, 2008; citado por Tilley, 2011).



Figura 15 – Descarga nasal serosa bilateral

Em casos severos, o cavalo encontra-se com a cabeça na extensão do pescoço (atitude ortopneica) com as narinas dilatadas e um marcado esforço respiratório abdominal (dispneia expiratória com incremento da componente abdominal). Este esforço adicional pode ser confirmado pela observação de movimentos craniocaudais do ânus, que estão sincronizados com a respiração. O intenso e continuado esforço respiratório durante a expiração pode levar a hipertrofia do músculo oblíquo externo do abdómen, originando assim a designada *heave line* (Bullone & Lavoie, 2016), como se encontra representada na Figura 16.

Cavalos com sinais clínicos moderados, geralmente não apresentam sinais sistémicos, contrariamente a cavalos severamente afetados que podem exibir febre, anorexia e perda de peso. Nestes casos, é provável que se desenvolva taquicardia e hipertensão pulmonar, que desaparecem com a remissão da doença (Bullone & Lavoie, 2016).

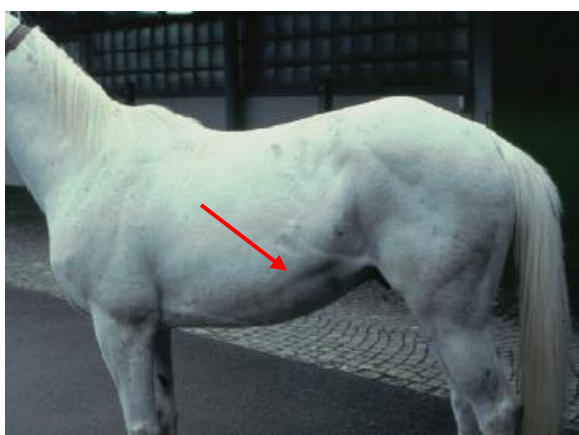


Figura 16 – *Heave line* típica de cavalos severamente afetados com obstrução recorrente das vias aéreas (adaptado de Gerber, 2014)

Tipicamente, cavalos com RAO demonstram intolerância ao exercício e necessitam de um maior tempo de recuperação (Christmann, 2008; citado por Tilley, 2011). Esta poderá ser uma das explicações para cavalos de desporto com baixa performance desportiva (Rivero *et al.*, 2008). Mesmo no decorrer da remissão da doença, é comum que mantenham essa intolerância, e concomitantemente manifestem episódios de tosse durante a alimentação ou o trabalho (Bullone & Lavoie, 2016).

2.4.2. Etiopatogenia

A RAO é frequentemente originada pela exposição repetida a alérgenos ambientais sejam eles pólenes, fungos ou ácaros. A sensibilização aos fungos, nomeadamente *Aspergillus fumigatus* (Tilley *et al.*, 2010) e *Alternaria alternata* (Tahon *et al.*, 2009) parecem ser as espécies alérgicas mais relevantes para cavalos afetados.

Ao longo dos anos têm sido investigados os possíveis fatores predisponentes e os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento de doença pulmonar crónica, incluindo a inflamação e obstrução das vias aéreas. Como resultado, foi verificado o seguinte:

- A RAO é uma doença multifatorial, com predisposição hereditária (Gerber *et al.*, 2008);
- de acordo com a maioria dos autores, a RAO é raramente diagnosticada antes dos seis ou sete anos de idade (Gerber, 2014) e não apresenta predisposição para sexo ou raça (Ramseyer *et al.*, 2007; Robinson, 2007); contudo, alguns autores sugeriram um maior risco de desenvolvimento da doença nas fêmeas comparativamente com os machos, bem como uma maior prevalência em certas raças (Marti *et al.*, 1991; Couëtil & Ward, 2003);
- cavalos com RAO apresentam um maior risco de desenvolver hipersensibilidade à picada dos insetos e urticária (Lanz *et al.*, 2017; Verdon *et al.*, 2018) como, por outro lado, parecem ser menos suscetíveis a parasitoses, mais particularmente a estrogilídeos intestinais (Neuhaus *et al.*, 2011; citado por Gerber, 2014);
- a probabilidade de diagnóstico de RAO é bastante superior durante o inverno; no entanto, este resultado pode ser explicado pelo facto de a maioria dos cavalos se encontrarem estabulados nesta época do ano (Couëtil & Ward, 2003).

Os mecanismos imunológicos que conduzem a disfunção e à inflamação na RAO não são totalmente conhecidos, contudo os resultados de vários estudos indicam o envolvimento de reações de hipersensibilidade (Robinson *et al.*, 1996; citados por Pirie, 2013). Apesar de num modo geral, a RAO ser considerada uma doença alérgica provocada pela exposição a alérgenos ambientais aerógenos, os mecanismos imunológicos envolvidos parecem ser bastante mais complexos, comparativamente com outras doenças alérgicas (Art *et al.*, 2008; citados por Pirie, 2013).

A função dos mastócitos na RAO permanece pouco clara. Embora cavalos com RAO não apresentem uma quantidade significativa de complexos IgE-mastócito no tecido pulmonar (Van der Haegen *et al.*, 2005; citados por Pirie, 2013) ou no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) (Kunzle *et al.*, 2007; citados por Pirie, 2013), apresentam uma quantidade significativa de mastócitos na parede brônquica. No entanto, contrariamente à asma alérgica humana, que se caracteriza por uma reação de hipersensibilidade de tipo I, os casos de RAO falham em demonstrar um aumento da concentração de histamina no BALF (McGorum *et al.*, 1993; citados por Pirie, 2013), assim como se verifica uma ausência de broncoespasmo imediato após teste

de provocação alérgica (Deaton *et al.*, 2007; citados por Pirie, 2013). Estas duas evidências indicam a possibilidade de não ocorrer nenhum tipo de resposta imediata em cavalos com RAO.

A função da IgE na RAO é igualmente controversa. Alguns estudos demonstraram um aumento da IgE sérica em cavalos com RAO (Kunzle *et al.*, 2007; citados por Pirie, 2013), enquanto outros sugerem que não tem qualquer influência no desenvolvimento da doença (Schmallenbach *et al.*, 1998; citados por Pirie, 2013). Assim como nas outras doenças alérgicas, também tem sido discutida a participação de algumas subclasses de IgG na RAO (Jensen-Jarolim *et al.*, 2015).

Vários estudos sugerem que a obstrução recorrente das vias aéreas é predominantemente caracterizada por uma reação de hipersensibilidade retardada, que resulta no recrutamento neutrofílico para as vias aéreas e no aumento dos linfócitos Th no BALF (Kleiber *et al.*, 1999; citados por Pirie, 2013), mas não no soro (Watson *et al.*, 1997; citados por Pirie, 2013).

Recentemente, tem sido investigado o perfil das citocinas envolvidas na RAO, de modo a entender se esta doença de base alérgica é predominantemente mediada por linfócitos Th1 ou Th2. Os resultados dessas investigações, porém, revelaram ser inconsistentes. Como exemplo, certos estudos demonstraram um aumento da expressão da IL-4 e IL-5 e uma diminuição da expressão do interferão-gama (IFN- γ), suportando assim a teoria de que a RAO era sobretudo mediada por linfócitos Th2 (Cordeau *et al.*, 2004; citados por Pirie, 2013). No entanto, outros estudos sugeriram uma predominância de linfócitos Th1 (Ainsworth *et al.*, 2003; citados por Pirie, 2013), uma predominância mista (Horohov *et al.*, 2005; citados por Pirie, 2013) ou um perfil de citocinas inconsistente com a ação de qualquer dos dois tipos de linfócitos, tendo já sido sugerida a atuação dos linfócitos Th17 ou dos linfócitos Treg (Pirie, 2013).

Embora não haja unanimidade quanto à precisão dos mecanismos imunológicos envolvidos, é claro que os linfócitos Th parecem desempenhar um papel central na patogênese da RAO. A principal consequência da ativação dos linfócitos Th é o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas (Pirie, 2013).

Além da ação dos linfócitos Th, as endotoxinas presentes em ambientes poeirentos têm demonstrado atuarem sinergicamente com outras partículas fúngicas na agudização da doença alérgica, originando assim uma resposta imunitária não específica (Bullone & Lavoie, 2016).

Os mecanismos imunológicos e inflamatórios envolvidos na RAO, além de colaborarem para o recrutamento de neutrófilos, também resultam em alterações nas pequenas vias aéreas, como são exemplo: broncospasmo, hipersecreção de muco, espessamento da parede das vias aéreas, hiperplasia do músculo liso e infiltração peribronquiolar com células inflamatórias (Pirie, 2013).

Relativamente à SPAOP, pensa-se que os mecanismos imunológicos envolvidos serão os mesmos que na RAO. Esta suspeita deve-se ao facto de ambas as doenças alérgicas,

apresentarem um quadro clínico e um perfil inflamatório neutrofílico idêntico, apesar das fontes alérgicas desencadeantes do processo alérgico serem distintas (Bullone & Lavoie, 2016).

2.4.3. Diagnóstico

Geralmente, o diagnóstico pode ser realizado com base na história clínica do animal, de acordo com os sinais clínicos apresentados (Gerber, 2014). Cavalos com RAO possuem tipicamente história de tosse crônica, frequentemente sazonal, estabulação e alimentação com feno. Esta condição é normalmente recorrente ano após ano (Lavoie, 2007; citados por Tilley, 2011).

Alguns autores propõem a utilização de sistemas de classificação clínica, baseados no grau do esforço respiratório realizado pelo cavalo durante o repouso, o que configura uma vantagem na verificação da eficácia do tratamento instituído, mas que não permite uma distinção clara entre cavalos saudáveis e cavalos com RAO em remissão clínica (Pirie *et al.*, 2001; citados por Bullone & Lavoie, 2016).

O exame clínico, em particular a auscultação torácica, dependendo da severidade da obstrução das vias aéreas inferiores, constitui um método bastante útil para despiste de sons respiratórios anormais. Porém, a retenção de ar e a obstrução severa das vias aéreas podem dificultar a auscultação torácica (Bullone & Lavoie, 2016).

A auscultação pulmonar pode revelar sibilos expiratórios no final da expiração, resultantes do estreitamento progressivo das vias aéreas (brôncoespasmo), e crepitações inspiratórias no início da inspiração, conseqüentes da abertura repentina das mesmas, já que colapsaram durante a expiração (Pirie, 2013). De igual forma, é possível verificar um aumento de intensidade do murmúrio vesicular (Tilley, 2011), assim como um aumento da área de auscultação pulmonar durante a percussão torácica (Bullone & Lavoie, 2016).

Todos estes sons pulmonares podem ser exacerbados através do aumento do esforço respiratório, com o auxílio de um saco, produzindo um efeito prévio semelhante ao de apneia, como se encontra representado na Figura 17 (Christmann, 2008; citado por Tilley, 2011).

Em alguns casos torna-se necessário a realização de testes de diagnóstico complementares para confirmação de RAO, tais como (Gerber, 2014):

- Casos com uma história clínica pouco clara e sinais clínicos leves a moderados (podendo eventualmente estar em remissão);
- casos refratários ao tratamento padrão;



Figura 17 – *Rebreathing examination*, vulgarmente conhecido como “teste do saco”, é um dos métodos de diagnóstico essenciais para deteção de sons pulmonares

- casos em que a eficácia do plano terapêutico optado fica aquém do objetivo estabelecido.

A endoscopia constitui o primeiro método de diagnóstico complementar para avaliação das vias aéreas superiores, sendo igualmente vantajoso na avaliação das vias aéreas inferiores (Tilley, 2011). Esta opção diagnóstica, permite a observação de algumas alterações, como a inflamação da mucosa e o espessamento da carina consequente a edema tecidual, como pode ser observado na Figura 18 (Koblinger *et al.*, 2011; citados por Bullone & Lavoie, 2016). Apesar de ser uma opção válida de diagnóstico, a endoscopia por si só, revela achados não específicos de RAO (Bullone & Lavoie, 2016).

A partir da endoscopia respiratória é possível também confirmar a existência de acumulação de muco traqueal e brônquico, em que mediante a colheita de amostras para avaliação citológica no BALF, após lavagem traqueal ou broncoalveolar (BAL), observando-se a percentagem neutrofílica (Allen & Franklin, 2009).

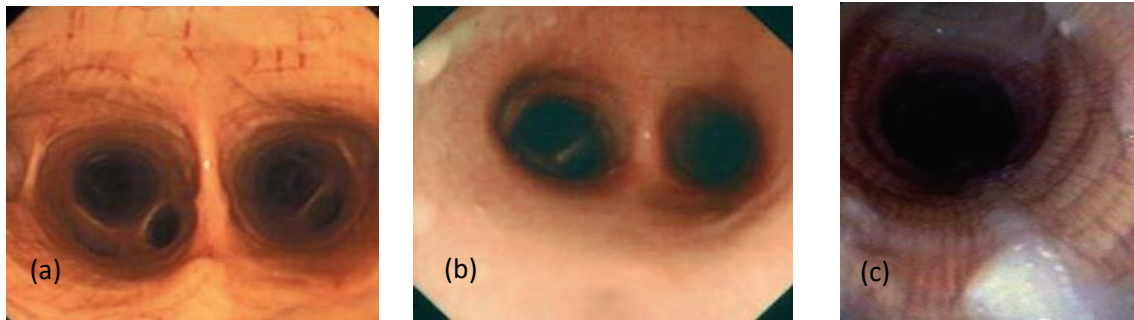


Figura 18 – Imagens de endoscopia respiratória, em que se pode observar: (a) carina adelgada e brônquios dilatados, típico de cavalos saudáveis e de cavalos com IAD; (b) carina espessada, brônquios estreitados e inflamação da mucosa respiratória, típico de cavalos com RAO (adaptado de Allen & Franklin, 2009); (c) Acumulação excessiva de muco traqueal (adaptado de Gerber, 2014)

Ainda que as análises citológicas de lavados traqueais, forneçam informações relevantes quanto ao grau de inflamação das vias aéreas inferiores, a análise citológica de líquido recolhido após lavagem broncoalveolar (BAL) é o principal modo para confirmação de RAO (Pirie, 2013). A explicação para esta preferência reside no facto de ser possível verificar uma marcada neutrofilia no lavado traqueal, mas não no BALF, ou seja, pode ocorrer inflamação traqueal sem que ocorra inflamação das vias aéreas inferiores (Tilley, 2011).

Em cavalos saudáveis a maioria da população celular presente no BALF consiste em macrófagos alveolares (60%) e linfócitos (35%). As outras células presentes são neutrófilos (<5%), eosinófilos (0,1%), mastócitos (<2%) e células epiteliais, porém a sua quantidade é negligenciável (Allen & Franklin, 2009). A presença de inflamação neutrofílica (>20% de neutrófilos na citologia do lavado broncoalveolar) concomitantemente com a exacerbação do quadro clínico, é um achado característico de RAO. Apesar da sua relevância clínica, a neutrofilia existente na citologia do BALF não constitui um achado específico de RAO, uma vez que, cavalos saudáveis que se encontrem estabulados e alimentados com feno podem também apresentar

um aumento na percentagem de neutrófilos no BALF. Contudo, a neutrofilia em cavalos saudáveis tende a ser menos severa e sugere ser autolimitante (Bullone & Lavoie, 2016).

Além da neutrofilia característica, cavalos com RAO apresentam uma diminuição na percentagem de linfócitos e macrófagos alveolares no BALF (Couëtil *et al.*, 2007; citados por Tilley, 2011). Um estudo realizado por Benedice *et al.* (2008) demonstrou que o início de tosse coincide com um aumento da quantidade de neutrófilos acima dos 5%, por outro lado, Hoffman *et al.* (1998) constataram uma forte associação entre a percentagem de mastócitos, e a hiper-reatividade das vias aéreas (broncospasmo, espessamento da parede das vias respiratórias e perda de complacência pulmonar) (Tilley, 2011).

O estudo radiográfico do tórax constitui um outro método de diagnóstico complementar. Tipicamente, pode ser identificado um aumento do padrão brônquico e intersticial e, em casos mais severos, podem ser identificadas regiões bronquiectásicas, bem como um achatamento da silhueta diafragmática consequente à hiperinflação pulmonar (Bullone & Lavoie, 2016). A principal finalidade da radiografia torácica na investigação de RAO passa pela exclusão de outros diagnósticos diferenciais, sendo provável a existência de uma correlação entre as alterações radiográficas identificadas e a severidade clínica da doença (Bakos, 2008; Tilley, 2011).

No exame ecográfico poderão também ser identificados alguns artefactos especulares difusos, na pleura visceral, que se designam por caudas de cometa (Figura 19) (Bullone & Lavoie, 2016).

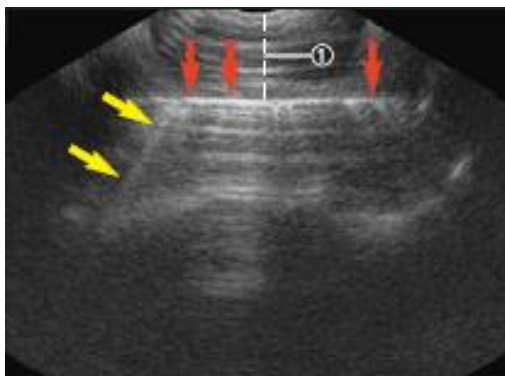


Figura 19 – Imagem ecográfica do tórax (vista transversal). Verifica-se uma linha horizontal hiperecótica representativa da presença de ar no espaço pleural (setas vermelhas). As linhas perpendiculares, abaixo da superfície pulmonar designam-se por caudas de cometa (setas amarelas); (1) Parede torácica (adaptado de Couëtil & Hawkins, 2013)

Quando realizado hemograma e análise bioquímica sanguínea é possível verificar que, de um modo geral, os resultados encontram-se nos limites normais, contudo alguns estudos apontam para um aumento das proteínas séricas e dos marcadores de inflamação sistémica (Lavoie-Lamoureux *et al.*, 2012; citados por Bullone & Lavoie, 2016). A mensuração de gases sanguíneos arteriais poderá ser uma ferramenta útil na avaliação da magnitude do comprometimento das trocas gasosas, e também da resposta ao tratamento. A hipoxemia está normalmente relacionada com a severidade da doença (Tilley, 2011).

A eficácia diagnóstica dos testes intradérmicos (TID) tem sido avaliada em cavalos com RAO, atendendo ao possível envolvimento da IgE e dos mastócitos no desenvolvimento da doença (Bullone & Lavoie, 2016). Num estudo realizado por Lorsch *et al.* (2001b) verificou-se que cavalos com RAO tendem a apresentar mais reações cutâneas positivas, comparativamente com os grupos controlo, 30 minutos e quatro

horas após a inoculação intradérmica dos extratos alergénicos. Esta verificação foi corroborada por Tahon *et al.* (2009), que constataram que a maioria das reações positivas se desenvolviam quatro horas e, por vezes, 24 horas após inoculação intradérmica. Estes resultados sugerem que as reações de hipersensibilidade tardia/retardada terão maior preponderância, do que as reações imediatas no desenvolvimento de RAO (Tahon *et al.*, 2009), tal como já tinha sido referido anteriormente.

Entre estes estudos também é referida uma falha dos testes intradérmicos na diferenciação entre cavalos com RAO e cavalos saudáveis, ou seja, as reações cutâneas positivas parecem refletir a quantidade de alergénios ambientais a que o animal se encontra exposto, sem que por isso desenvolva quadro clínico (Bullone & Lavoie, 2016).

Como alternativa aos TID, Tilley *et al.* (2010) testaram a eficácia dos testes cutâneos por picada (TCP) no diagnóstico de RAO. Neste estudo, os TCP mostraram-se valiosos na identificação dos potenciais desencadeadores de alergia, já que de acordo com os resultados obtidos, registou-se melhoria clínica evidente após a implementação de medidas de evicção adequadas (Tilley *et al.*, 2010).

No que diz respeito aos testes de pesquisa de IgE alergénio-específicas, tanto no soro como no BALF, vários autores referem que não têm qualquer valor diagnóstico, uma vez que não são observadas diferenças significativas entre cavalos com RAO e cavalos saudáveis (Tilley *et al.*, 2012; Tahon *et al.*, 2009; Lorsch *et al.*, 2001b).

2.4.4. Diagnóstico Diferencial: Doença Inflamatória das Vias Aéreas

A doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) ou *inflammatory airway disease* (IAD) pode afetar cavalos de qualquer idade e os sinais clínicos durante o repouso são geralmente subtis. O quadro clínico apresentado inclui baixo desempenho desportivo, intolerância ao exercício e tosse (Tilley, 2011). Em alguns casos, cavalos com IAD podem ser assintomáticos, no entanto, dada a sua inespecificidade, mesmo que os sinais clínicos estejam presentes, são difíceis de interpretar.

Os sinais de intolerância ao exercício são relativamente subtis, incluindo uma maior necessidade de tempo de recuperação após o exercício e um exagerado esforço respiratório durante o trabalho. Durante o repouso, a frequência e o esforço respiratório são passíveis de se encontrarem ligeiramente aumentados. O teste de esforço respiratório pode também revelar um aumento da intensidade dos sons pulmonares à auscultação. Gerber (2014) sugeriu que o corrimento nasal e/ou a tosse ocasional podem representar um risco acrescido de cavalos com IAD poderem desenvolver RAO, no prazo de dois a quatro anos (Gerber, 2014). Na Tabela 6 apresenta-se uma síntese diferencial destas duas doenças respiratórias.

Tabela 6 – Síntese das principais características distintivas da obstrução recorrente das vias aéreas e da doença inflamatória das vias aéreas (adaptado de Tilley, 2011)

	RAO	IAD
Idade	Afeta cavalos com idade igual ou superior a 7 anos	Afeta cavalos de qualquer idade
Etiopatogenia	Hipersensibilidade pulmonar específica a aeroalérgenos	Agentes infecciosos (infecções virais e bacterianas em cavalos jovens), fatores ambientais e imunológicos
Sinais Clínicos	Tosse; aumento significativo da frequência e esforço respiratório	Inespecíficos e limitados; pode incluir baixo rendimento desportivo, intolerância ao exercício e corrimento nasal
Sinais Clínicos (em repouso)	Esforço respiratório evidente	Normalmente subtis
Muco	Acumulação de muco traqueal	Com ou sem acumulação de muco traqueal
Citologia BALF	Neutrofilia marcada (>20%), diminuição da quantidade de linfócitos e macrófagos alveolares	Neutrofilia (<20%), aumento da quantidade de mastócitos, basófilos e eosinófilos

2.4.5. Prevenção e Tratamento

A redução da exposição a alérgenos ambientais (ex.: ácaros, fungos e pólenes) constitui a principal medida para o tratamento de RAO e, atualmente, a única estratégia terapêutica capaz de originar um alívio prolongado do quadro clínico apresentado. Dependendo de cada caso, podem ser aplicadas as seguintes medidas de minimização da exposição alérgica (Gerber, 2014; Bullone & Lavoie, 2016):

- Manutenção do(s) cavalo(s) afetado(s) no pasto, de forma permanente, durante dias a semanas, sem acesso a feno; quando possível, esta medida é a mais eficaz na melhoria dos sinais clínicos e inflamação das vias aéreas;
- melhorar a ventilação nos estábulos a fim de reduzir a inalação de partículas e gases irritantes;
- disponibilizar alimento (composto ou forrageiro) de qualidade, sem vestígios de bolor (Pirie, 2013);
- disponibilização de alimento com a menor pulverulência possível (ex.: ração granulada, substituição do feno pela silagem e feno humedecido de forma extemporânea);
- mudança da cama de forma mais frequente, bem como a substituição das camas de palha por outras alternativas menos pulverulentas, como são exemplo, as aparas de madeira, papel desfiado ou camas de borracha;
- evitar varrer o chão dos estábulos na presença do(s) cavalo(s) e armazenar o feno num local próprio para o efeito.

No caso dos cavalos afetados com SPAOP os agentes alérgicos associados encontram-se no exterior. Assim sendo, o controlo ambiental deve ser realizado no sentido inverso, isto é, através da estabulação do(s) cavalo(s) num local devidamente ventilado e o mais limpo possível. Durante o inverno já não é recomendado manter os cavalos estabulados (Costa *et al.*, 2006; citados por Bullone & Lavoie, 2016).

Quando o controlo ambiental não é passível de ser realizado nas melhores condições pode ser necessário tratamento sintomático temporário ou, em certos casos, ao longo da vida do animal. O tratamento sintomático pode reduzir temporariamente os sinais clínicos, no entanto quando descontinuado, e se o animal se mantiver num ambiente favorável ao desenvolvimento da doença alérgica, os sinais clínicos tornam-se novamente evidentes.

Por outro lado, cavalos com IAD, após controlo ambiental, podem entrar em remissão clínica espontânea dentro de semanas a meses, especialmente quando se trata de cavalos mais jovens. Nestes casos, o tratamento médico também é mais eficaz e a melhoria clínica é mais duradoura do que na RAO.

Dentro dos fármacos com maior eficácia no tratamento de RAO, os corticosteroides são considerados os mais potentes (Leclere *et al.*, 2011; citados por Gerber, 2014). A sua inclusão no plano terapêutico resulta numa melhoria clínica visível no prazo de horas, atingindo o seu máximo uma a duas semanas após o tratamento. Os efeitos na neutrofilia das vias aéreas e na acumulação de muco são menos consistentes. A dexametasona (ex.: 0,05 – 0,1 mg/kg, s.i.d) e a prednisolona (ex.: 1 – 2 mg/kg, s.i.d) são eficazes quando administrados oralmente, e podem ser utilizados durante algumas semanas (Robinson *et al.*, 2003; citados por Gerber, 2014).

Atendendo aos efeitos secundários inerentes à sua utilização, em particular a laminite, podem ser tomados em conta os corticosteroides inalatórios, que apresentam menos efeitos sistémicos. Entre eles estão a fluticasona e a beclometasona, que são usadas no tratamento a longo termo de RAO e também de IAD. Ambas são menos potentes que a dexametasona, podendo ser usadas na prevenção da exacerbação do quadro clínico, ao invés de tratamento primário de cavalos afetados.

Além dos corticosteroides, os anti-inflamatórios não esteroides (AINE's) e os anti-histamínicos são outras opções a ter em conta, porém a sua eficácia é muito reduzida no tratamento de RAO (Gerber, 2014).

Os broncodilatadores são também bastante utilizados no tratamento de RAO. Os β_2 -agonistas são a família de broncodilatadores mais utilizados e com maior eficácia terapêutica. A administração sistémica (ex.: clenbuterol numa dose baixa de 0,8 μ g/kg BID) e inalatória (de curta ação, como albuterol ou fenoterol, ou de longa ação, como o salmeterol) em simultâneo, tem sido descrita por apresentar uma boa eficácia no tratamento (Leclere *et al.*, 2011; citados por Gerber, 2014).

A escolha terapêutica dos broncodilatadores configura uma vantagem, na medida em que atenua de forma imediata os sinais clínicos, dada a sua ação rápida, contudo, raramente constitui opção única. Os corticosteroides são frequentemente combinados com os broncodilatadores, não só por estes últimos terem uma ação rápida, mas também por não possuírem efeito anti-inflamatório (Bullone & Lavoie, 2016). Contrastando com esta afirmação, um estudo mostrou que o clenbuterol garante alguns efeitos anti-inflamatórios (Laan *et al.*, 2006; citados por Bullone & Lavoie, 2016).

A administração sistémica de anticolinérgicos (parassimpaticolíticos), como a atropina e o brometo de butilescopolamina (Buscopan®), é bastante eficiente na atenuação da obstrução das vias aéreas tanto na RAO, como na SPAOP (Couëttil *et al.*, 2012). A atropina pode ser administrada por via endovenosa, numa dose de 0,01 – 0,02 mg/kg. A sua utilização é limitada, já que está associada a alguns efeitos secundários severos, sobretudo gastrointestinais (Bullone & Lavoie, 2016). Os anticolinérgicos inalatórios, como o brometo de ipratrópio, poderão configurar uma alternativa válida, embora possam ocasionalmente reduzir a motilidade gastrointestinal e a hidratação das membranas mucosas orais (McGorum *et al.*, 2013).

Diferentes tipos de mucolíticos têm sido eleitos no tratamento, com o objetivo de reduzir a acumulação de muco presente nas vias respiratórias, porém a sua eficácia clínica tanto na RAO como na IAD não está provada.

Alguns autores referem que a imunoterapia alérgico-específica constitui uma prática relativamente frequente nos casos de RAO e IAD (Gerber, 2014). A imunoterapia está indicada nos casos em que a evicção a aeroalergénios, previamente identificados, não é possível de ser realizada, nos casos em que os sinais clínicos são persistentes, ou quando o tratamento médico não é suficiente (Tilley, 2011). A imunoterapia alérgico-específica sugere ser uma boa alternativa como tratamento adjuvante.

Todavia, é de assinalar que não existem estudos comprovativos da eficácia da imunoterapia alérgico-específica nos casos de RAO e IAD, existindo alguns obstáculos, que dificultam a formulação de uma imunoterapia eficaz no tratamento de ambas as afeções respiratórias. O facto de a patogénese da IAD ser pouco conhecida, dos mecanismos imunológicos envolvidos na RAO serem complexos e também pouco claros, e a dificuldade de identificação dos alérgenos envolvidos, são alguns desses obstáculos (Gerber, 2014).

2.4.6. Prognóstico

A obstrução severa das vias aéreas é reversível e apresenta uma taxa de mortalidade baixa. No entanto, constitui uma doença debilitante, na medida em que poderá levar ao término precoce da carreira desportiva do cavalo, ou mesmo à eutanásia, justificada pela inatividade do mesmo.

O quadro clínico vai alternando entre períodos de remissão e períodos de exacerbação clínica, refletindo o grau de exposição antigénica. A morte ou eutanásia resultantes de um progresso rápido da doença alérgica, assim como a resposta refratária ao controlo ambiental, ou ao tratamento com corticosteroides, são relativamente raros.

Em suma, apesar da doença alérgica não ser totalmente curável, pode ser gerida sintomaticamente através do controlo ambiental, do tratamento farmacológico e também pela sensibilização do proprietário relativamente aos cuidados a ter em consideração (Bullone & Lavoie, 2016).

III. Trabalho Experimental

1. Introdução

As doenças alérgicas vêm sendo cada vez mais observadas na prática veterinária. Para além do cão, o animal doméstico mais frequentemente estudado, também o cavalo apresenta reações de base alérgica, passíveis de comprometer de forma severa o seu bem-estar (Mueller *et al.*, 2016) e, por vezes, o seu desempenho desportivo (Rivero *et al.*, 2008).

Vários estudos comprovaram que a hipersensibilidade alérgica nos cavalos pode ser provocada por pólenes, ácaros, insetos e fungos (Mueller *et al.*, 2016). Os sintomas associados são também eles diversos, podendo ser cutâneos, como na dermatite atópica, ou respiratórios, como é o caso da obstrução recorrente das vias aéreas (RAO) (Fadok, 2013), semelhante à asma humana (Mueller *et al.*, 2016).

A hipersensibilidade à picada dos insetos, principalmente aos culicídeos, comumente conhecida por eczema de verão, tem sido a manifestação alérgica mais estudada e, por conseguinte, a mais compreendida (Fadok, 2013). Normalmente, associados a esta condição clínica estão o prurido intenso, a alopecia e a formação de pápulas e crostas (Oldruitenborgh-Oosterban *et al.*, 2009). Alguns estudos apontam também para uma associação com a hiperreatividade das vias aéreas, desencadeadora de complicações brônquicas (Lanz *et al.*, 2017).

Apesar de existirem poucos estudos no âmbito da medicina veterinária, para além das respostas alérgicas já descritas, várias fontes alérgicas alimentares foram também associadas à alergia equina, incluindo a aveia, o trigo e o milho (Marsella, 2013; Pali-Schöll *et al.*, 2017).

Torna-se, assim, extraordinariamente importante a identificação individual das espécies alergénicas causadoras de quadro clínico. Neste contexto, uma anamnese detalhada, um exame clínico cuidado e direcionado, e o recurso a testes cutâneos, em particular os testes intradérmicos, configuram o protocolo primário e essencial, face aos casos suspeitos (Martins *et al.*, 2016). No caso de suspeita de envolvimento de alergénios alimentares, o teste de provocação alérgica após evicção alimentar é também uma opção para o diagnóstico, embora sejam de difícil execução (Mueller *et al.*, 2016).

Perante a suspeita de alergia associada a alergénios ambientais e/ou culicídeos, o diagnóstico deverá ser acompanhado por testes de determinação de IgE alergénio-específicas, especialmente se para tratamento for equacionada a imunoterapia alergénio-específica (Schaffartzika *et al.*, 2012; Marsella, 2013).

O estudo das doenças alérgicas no âmbito da medicina veterinária tem assumido cada vez mais relevância, pois permite um conhecimento etiopatogenético mais vasto, com o consequente foco preventivo e terapêutico mais eficiente (Jensen-Jarolim *et al.*, 2015).

Simultaneamente, e tendo em conta o conceito “*One Health*”, que reconhece que a saúde humana está intimamente ligada à saúde animal e ambiental (World Health Organization, 2017), é também permitida a aquisição de mais conhecimento relevante sobre a alergia humana. Os animais domésticos, em particular os cães, gatos e cavalos, têm sido sugeridos como bons modelos para estudos translacionais (Jensen-Jarolim *et al.*, 2015).

O tema deste trabalho acaba por surgir, não só pelo facto de as doenças alérgicas terem impacto na saúde e bem-estar animal, neste caso dos cavalos, mas também pelo recente reconhecimento dado pela Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (EACCI), relativamente à importância comparativa entre a alergia humana e a veterinária.

2. Objetivos

No contexto da ocorrência de alergia equina, ainda pouco estudada no nosso país, mas cujas manifestações clínicas suspeitas já houve oportunidade de observar, será de especial interesse realizar esse rastreio, com o objetivo de responder às seguintes questões:

- i. Qual a validade diagnóstica dos testes intradérmicos, tendo em conta a taxa de positividade dos dois grupos?
- ii. Quais as principais fontes alérgicas causadoras de sensibilização nesta população de cavalos da região de Évora?
- iii. Existe alguma relação entre as fontes alérgicas utilizadas e o sexo, o ambiente e/ou o quadro clínico apresentado?
- iv. Existe alguma correlação entre os resultados intradérmicos para as diferentes fontes alérgicas utilizadas?
- v. Tendo em conta a positividade obtida nos testes intradérmicos, quais as melhores abordagens terapêuticas/profiláticas?

Todo este trabalho foi desenvolvido considerando a história clínica do animal, exame clínico e a positividade obtida nos testes intradérmicos. De igual forma, foram realizadas colheitas de amostras de sangue, com o objetivo futuro de realizar testes sorológicos, para pesquisa de IgE alérgico-específicas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização da População

Para o presente estudo foram selecionados 28 cavalos (ver Anexo A) vivendo na região de Évora, entre os meses de Janeiro e Junho de 2019. Destes 28 cavalos, 21 apresentavam história clínica prévia, sugestiva de alergia (grupo alérgico), enquanto os restantes sete cavalos nunca manifestaram qualquer tipo de suspeita alérgica (grupo controlo).

O grupo alérgico foi composto por 14 cavalos cruzados, sendo seis cruzados portugueses, quatro cruzados árabes e quatro cruzados com raças indeterminadas, perfazendo assim a maior percentagem do grupo (66,7%). Os restantes sete cavalos eram todos Puro-Sangue Lusitano. Quanto à distribuição por sexo, o grupo foi constituído por cinco fêmeas (23,8%) e 16 machos, dos quais dois eram inteiros (9,5%) e 14 eram castrados (66,7%). A idade média foi de $13,5 \pm 6,6$ anos, sendo o intervalo de idades compreendido entre os três e os 29 anos.

Como critério para inclusão no grupo alérgico, nenhum cavalo poderia ter sido medicado, por qualquer via, com AINEs, glucocorticoides, anti-histamínicos, broncodilatadores ou qualquer derivado fenotiazínico, segundo Beale *et al.*, 1990), nas quatro semanas anteriores à realização dos TID, de acordo com Lorsch *et al.* (2001c).

O grupo controlo foi composto por sete cavalos, sendo seis cruzados portugueses (85,7%) e apenas um cruzado inglês (14,3%). Todos os animais pertencentes a este grupo eram fêmeas. A idade média foi de $13,8 \pm 6,1$ anos, sendo o intervalo de idades compreendido entre os sete e os 25 anos.

Os critérios de seleção para o grupo controlo basearam-se na inexistência de história clínica prévia e de sinais clínicos sugestivos de predisposição alérgica ou de outro processo patológico, nomeadamente inflamatório ou parasitário, no momento de realização do estudo.

Note-se que a inclusão de qualquer animal no estudo foi devidamente autorizado pelos respetivos proprietários, mediante assinatura de Formulário de Consentimento Informado, previamente disponibilizado. Por seu turno, os cavalos do grupo controlo por pertencerem à Universidade de Évora, foram cedidos e autorizados pela mesma. Todo o processo de avaliação do respeito pelas regras éticas de utilização de animais para fins de investigação foi previamente apreciada e autorizada pelo Órgão Responsável pelo Bem-estar dos Animais da Universidade de Évora (ORBEA).

De forma a assegurar o anonimato dos proprietários, perante entidades externas aos investigadores envolvidos, foi atribuído, a cada um dos animais que integraram o estudo, um Código de Identificação Individual.

3.2. Extratos Alérgicos Utilizados

Nos testes intradérmicos foram utilizados 17 extratos alérgicos diferentes (Figura 20), entre os quais: três de origem fúngica, sendo um deles uma mistura de vários fungos distintos; sete de pólenes, sendo três deles uma mistura de várias gramíneas de espécies distintas; seis de ácaros e um de culicídeos. Foram também utilizados um controlo positivo (fosfato de histamina a 0,01%) e um controlo negativo (solução salina fisiológica).

Os extratos de fungos, pólenes, ácaros do pó e de armazenamento foram produzidos pelos fabricantes Diater e Alergovet (Espanha). O extrato de culicídeos proveio dos laboratórios Stallergenes-Greer (Estados Unidos da América).

De assinalar, que por razões de logística não nos foi possível utilizar alguns extratos alérgicos em todos os cavalos e, que todos eles eram de origem comercial e destinados especificamente para este fim. Embora associados a raros efeitos secundários, é previsível a ocorrência de algum prurido local transitório.



Figura 20 – Painel de extratos alérgicos utilizados

3.3. Desenho Experimental

Através da informação disponibilizada pelos clínicos da Equimuralha foram selecionados 21 cavalos vivendo em diferentes zonas da região de Évora, com história clínica sugestiva de alergia. Posteriormente, foram selecionados sete cavalos da Universidade Évora sem qualquer tipo de suspeita alérgica. De referir que todos os cavalos foram escolhidos independentemente da sua aptidão, sexo e idade.

Após constituição da amostra que iria ser alvo do estudo, realizaram-se os seguintes procedimentos:

- a) Realização de um questionário individual ao proprietário ou tratador (ver Anexo B), visando a construção da história pregressa do animal;
- b) exame clínico por parte da equipa de trabalho, com o objetivo de identificar possíveis manifestações compatíveis com alergia (cutânea e respiratória);
- c) preparação e realização dos testes intradérmicos (Figura 21), não sendo previsível qualquer necessidade de sedação:
 - i. Realizou-se tricotomia com formato retangular na região lateral do pescoço, acima do sulco jugular, entre a mandíbula e o ombro do cavalo;
 - ii. os pontos de inoculação na região tricotomizada foram identificados com uma caneta de feltro a cerca de dois centímetros de distância entre si;
 - iii. após preparação das seringas com 0,05 mL de cada um dos extratos e dos controlos positivo e negativo, procedeu-se à administração intradérmica nos locais identificados para o efeito;
 - iv. a leitura da resposta cutânea realizou-se cerca de 15-20 minutos após a administração;



Figura 21 – Resultado de um teste intradérmico, 15 minutos após as administrações

- v. com base no tamanho e firmeza da pápula, através de exame visual, medição e palpação foi atribuída uma classificação entre 0 e 4; um resultado foi considerado positivo quando a pápula produzida foi, pelo menos igual ou superior a metade da diferença entre os controlos positivo e negativo; fundamentalmente, a classificação 0 foi atribuída quando a reação cutânea era equivalente à do controlo negativo e a classificação 4 foi atribuída quando a reação cutânea era semelhante à do controlo positivo; as classificações 2 e 3 corresponderam a graus de resposta cutânea intermédios entre os dois controlos;
 - vi. apesar de estudos experimentais anteriores (Rosenkrantz & White, 2014) admitirem uma reação positiva sempre que a classificação fosse ≥ 2 , neste estudo assumimos uma classificação de 1 também como positiva. Reações cutâneas com limites mal definidos e pouco firmes foram prontamente classificadas como 0 (negativa);
- d) foi também realizada colheita de uma amostra de sangue (Figura 22), com aproximadamente 20 mL, para provas laboratoriais (resultados não mencionados neste trabalho) e para futura realização de testes sorológicos.



Figura 22 – Colheita de sangue para provas laboratoriais e futura realização de testes sorológicos

É importante referir que não foi necessário qualquer recurso a sedação e que não se observou qualquer manifestação adversa. Realça-se, também, que todo o material utilizado estava esterilizado e era de utilização única.

3.4. Análise Estatística

A taxa de positividade dos dois grupos foi calculada, considerando o número de reações cutâneas positivas aos extratos alergénicos, ou seja, todas as que apresentaram classificação ≥ 1 , em relação ao número total de administrações intradérmicas realizadas com extratos alergénicos.

O *odds ratio* (O.R.) e o risco relativo (R.R.) foram calculados, para entender a probabilidade de ocorrência de resultados positivos com os extratos, nas diferentes categorias de sexo e de ambiente (*estabulado* ou *a campo*). Com objetivo de verificar se, efetivamente, existia uma relação de dependência entre estas variáveis, utilizou-se o teste exato de Fisher.

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a existência de correlação entre os resultados obtidos nos TID, no que diz respeito aos diferentes extratos alergénicos utilizados.

Nos casos em que foi requerida uma análise de dados categóricos para mais de duas variáveis independentes, sendo que ambas apresentavam três ou mais categorias de resposta, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (por exemplo, relação entre *positividade aos extratos alergénicos e tipo de sintomatologia*).

Os resultados obtidos nos testes descritos acima foram considerados estatisticamente relevantes para valores iguais ou inferiores a 0,1 ($p\text{-value} \leq 0,1$).

Para localização das diferenças significativas detetadas pelo teste de Kruskal-Wallis, realizaram-se comparações *par-a-par*, utilizando o teste de Mann-Whitney. Nestes casos, tornou-se necessário dividir o nível de significância pelo número de comparações, de forma a evitar rejeitar a hipótese nula quando esta era verdadeira.

4. Resultados

4.1. Anamnese e Exame Clínico

Após observação e levantamento da história pregressa verificou-se que cinco cavalos do grupo alérgico (23,8%) tinham ou tiveram acesso a feno de fraca qualidade, e que dois dos cavalos estabulados (50%) se encontravam em zonas sem ventilação adequada.

Nos exames clínicos realizados ao grupo alérgico verificou-se que 19 cavalos (90,5%) apresentavam sinais clínicos suspeitos: dois (9,5%) com manifestações respiratórias, como tosse, esternutação, corrimento nasal, sons pulmonares anormais à auscultação e dispneia; e 17 (81%) apresentavam vastas áreas alopecicas associadas a prurido, no rosto, orelhas, crineira, garrote, membros e garupa (Figura 23). Dois destes (11,8%) manifestavam igualmente sinais respiratórios ligeiros (sintomatologia mista).



Figura 23 – Lesões cutâneas associadas a prurido encontradas em alguns dos cavalos do grupo alérgico

Tomando em consideração a história clínica, foi possível confirmar que existiam mais dois cavalos com quadro clínico misto e que os dois cavalos restantes, aparentemente saudáveis, já

teriam manifestado sinais clínicos respiratórios. Um dos quais já tinha sido diagnosticado com RAO, através de broncoscopia e análise citológica após lavagem broncoalveolar.

Em suma, mediante o levantamento da história clínica e realização de exame clínico individual, concluiu-se que dos 21 indivíduos pertencentes ao grupo alérgico, 13 (62%) eram suspeitos apenas de alergia cutânea; quatro (19%) eram suspeitos de doença respiratória de origem alérgica e os restantes (19%) eram suspeitos de doença alérgica com manifestação clínica mista.

4.2. Testes Intradérmicos - Grupo Controlo vs Alérgico

Tabela 7 – Comparação do número de reações cutâneas positivas entre o grupo controlo e o grupo alérgico

Grupo/Classificação	Controlo	Alérgico
1	7 (77,8%)	44 (50,6%)
2	2 (22,2%)	28 (32,2%)
3	0 (0%)	13 (14,9%)
4	0 (0%)	2 (2,3%)
Nº Testes Positivos	9 (8,3%)	87 (28,5%)
Nº Testes	109	305

Pela Tabela 7, nota-se que apenas 8,3% dos testes do grupo controlo foram positivos, sendo que a maioria foi verificada num só cavalo (66,7%). De lembrar que nenhum destes três cavalos do grupo controlo tinham história compatível com alergia respiratória ou cutânea.

Como seria expectável, o grupo alérgico apresentou uma taxa de positividade aos extratos alérgicos (28,5%) e uma classificação média das reações cutâneas ($1,69 \pm 0,81$), superiores ao grupo controlo (8,3% e $1,22 \pm 0,44$, respetivamente).

4.3. Testes Intradérmicos – Grupo Alérgico

Os resultados obtidos nos testes intradérmicos no grupo alérgico encontram-se registados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos a cada um dos extratos alergénicos utilizados nos testes intradérmicos. FA – Fungos Aerógenos; Aa – *Alternaria alternata*; Af – *Aspergillus fumigatus*; GS – Gramíneas selvagens; Qi – *Quercus ilex*; Dg – *Dactylis glomerata*; Pp – *Phleum pratense*; CI- Cizânias I; CII – Cizânias II; Pj – *Parietaria judaica*; Dp – *Dermatophagoides pteronyssinus*; Df – *Dermatophagoides farinae*; Ld – *Lepidoglyphus destructor*; As - *Acarus siro*; Tp – *Tyrophagus putrescentiae*; Em – *Euroglyphus maynei*.

	FA	Aa	Af	GS	Qi	Dg	Pp	CI	CII	Pj	Dp	Df	Ld	As	Tp	Em	Culicoides
Nº Testes	9	21	21	21	13	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Nº / % Positivos	5 56%	9 43%	5 24%	2 10%	0	0	2 10%	4 19%	6 29%	4 29%	3 25%	7 33%	6 29%	5 24%	7 33%	8 38%	14 67%
Amplitude	1-3	1-2	1-2	1	0	0	1-2	1-2	1-2	1-3	1-2	1-3	1-3	1-2	1-3	1-4	1-4
Média	2	1,44	1,2	1	0	0	1,5	1,25	1,33	1,75	1,33	1,75	1,33	1,8	1,71	2	2,29
SD	1	0,53	0,45	0	0	0	0,71	0,5	0,57	0,96	0,57	0,95	0,82	0,45	0,76	1,07	0,92

Todos os cavalos apresentaram pápula evidente nas administrações intradérmicas do controlo positivo de histamina, notando-se, por vezes, uma resposta praticamente imediata. O diâmetro médio destas reações foi de $17,5 \pm 4,1$ mm.

As reações cutâneas observadas 15-20 minutos após a administração dos 17 extratos alergénicos, foram classificadas numa escala de 0 a 4. Esta classificação foi atribuída mediante uma comparação objetiva (diâmetro da pápula) e subjetiva (firmeza), com a reação cutânea observada no controlo positivo (ver Anexo C).

Verificou-se que o extrato alergénico correspondente aos insetos *Culicoides sp.* foi o que apresentou maior taxa de positividade e classificação média (acima do grau 2). Os extratos de *Alternaria alternata* e de fungos aerógenos, também demonstraram uma taxa de positividade alta, embora o segundo não tenha sido testado em todos os cavalos.

Além dos culicídeos, os extratos do ácaro *Euroglyphus maynei* e dos fungos aerógenos obtiveram reações cutâneas com uma classificação média igualmente elevada (ambos com classificação média igual a 2).

As reações cutâneas com classificação máxima foram observadas apenas nos extratos alergénicos dos culicídeos e do ácaro *Euroglyphus maynei*.

Os extratos dos pólenes de azinheira (*Quercus ilex*) e da gramínea *Dactylis glomerata* revelaram não ser relevantes na sensibilização alérgica desta população. No entanto, é de referir que os extratos mencionados não foram testados em todos os cavalos.

Tabela 9 – Positividade apresentada em cada uma das categorias dos extratos alergénicos

Fontes Alérgicas	Qtd.	Positivos	Nº Testes
Fungos	3	19 (37,3%)	51
Pólenes	7	18 (15,5%)	116
Ácaros	6	36 (28,3%)	127
Insetos (Cul.)	1	14 (66,7%)	21
TOTAL	17	87 (28,5%)	305

Observando a Tabela 9 verifica-se que a maioria das reações cutâneas positivas foi obtida com extratos de ácaros (41,4%), ainda que o extrato dos insetos *Culicoides sp.* tenha sido o que apresentou maior taxa de positividade, seguido dos fungos.

É de salientar que a maioria dos extratos alergénicos utilizados foi de ácaros e de pólenes.

4.4. Estudo da Relação entre os Resultados Intradérmicos e o Sexo

Para o estudo da dependência entre a positividade aos extratos alérgicos e o sexo do cavalo foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Como resultado, não se verificou qualquer evidência estatística, em nenhum dos testes realizados, que suportasse a existência de dependência entre as duas variáveis, já que todos os *p-value* foram superiores a 0,1.

Contudo, um dos testes de dependência mostrou um *p-value* tangencial ao nível de significância, como se encontra representado na tabela 11. A tabela 10 é meramente descritiva.

Tabela 10 – Distribuição de frequências absolutas e relativas da positividade apresentada a *Alternaria alternata* consoante o sexo do cavalo

			Macho	Femea	Total
A. Alternata	Alergico	Count	5	4	9
		% within A. Alternata	55,6%	44,4%	100,0%
	Nao Alergico	Count	11	1	12
		% within A. Alternata	91,7%	8,3%	100,0%
Total	Count	16	5	21	
	% within A. Alternata	76,2%	23,8%	100,0%	

Tabela 11 – Teste Exato de Fisher para verificação de dependência entre a positividade apresentada a *Alternaria alternata* e o sexo do cavalo

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,697 ^a	1	,055		
Continuity Correction ^b	1,974	1	,160		
Likelihood Ratio	3,803	1	,051		
Fisher's Exact Test				,119	,080
Linear-by-Linear Association	3,521	1	,061		
N of Valid Cases	21				

Pelo Teste de Fisher, e ao nível de significância 0,1, é de referir que, apesar de não rejeitarmos a independência das duas variáveis, o *p-value* = 0,119 mostra-nos que uma amostra maior poderia auxiliar-nos a confirmar, ou não, a independência destas duas variáveis.

De forma a entender o tipo de associação que existiria entre as duas variáveis, caso o Teste de Fisher assim o provasse, calculou-se o O.R.

Tabela 12 – Risco estimado para a ocorrência de positividade a *Alternaria alternata*, tendo em conta o sexo do cavalo

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for A. Alternata (Alergico / Nao Alergico)	,114	,010	1,295
For cohort Sexo = Macho	,606	,330	1,114
For cohort Sexo = Femea	5,333	,712	39,951
N of Valid Cases	21		

Através da Tabela 12 concluímos que, se o *p-value* fosse $\leq 0,1$ validaríamos a premissa de que a probabilidade de ocorrência de sensibilização a *Alternaria alternata* nas fêmeas é 8,8 vezes superior, em comparação com os machos.

Realizou-se, também, o Teste de Kruskal-Wallis para verificar se existiam diferenças na positividade apresentada para *Alternaria alternata*, dependendo do sexo (Tabela 13).

Tabela 13 - Teste de Kruskal-Wallis, agrupando os cavalos por sexo, para os vários extratos alergénicos utilizados nos TID

	Fungos aero.	A. Alternata
Kruskal-Wallis H	,080	3,521
df	1	1
Asymp. Sig.	,777	,061

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Sexo

Dado o *p-value* = 0,061, verifica-se que de facto, dependendo do sexo do cavalo existem diferenças relativamente à positividade apresentada para *Alternaria alternata*. Este teste é mais uma prova de que o aumento da amostra poderá contribuir para a ocorrência de evidência estatística demonstrativa da associação entre estas duas variáveis.

4.5. Estudo da Relação entre os Resultados Intradérmicos e o Ambiente

Tal como no estudo anterior, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. A partir da análise do teste foi possível verificar que não existe qualquer evidência estatística, em nenhum dos testes realizados, que suportasse a associação entre a positividade aos extratos alergénicos e o ambiente onde o cavalo se encontra.

No entanto, um dos testes de dependência revelou um *p-value* tangencial ao nível de significância, como se encontra representado na Tabela 15. A Tabela 14 é meramente descritiva.

Tabela 14 - Distribuição de frequências absolutas e relativas da positividade apresentada a *Euroglyphus maynei* consoante o ambiente do cavalo

			Estabulado	Campo	Total
Euroglyphus maynei	Alergico	Count	0	8	8
		% within Euroglyphus maynei	0,0%	100,0%	100,0%
	Nao Alergico	Count	4	9	13
		% within Euroglyphus maynei	30,8%	69,2%	100,0%
Total	Count	4	17	21	
	% within Euroglyphus maynei	19,0%	81,0%	100,0%	

Tabela 15 - Teste Exato de Fisher para verificação de dependência entre a positividade apresentada a *Euroglyphus maynei* e o ambiente do cavalo

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,041 ^a	1	,081		
Continuity Correction ^b	1,373	1	,241		
Likelihood Ratio	4,402	1	,036		
Fisher's Exact Test				,131	,119
Linear-by-Linear Association	2,896	1	,089		
N of Valid Cases	21				

Tal como no Teste de Fisher realizado no capítulo anterior, o $p\text{-value} = 0,131$ não nos permite rejeitar a independência entre a positividade apresentada a *Euroglyphus maynei* e o ambiente do cavalo (estabulado ou a campo). Porém, é indicador de que uma amostra maior poderia ser mais esclarecedora neste aspeto.

Realizou-se, também, o Teste de Kruskal-Wallis para verificar se existiam diferenças na positividade apresentada para *Euroglyphus maynei*, dependendo do ambiente (Tabela 16). Neste caso, não foi possível calcular o O.R., uma vez que nenhum dos cavalos estabulados se mostrou positivo a *Euroglyphus maynei*, como representado na Tabela 14.

Tabela 16 – Teste de Kruskal-Wallis, agrupando os cavalos por ambiente, para os vários extratos alergénicos utilizados nos TID

	Fungos aero.	Euroglyphus maynei	Culicoides
Kruskal-Wallis H	1,250	2,896	,147
df	1	1	1
Asymp. Sig.	,264	,089	,701

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Ambiente

Tendo um $p\text{-value} = 0,089$, verifica-se que de facto, dependendo do ambiente (estabulado ou a campo) existem diferenças relativamente à positividade apresentada para *Euroglyphus*

maynei. Este teste é mais uma prova de que o aumento da amostra poderá contribuir para um aumento da evidência estatística, relativamente à associação entre estas duas variáveis.

4.6. Estudo da Relação entre os Resultados Intradérmicos e o Tipo de Manifestação Clínica

Para perceber se ocorriam diferenças na distribuição das positivities apresentadas aos extratos alergénicos, agrupando os indivíduos pelo tipo de manifestação clínica (respiratória, dermatológica ou mista) optou-se pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 17 – Teste de Kruskal-Wallis, agrupando os cavalos por tipo de manifestação clínica, para os vários extratos alergénicos utilizados nos TID

	Fungos aero.	A. Alternata	Aspergillus fumigatus	Gramíneas selvagens	Quercus ilex	D. glomerata	Phleum pratense	Cizânias I	Cizânias II
Kruskal-Wallis H	2,600	,630	7,178	1,508	,000	,000	1,508	2,896	7,526
df	2	2	2	2	2	1	2	2	2
Asymp. Sig.	,273	,730	,028	,470	1,000	1,000	,470	,235	,023

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Sintomatologia

A partir da análise da Tabela 17 verificou-se existirem dois *p-value* inferiores ao nível de significância selecionado: *Aspergillus fumigatus* (*p-value* = 0,028) e Cizânias II (*p-value* = 0,023).

Estes valores permitem-nos afirmar que existem diferenças significativas na distribuição da positividade destes extratos alergénicos, no que diz respeito ao tipo de manifestação clínica do cavalo.

Uma vez que este teste não nos indica entre quais manifestações clínicas, essas diferenças são significativas, tornou-se necessário a realização de três testes de Mann-Whitney. Estes testes baseiam-se na comparação *par-a-par* entre os diferentes tipos de manifestação clínica (respiratória, dermatológica e mista).

Assim sendo, o nível de significância com o qual estamos a trabalhar terá de ser dividido pelo número de comparações que iremos realizar, ou seja, neste caso, passa a existir evidência estatística para um *p-value* ≤ 0,033.

Tabela 18 – Teste de Mann-Whitney, comparando a manifestação clínica respiratória com a dermatológica

	Sintomatologia	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Aspergillus fumigatus	Cizânias II	
Aspergillus fumigatus	Respiratorio	4	8,00	32,00	Mann-Whitney U	22,000	
	Dermatologico	13	9,31	121,00			8,500
	Total	17					32,000
Cizânias II	Respiratorio	4	13,38	53,50	Z	-,810	
	Dermatologico	13	7,65	99,50	Asymp. Sig. (2-tailed)	,418	
	Total	17			Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,703 ^b	
						,045 ^b	

Tabela 19 – Teste de Mann-Whitney, comparando a manifestação clínica respiratória com a mista

	Sintomatologia	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Aspergillus fumigatus	Cizânias II	
Aspergillus fumigatus	Respiratorio	4	3,00	12,00	Mann-Whitney U	2,000	
	Misto	4	6,00	24,00			6,000
	Total	8					12,000
Cizânias II	Respiratorio	4	5,00	20,00	Z	-2,049	
	Misto	4	4,00	16,00	Asymp. Sig. (2-tailed)	,040	
	Total	8			Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,114 ^b	
						,686 ^b	

Tabela 20 – Teste de Mann-Whitney, comparando a manifestação clínica dermatológica com a mista

	Sintomatologia	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Aspergillus fumigatus	Cizânias II	
Aspergillus fumigatus	Dermatologico	13	7,81	101,50	Mann-Whitney U	10,500	
	Misto	4	12,88	51,50			15,000
	Total	17					101,500
Cizânias II	Dermatologico	13	8,15	106,00	Z	-2,220	
	Misto	4	11,75	47,00	Asymp. Sig. (2-tailed)	,026	
	Total	17			Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,079 ^b	
						,245 ^b	

Observando os resultados obtidos nos testes de Mann-Whitney, ao nível de significância de 0,033, podemos concluir que:

- Pela Tabela 18, o *p-value* = 0,007 indica-nos que existe uma diferença significativa entre a manifestação dermatológica e a respiratória, quanto à frequência de distribuição da positividade apresentada às Cizânias II. Analisando a média dos postos (*Mean Rank*) é possível verificar que a manifestação respiratória está mais relacionada com a ocorrência de positividade a Cizânias II;
- pela Tabela 19 não se registou nenhuma diferença significativa entre a manifestação respiratória e a mista;
- pela Tabela 20, o *p-value* = 0,026 indica-nos que existe uma diferença significativa entre a manifestação dermatológica e a mista, quanto à frequência de distribuição da positividade apresentada ao fungo *Aspergillus fumigatus*. Analisando a média dos postos (*Mean Rank*) é possível verificar que a manifestação mista está mais relacionada com a ocorrência de positividade a *Aspergillus fumigatus*.

4.7. Determinação de Correlação entre os Resultados

Intradérmicos

Foi escolhido o Teste de Correlação de Spearman, com o objetivo de averiguar a ocorrência de correlações entre os resultados intradérmicos aos diferentes extratos alérgicos (ver Anexo D).

Para um nível de significância de 0,1 verificaram-se as seguintes correlações:

- Positivas Fortes:
 - *Dermatophagoides pteronyssinus* e Fungos aerógenos;
 - Gramíneas selvagens e *Dermatophagoides pteronyssinus*;
 - *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Tyrophagus putrescentiae* ;
- Positivas Fracas:
 - Gramíneas selvagens e *Tyrophagus putrescentiae*;
 - Cizânias I e *Euroglyphus maynei*;
- Negativas Fortes:
 - *Aspergillus fumigatus* e Fungos aerógenos;
 - *Lepidoglyphus destructor* e Fungos aerógenos;
- Negativas Fracas:
 - *Alternaria alternata* e *Dermatophagoides farinae*;
 - *Aspergillus fumigatus* e *Tyrophagus putrescentiae*;
 - Gramíneas selvagens e Culicídeos;
 - Cizânias II e Culicídeos.

De assinalar que as correlações positivas foram consideradas fortes para um coeficiente de correlação $> 0,5$. Relativamente às correlações negativas foram consideradas fortes quando inferiores a $- 0,5$.

5. Discussão

Quanto ao levantamento da história pregressa, embora tenha sido formulado um questionário direcionado aos proprietários ou tratadores, a informação disponibilizada pelos mesmos foi, por vezes, escassa. Em alguns casos, foi-nos confirmada a instituição periódica de planos terapêuticos e preventivos eficazes, mediante a utilização de repelentes (Ciperpulvizo®), corticoesteroides (Dexafarm®) e broncodilatadores (Dilaterol®). No entanto, na maioria dos casos, não existia confirmação de qualquer doença alérgica, quer fosse atopia ou hipersensibilidade aos culicídeos. Apenas dois casos tinham confirmação prévia de RAO, sendo que um deles era suspeito de apresentar uma outra doença respiratória concomitante.

O método de classificação utilizado para avaliação das reações cutâneas está de acordo com a maioria dos estudos realizados nesta matéria. Contudo, nesses estudos, as reações só foram consideradas positivas quando ≥ 2 (Rosenkrantz & White, 2014). Neste trabalho, as reações de grau 1 foram consideradas também positivas, o que poderá ser uma fragilidade nos resultados obtidos, apesar das pápulas duvidosas terem sido classificadas com 0. A componente subjetiva inerente a este método de classificação pode também ser um entrave na interpretação dos resultados, já que nem todos os diâmetros papulares foram medidos, à exceção dos controlos positivos.

Um outro ponto discutível neste estudo relaciona-se com o facto de não termos verificado possíveis reações cutâneas, além dos 15 a 20 minutos após as administrações intradérmicas. Vários estudos referidos por Lebis *et al.* (2002) reportaram reações de hipersensibilidade retardada, o que, neste estudo, acabam por não ser rastreadas.

Com este trabalho foi possível avaliar a validade diagnóstica dos testes intradérmicos, comparando as respostas cutâneas entre um grupo de cavalos sem qualquer indício de doença alérgica e outro com história e sinais clínicos sugestivos da mesma. Pelos resultados mencionados acima, verifica-se que o grupo alérgico apresentou uma taxa de positividade e classificação média das reações cutâneas, superiores à do grupo controlo. Comprova-se, assim, que os testes intradérmicos são um método de diagnóstico com potencial para discriminar entre animais sensibilizados e animais saudáveis (Wagner, 2016).

Por outro lado, realça-se que estes testes podem originar falsos positivos, não só pela escassa qualidade de alguns extratos, como também pela já estudada interferência de algumas subclasses de IgG (Wagner *et al.*, 2006) nas reações de hipersensibilidade imediata. A insuficiente padronização dos extratos alergénicos pode estar relacionada com a sua constituição, que por não estar padronizada para o uso médico-veterinário, por vezes possui substâncias irritantes (Mueller *et al.*, 2016).

A ocorrência de positividade no grupo controlo pode também ser explicada pela existência de sensibilização, a qual, porém, possivelmente associada a tolerância imunitária, pode não estar associada ao desenvolvimento de quadro clínico. Esta explicação suporta a tese de que os testes intradérmicos avaliam o grau de sensibilização dos indivíduos, sem que sejam por si só confirmadores de alergia. É, portanto, de extraordinária importância ter em consideração a anamnese e o exame clínico do animal, para um diagnóstico mais assertivo (Wagner, 2016).

No momento de realização dos TID, a grande maioria dos cavalos do grupo alérgico, apesar de apresentarem alguns sinais clínicos, não se evidenciavam com sintomatologia ativa, clara. Esta circunstância reflete uma vantagem, na medida em que, por norma, cavalos com sintomatologia ativa, quando sujeitos aos TID, reagem mais frequentemente aos extratos alergénicos (Lorsch *et al.*, 2001a).

A população de cavalos em estudo mostrou uma maior frequência e um maior nível de positividade aos culicídeos, o que pode ser justificado pelo facto da maioria dos indivíduos viver

maioritariamente no exterior. Outra explicação tem que ver com os extratos alergénicos utilizados. Na realidade, desconhece-se a composição antigénica dos extratos, ainda que se apresente como uma mistura antigénica proveniente de várias espécies de culicídeos. Em bom rigor, será aconselhável a utilização de extratos alergénicos, provenientes de espécies de culicídeos autóctones, de modo a aumentar a fidedignidade no diagnóstico de hipersensibilidade (van der Meide *et al.*, 2012).

Além dos culicídeos, os extratos de fungos aerógenos e de *Alternaria alternata* também apresentaram uma maior frequência de positividade, comparativamente com os restantes. No entanto, é de assinalar que a maioria das reações cutâneas positivas corresponderam a extratos alergénicos de ácaros. A par dos culicídeos, o extrato do ácaro *Euroglyphus maynei* também apresentou um nível de positividade elevado.

Perante estes resultados, e considerando apenas os extratos alergénicos que foram utilizados em todos os cavalos desta população, pode-se concluir que, genericamente, se verificou um maior nível de sensibilização aos insetos do género *Culicoides sp.*, ao fungo *Alternaria alternata* e ao ácaro *Euroglyphus maynei*. Como já referido, a maioria dos cavalos encontrava-se a campo, apesar de alguns serem ocasionalmente estabulados. Esta circunstância poderá ser a razão pela qual os cavalos apresentaram sensibilização tanto a fontes alergénicas maioritariamente associadas ao exterior como ao interior. O facto dos TID terem sido realizados numa época do ano mais húmida e de alguns cavalos terem estado em contacto com feno de má qualidade, poderá ser um fator relevante para a sensibilização aos fungos.

Em contrapartida, os extratos polínicos, quer fossem de árvores ou gramíneas, revelaram ser pouco relevantes na sensibilização desta população. Inclusivamente, embora não tenham sido utilizados extratos de *Quercus ilex* e de *Dactylis glomerata* em todos os cavalos, não se observou qualquer nível de positividade. Mais uma vez, a época do ano em que o estudo foi levado a cabo, pode ter influenciado estes resultados, em virtude da baixa carga polínica, sensibilizante, associada (Rede Portuguesa de Aerobiologia – Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica).

Relativamente aos estudos de dependência entre a positividade a cada um dos extratos alergénicos e o sexo do animal, para o nível de significância definido, não se verificou qualquer tipo de associação. O mesmo se verificou nos estudos de dependência com o ambiente. No entanto, cada um dos estudos revelou um *p-value* sugestivo de que o aumento da amostra poderá resultar na verificação de uma associação entre as variáveis em causa.

Alguns autores apontaram para um maior risco de desenvolvimento de RAO nas fêmeas (Couëtil & Ward, 2003), tendo sido também reportada uma maior relevância etiológica dos fungos, em particular de *Aspergillus fumigatus* (Tilley *et al.*, 2010) e de *Alternaria alternata* (Tahon *et al.*, 2009), frequentemente presentes em fenos de má qualidade. Como tal, não deixa de ser curioso, que, no estudo da associação entre o sexo e os vários extratos alergénicos, exista um teste, que mesmo com uma amostra pequena, para um nível de confiança de 90%, esteja muito

próximo de confirmar uma associação entre a ocorrência de positividade ao fungo *Alternaria alternata* e o sexo feminino. Poderá isso significar que, possivelmente, o maior risco de RAO associado ao sexo feminino, reportado por esses autores, pode estar relacionado com uma maior predisposição alérgica do mesmo para os fungos, neste caso em particular, a *Alternaria alternata*. Assim sendo, e tendo em conta que a maioria dos cavalos desta população são machos, seria de todo o interesse aumentar a nossa amostra, de preferência com indivíduos do sexo feminino.

No que diz respeito ao estudo de dependência entre a positividade aos extratos alergénicos e o ambiente, verificou-se uma situação semelhante à anterior. Assim, sabendo-se que o *Euroglyphus maynei* é um ácaro do pó doméstico, igualmente presente em depósitos de farinhas e rações (Nes *et al.*, 1993), poderemos suspeitar que o maior risco de ocorrência de sensibilização em cavalos estabulados, poderá também vir a confirmar-se, com o aumento da amostra estudada.

Os testes de distribuição que foram posteriormente realizados nestes dois casos, acabam por revelar uma diferença significativa na distribuição da frequência das positivities a *Alternaria alternata* e *Euroglyphus maynei*, consoante o sexo do animal e o ambiente em que vive, respetivamente.

Foi também verificado que, dependendo do tipo de manifestação clínica, existiam diferenças significativas na apresentação de positividade aos extratos Cizânias II e *Aspergillus fumigatus*. Porém, quando se tentou compreender onde é que essas diferenças ocorriam, os resultados tornaram-se inconclusivos. Apesar desta situação, os resultados sugeriram que os extratos de Cizânias II e de *Aspergillus fumigatus* apresentavam positividade, mais frequentemente nos casos em que ocorre manifestação respiratória e manifestação mista, respetivamente. Mais uma vez, o aumento da amostra de estudo poderia auxiliar a confirmar algo que os resultados sugerem, embora de forma que não se pode considerar conclusiva.

Quanto às correlações entre os resultados intradérmicos para os diferentes extratos alergénicos, constatou-se ocorrerem correlações positivas entre os ácaros do pó e os ácaros de armazenamento, respetivamente *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Tyrophagus putrescentiae*; entre os ácaros e os pólenes, designadamente *Dermatophagoides pteronyssinus* e gramíneas selvagens, e entre fungos e ácaros do pó, mais propriamente fungos aerógenos e *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Estes resultados estão de acordo com alguns estudos que apontam para a associação entre a sensibilização a pólenes e a ácaros, em humanos (Taketomi *et al.*, 2006), e para a existência de reações cruzadas entre ácaros do pó e de armazenamento, nos animais domésticos (Mueller *et al.*, 2016). A ocorrência de reações cruzadas entre várias espécies de ácaros e de fungos também tem sido reportada (Chung *et al.*, 2007).

Assinala-se, no entanto, que todas as correlações positivas observadas com os ácaros, foram verificadas em relação a diferentes espécies de pólenes ou de fungos. O facto de

desconhecemos a origem antigénica específica destes extratos, não nos permite, com rigor, saber com quais espécies de fungos e de pólenes ocorrerão estas possíveis reações cruzadas.

Além das correlações positivas referidas, também se verificaram algumas correlações negativas entre os resultados intradérmicos para culicídeos e para pólenes, e para ácaros e fungos. Estes achados, no entanto, não são explicados nem sustentados por qualquer estudo, podendo talvez refletir o ambiente envolvente da maioria dos cavalos desta população.

O propósito da utilização dos TID é apenas a determinação de sensibilização, o que constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de alergia. No entanto, como já referido anteriormente, mesmo a *sensibilização* mastocitária com IgE alérgico-específicas não nos garante que o cavalo seja alérgico (Kolm-Stark & Wagner, 2002). Deste modo, para complemento diagnóstico, perante a suspeita de alergia, sobretudo se se equaciona a possibilidade de imunoterapia específica, deve-se proceder à realização de testes sorológicos, para pesquisa de IgE alérgico-específicas livres. Durante a realização deste trabalho foi considerada essa hipótese, para completar a informação em termos comparativos, *in vivo* e *in vitro*, não tendo, contudo, sido possível.

Para os testes sorológicos, o ELISA tem sido o método sorológico mais estudado, pela sua facilidade de execução, economia e compromisso entre sensibilidade e especificidade (van der Meide *et al.*, 2012). Mais concretamente, a variante *FcεR1α-based* ELISA tem demonstrado uma maior correlação com os resultados obtidos nos TID (Lorsch *et al.*, 2001c), do que utilizando anticorpos secundários policlonais, para identificação das IgE séricas (Rosenkrantz & White, 2014). Deste modo, para a realização de imunoterapia alérgico-específica, torna-se ainda mais imprescindível a realização de ambos os testes, com a maior fiabilidade possível, na identificação das fontes alérgicas implicadas no processo alérgico (Ginel *et al.*, 2014).

É, no entanto, importante realçar que os testes sorológicos têm demonstrado uma série de limitações, quer seja ao nível da qualidade dos extratos alérgicos e da interferência de algumas subclasses de IgG, tal como nos TID, quer seja ao nível dos reagentes anti-IgE utilizados (Wagner, 2016). Outro aspeto que pode influenciar as possíveis diferenças observadas entre o ELISA e os TID são os diferentes tempos de semivida da IgE sérica (de três dias, no caso da sérica e de duas semanas, no caso da fixada nos mastócitos) (Morgan *et al.*, 2007).

6. Conclusão

Ao longo do tempo, as doenças alérgicas na medicina veterinária têm adquirido cada vez mais relevância, sobretudo nas espécies reconhecidamente mais predispostas, como o cão, o gato e o cavalo. As alergias são algumas das afeções que interferem com o bem-estar animal e, no caso dos cavalos, diminuem o desempenho desportivo. O seu estudo permite entender melhor os mecanismos imunológicos envolvidos, associado ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais específicos e sensíveis, e a planos terapêuticos consequentemente mais

eficazes. Salienta-se também que, tendo em conta o conceito “One Health”, a investigação na área da imunologia veterinária permite-nos adquirir mais conhecimento na fronteira com a alergia humana.

Neste trabalho, concluiu-se que os testes intradérmicos são efetivamente uma ferramenta de diagnóstico útil e válida, contribuindo para a diferenciação diagnóstica entre animais sensibilizados e animais saudáveis. Esta população de cavalos da região de Évora, apresentou uma maior sensibilização alérgica para os culicídeos e para os fungos aerógenos, sobretudo ao fungo *Alternaria alternata*.

Quanto à relação dos resultados intradérmicos com os sinais clínicos, sexo e ambiente, não foi possível concluir acerca de qualquer relação entre essas variáveis. No entanto, alguns resultados sugeriram uma maior frequência de positividade intradérmica aos extratos Cizânias II e de *Aspergillus fumigatus*, quando os cavalos apresentavam sinais clínicos respiratórios e mistos, respetivamente.

Relativamente ao estudo de correlações entre os resultados intradérmicos para os diferentes extratos alérgicos, verificaram-se correlações entre ácaros do pó e de armazenamento, entre ácaros do pó e fungos e, ainda, entre ácaros e pólenes.

Este trabalho, contudo, apresenta algumas limitações, principalmente pelo facto de amostra não ter uma expressão estatisticamente significativa. Acrescenta-se também não ter sido possível utilizar todos os extratos alérgicos em todos os cavalos, a escassa informação disponibilizada por alguns tratadores ou proprietários e a impossibilidade de verificação de reações cutâneas mais tardias. Apesar destas limitações, todos os objetivos a que nos propusemos foram cumpridos, permitindo que este estudo possa ser continuado no futuro, mediante o aumento da nossa amostra e a realização de testes sorológicos, tendo-se, para o efeito, colhido amostras de sangue.

Futuramente, deverão ser realizados mais estudos relativamente à etiopatogenia de algumas doenças alérgicas, como por exemplo a RAO, a formularem-se extratos alérgicos melhor padronizados para uso médico veterinário e, por fim, desenvolver métodos de diagnóstico complementares em relação aos testes intradérmicos, dadas as suas limitações práticas.

Bibliografia

Ainsworth DM, Grunig G, Matychak MB, Young J, Wagner B, Erb HN & Antczak DF (2003) Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol*, **96**: 83-91.

Allen K & Franklin S (2009) RAO and IAD: respiratory disease in horses revisited . *In Practice*, **29**: 76-82.

Anderson GS, Belton P, Jahren E, Lange H & Kleider N (1996) Immunotherapy trial for horses in British Columbia with *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) hypersensitivity. *J Med Entomol*, **33**: 458-466.

Art T, Bureau, F & Robinson NE (2008) Hunting for a key to the enigma of heaves in the black box of the white cells. *Vet J*, **177**: 307-308.

Bakos Z (2008) Digital luminescence thoracic radiography in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Rec*, **162**: 122-124.

Beale KM, Kunkle GA, Chalker L & Cannon R (1990) Effects of sedation on intradermal skin testing in flea-allergic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **197**: 861-864.

Benedice D, Mazan M & Hoffman AM (2008) Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med* , **22**: 1022-1028.

Bergvall K (2014) *Culicoides* hypersensitivity: diagnosis. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 291-296.

Bourdeau PJ, Beis C & Chouilly C (1999) Evaluation of permethrin and containing spray in the treatment of sweet itch in 25 horses. *Proceedings of the 15th Annual Member's meeting American Academy of Veterinary Dermatology/American College of Veterinary Dermatology*, 13-14.

Bullone M & Lavoie JP (2016) Recurrent Airway Obstruction and Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease. In *Equine Clinical Immunology* ed. Felipe MJ, Wiley Blackwell, Ames, Iowa, EUA, ISBN: 9781118558874, pp. 127-144.

Callahan GN & Yates RM (2014) Overview of mechanisms of defense. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 3-15.

Callahan GN (2014) Cells and Organs of the Adaptive Immune System. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 109-120.

- Callahan, G.N. (2014) Immune Deficiencies and Immune-Mediated Diseases. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 271-284.
- Callahan GN (2014) T-Lymphocyte Development. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 143-159.
- Callahan GN (2014) B-Cell Activation and Differentiation. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 197-217.
- Callahan GN (2014) B-Cell Development. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 181-196.
- Christmann U (2008) Relationship between surfactant alterations and severity of disease in horses with recurrent airway obstruction (RAO). Ph.D. Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, EUA.
- Chung Y, Copeland LB, Lehmann JR & Ward MD (2007) Cross reactivity in allergic asthma-like responses between mold and house dust mite in mice. *Society of Toxicology Annual Meeting*. Charlotte, North Carolina, EUA.
- Cohen ND & Carter GK (1992) Steroid hepatopathy in a horse with glucocorticoid-induced hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc*, **200**: 1682-1684.
- Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q & Lavoie JP (2004) IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol*, **97**: 87-96.
- Costa LR, Johnson JR, Baur ME & Beadle RE (2006) Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses. *Am J Vet Res*, **67**: 1635-1642.
- Couëtil L & Hawkins J (2013) Diagnostic Tests and Therapeutic Procedures. In *Respiratory Diseases of the Horse* ed. Couëtil L & Hawkins J, London, UK, ISBN: 9781840761863, pp. 47-76.
- Couëtil LL & Ward MP (2003) Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990-1999). *J Am Vet Med Assoc*, **223**: 1645-1650.
- Couëtil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JLN & Lavoie JP (2007) Inflammatory airway disease of horses - ACVIM Consensus Statement. *J Vet Intern Med*, **21**: 356-361.
- Couëtil TJ, Hammer J, Miskovic M, Nogradi N, Perez-Moreno C & Ivester K (2012) Effects of N-butylscopolammonium bromide on lung function in horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med*, **26**: 1433-1438.

- Day MJ & Schultz RD (2011) Hypersensitivity mechanisms. In *Veterinary Immunology: Principles and Practice* ed. Day MJ & Schultz RD, Manson Publishing, London, UK, ISBN: 9781482224627, pp.120-130.
- Day MJ (2014) Introduction: the immunological basis of allergic diseases. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C & Foster A, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. XV-XX.
- De Boer DJ & Hill PB (1999) Serum immunoglobulin E concentrations in West Highland white terrier puppies do not predict development of atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, **10**: 275-281.
- Deaton CM, Deaton L, Jose-Cunilleras E, Vincent TL, Baird AW, Dacre K & Marlin DJ (2007) Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse. *J Appl Physiol*, **102**: 1071-1077.
- Divers TJ (2014) Adverse Drug Reactions, Air Emboli, and Lightning Strike. In *Equine Emergencies: Treatment and Procedures* ed. Orsini JA & Divers TJ, Elsevier Saunders, St. Louis, ISBN: 9780323443296, pp. 812-816.
- Dixon PM & McGorum B (1990) Pasture-associated seasonal respiratory disease in two horses. *Vet Rec*, **126**: 9-12.
- Dowling PM (2004). Antimicrobial therapy . In *Equine Internal Medicine* ed. Reed SM, Bayly WM & Sellon DC, Elsevier, St. Louis, ISBN: 9780323443296, pp. 186-220.
- Eder C, Cramer R, Mayer C, Eicher R, Straub R, Gerber H, Lazary S. & Marti E (2000) Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. *Vet Immunol Immunopathol*, **73**: 241-253.
- Fadok VA & Greiner EC (1990) Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data. *Equine Vet J*, **22**: 236-240.
- Fadok VA (2003) Overview of equine pruritus. *Vet Clin North Am*, **11**: 427-449.
- Fadok VA (2013) Update on Equine Allergies. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **29**: 541-550.
- Fadok VA (2014) Equine atopic dermatitis: pathogenesis. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 329-333.
- Fadok VA (2014) Equine urticaria. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 338-343.
- Felippe MJ (2016) The Immune System. In *Equine Clinical Immunology* ed. Felipe MJ, Wiley Blackwell, Ames, Iowa, EUA, ISBN: 9781118558874, pp. 1-10.
- Fleming K, Hessel EF & Van den Weghe HFA (2008) Generation of airborne particles from different bedding materials used for horse keeping. *J Equine Vet Sci*, **28**: 408-418.

- Foster AP, McKelvie J & Cunningham FM (1998) Inhibition of antigen-induced cutaneous responses of ponies with insect hypersensitivity by the histamine-1 receptor antagonist chlorpheniramine. *Vet Rec*, **143**: 189-193.
- Francqueville M & Sabbah A (1999) Chronic urticaria in sports horses . *Allergie et immunologie*, **31**: 212-213.
- Francqueville M & Sabbah A (2004) Recurrent or chronic urticaria in thoroughbred race-horses. *Eur ann of allergy clin immunol*, **36**: 9-12.
- Frey R, Bergvall K & Egenvall A (2008) Allergen-specific IgE in Icelandic horses with insect bite hypersensitivity and healthy controls, assessed by FcεRIα-based serology. *Vet Immunol Immunopathol*, **126**: 102-109.
- Gerber H (1989) The genetic basis of some equine diseases. *Equine Vet J*, **21**: 244-248.
- Gerber V (2014). Recurrent Airway Obstruction and Inflammatory Airway Disease. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 373-383.
- Gerber V, Swinburne JE, Blott SC, Nussbaumer P, Ramseyer A, Klukowska-Rötzer J, Dof G, Marti E, Burger D & Leeb T (2008) Genetics of recurrent airway obstruction (RAO). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **121**: 271-275.
- Gigante G, Tortora A, Ianiro G, Ojetti V, Purchiaroni F, Campanale M, Cesario V, Scarpellini E & Gasbarrini A (2011) Role of Gut Microbiota in Food Tolerance and Allergies. *Dig Dis*, **29**: 540-549.
- Ginel PJ, Hernández E, Lucena R, Blanco B, Novales M & Mozos E (2014) Allergen-specific immunotherapy in horses with insect bite hypersensitivity: a double-blind, randomized, placebo-controlled study . *Vet Dermatol*, **25**: 29-e10.
- Gregory LG & Lloyd CM (2011) Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*, **32**: 402-411.
- Hallebeek AJ & Oldruitenborgh-Oosterbaan MM (1995) "Oat-bumps" in horses. Differential diagnosis and nutritional aspects. *Tijdschr Diergeneeskde*, **120**: 588-591.
- Hamza E, Steinbach F & Marti E (2011) CD4+CD25+ T cells expressing FoxP3 in Icelandic horses affected with insect bite hypersensitivity . *Vet Immunol Immunopathol*, **148**: 139-144.
- Hamza E, Torsteinsdottir S, Eydal M, Frey CF, Mirkovitch J, Brcic M, Wagner B, Wilson AD, Jungi TW & Marti E (2010) Increased IL-4 and decreased regulatory cytokine production following relocation of Icelandic horses from a high to low endoparasite environment. *Vet Immunol Immunopathol*, **133**: 40-50.

Hamza E, Wagner B, Jungi TW, Mirkovitch J & Marti E (2008) Reduced incidence of insect-bite hypersensitivity in Icelandic horses is associated with a down-regulation of interleucin-4 by interleucin-10 and tranforming growth factor- β 1. *Vet Immunol Immunopathol*, **122**: 65-75.

Heinmann M, Janda J & Sigurdardottir OG (2011) Skin-infiltrating T cells and cytokine expression in Icelandic horses affected with insect bite hypersensitivity: a possible role for regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol*, **140**: 63-74.

Hoffman AM, Mazan MR & Ellenberg S (1998) Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res*, **59**: 176-181.

Horohov DW, Beadle RE, Mouch S & Pourciau SS (2005) Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol*, **108**: 237-245.

Hurcombe SD, Mudge MC & Hinchcliff KW (2007) Clinical and clinicopathologic variables in adult horses receiving blood transfusions: 31 cases (1999-2005). *J Am Vet Med Assoc*, **231**: 267-274.

Jensen-Jarolim E, Einhorn L, Herrmann I, Thalhammer JG & Panakova L (2015) Pollen Allergies in Humans and their Dogs, Cats and Horses: Differences and Similarities. *Clin Transl Allergy*, **5**: 5-15.

Johnson PJ, Slight SH, Ganjam VK & Kreeger JM (2002) Glucocorticoids and laminitis in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **18**: 219-236.

Jonsdottir S, Cvitas I, Svansson V, Fettelschloss-Gabriel A, Torsteinsdottir S & Marti E (2019) New Strategies for Prevention and Treatment of Insect Bite Hypersensitivity in Horses. *Vet Dermatol*, **8**: 303-312.

Kalina WV, Pettigrew HD & Gershwin LJ (2003) IgE ELISA using antisera derived fom epsilon chain antigenic peptides detects allergen-specific IgE in allergic horses. *Vet Immunol Immunopathology*, **92**: 137-147.

Kehrli D, Jandova V, Fey K, Jahn P & Gerber V (2015) Multiple hypersensitivities including recurrent airway obstruction, insect bite hypersensitivity, and urticaria in 2 warmblood horse populations. *J Vet Intern Med*, **29**: 320-326.

Kim JS & Sampson HA (2012) Food allergy: a glimpse into the inner workings of gut immunology. *Curr Opin Gastroenterol*, **28**: 99-103.

King SS, Abughazaleh AA & Webel SK (2008) Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. *J Anim Sci*, **86**: 1114-1123.

Kirschvink N, Di Silvestro F, Sbai I, Vandenput S, Art T, Roberts C & Lekeux P (2002) The Use of Cardboard Bedding Material as Part of an Environmental Control Regime for Heaves-affected Horses: In Vitro Assessment of Airborne Dust and Aeroallergen Concentration and In Vivo Effects on Lung Function. *Vet J*, **163**: 319-325.

- Kleiber C, Grunig G, Jungi T, Schmucker N, Gerber H, Davis WC & Straub R (1999) Phenotypic analysis of bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in horses with chronic pulmonary disease. *J Vet Med A*, **46**: 177-184.
- Knottenbelt, D.C. (2009) Reaching a Diagnosis in Equine Dermatology. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association*. Guarujá, São Paulo, Brasil: IVIS.
- Koblinger K, Nicol J, McDonald K, Wasko A, Logie N, Weiss M & Leguillette R.(2011) Endoscopic assessment of airway inflammation in horses . *J Vet Intern Med*, **25**: 1118-1126.
- Kolm-Stark G & Wagner B (2002) Intradermal skin testing in Icelandic horses in Austria. *Equine Vet J*, **34**: 405-410.
- Kunzle F, Gerber V, Van der Haegen A, Wampfler B, Straub R & Marti E (2007) IgE-bearing cells in bronchoalveolar lavage fluid and allergen-specific IgE levels in sera from RAO-affected horses. *J Vet Med A*, **54**: 40-47.
- Laan TT, Bull S, Pirie RS & Fink-Gremmels J (2006) The anti-inflammatory effects of IV administered clenbuterol in horses with recurrent airway obstruction. *Vet J*, **171**: 429-437.
- Langner KF, Darpel KE, Drolet BS, Fischer A, Hampel S, Heselhaus JE, Mellor PS, Mertens PC & Leibold W (2008) Comparison of cellular and humoral immunoassays for the assessment of summer eczema in horses. *Vet Immunol Immunopathol*, **122**: 126-137.
- Lanz S, Brunner A, Graubner C, Marti E & Gerber V (2017) Insect Bite Hypersensitivity in Horses is Associated with Airway Hyperreactivity. *J Vet Intern Med*, **31**: 1877-1883.
- Larsen HJ, Bakke SH & Mehl R (1988) Intradermal challenge of Icelandic horses in Norway and Iceland with extracts of *Culicoides* spp. *Acta Vet Scandinavia*, **29**: 311-314.
- Lavoie JP (2007) Recurrent airway obstruction (heaves) and summer-pasture-associated obstructive pulmonary disease. In *Equine respiratory medicine and surgery* ed. McGorum B, Dixon PM, Robinson NE & Schumacher J, Elsevier Saunders, Philadelphia, EUA, ISBN: 9780702027598, pp. 565-589.
- Lavoie JP, Divers TJ & Bain FT (2014) Respiratory System: Respiratory Tract Emergencies. In *Equine Emergencies: Treatment and Procedures* ed. Orsini JA & Divers TJ, Elsevier Saunders, St. Louis, ISBN: 9781455708925, pp. 461-484.
- Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, Wagner B & Lavoie JP (2012) Markers of Systemic Inflammation in Horses with Heaves. *J Vet Intern Med*, **26**: 1419-1426.
- Lebis C, Bourdeau P & Marzin-Keller F (2002) Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses. *Equine Vet J*, **34**: 666-672.

- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A & Lavoie JP (2011) Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*, **16**: 1027-1046.
- Lieberman P (2006) Anaphylaxis. *Med Clin North Am*, **26**: 77-95.
- Liphook Equine Hospital. (2016) *Laboratory: Laboratory services: Dermatology*. Obtido de Liphook Equine Hospital: <https://liphookequinehospital.co.uk/wp-content/uploads/Investigating-Allergic-Skin-Disease.pdf>, consultado em 15 de Maio de 2019.
- Littlewood JD (2014) Clinical manifestations of Culicoides hypersensitivity. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 287-290.
- Lloyd DH, Littlewood JD, Craig JM & Thomsett LR (2003) Pruritus. In *Practical Equine Dermatology* ed. Lloyd DH, Littlewood JD, Craig JM & Thomsett LR, Blackwell Publishing, Oxford, UK, ISBN: 9780632048076, pp. 9-24.
- Lorsch G, Hillier A, Kwochka KW, Saville WA & LeRoy BE (2001a) Results of intradermal tests in horses without atopy and horses with atopic dermatitis or recurrent urticaria. *Am J Vet Res*, **62**: 1051-1059.
- Lorsch G, Hillier A, Kwochka KW, Saville WJ, Kohn CW & Jose-Cunilleras E (2001b) Results of intradermal tests in horses without atopy and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res*, **62**: 389-397.
- Lorsch G, Hillier A, Kwochka KW, Saville WJ, Kohn CW & LeRoy BE (2001c) Comparison of immediate intradermal test reactivity with serum IgE quantitation by use of a radioallergosorbent test and two ELISA in horses with and without atopy. *J Am Vet Med Assoc*, **218**: 1314-1322.
- Louzada P, Oliveira FR & Sarti W (2003) Anafilaxia e Reações Anafilactóides. *Simpósio: Urgências e Emergências Imunológicas*, 399-403.
- Marks SL, Merchant S & Foil C (2001) Pentoxifylline: wonder drug? *J Am Anim Hosp Assoc*, **37**: 218-219.
- Marsella R (2013) Equine allergy therapy: update on the treatment of environmental, insect bite hypersensitivity, and food allergies. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **29**: 551-557.
- Marsella R, Olivry T & Carlotti DN (2011) Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, **22**: 239-248.
- Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehia J & Lazary S (1991) The genetic basis of equine allergic disease 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J*, **23**: 457-460.
- Marti E, Wang X, Jambari NN, Rhyner C, Olzhausen J, Pérez-Barea JJ, Figueredo GP & Alcocer MJ (2015) Novel in vitro diagnosis of equine allergies using a protein array and mathematical

modelling approach: A proof of concept using insect bite hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol*, **167**: 171-177.

Marti E, Gerber V, Wilson AD, Lavoie JP, Horohov D, Cramer R, Lunn DP, Antczak D, Björnsdóttir S, Björnsdóttir TS, Cunningham F, Dérer M, Frey R, Hamza E, Horin P, Heimann M, Kolm-Stark G, Ólafsdóttir G, Ramery E, Russell CL, Schaffartzik A, Svansson V, Torsteinsdóttir S & Wagner B (2008) Report of the 3rd Havemayer workshop on allergic diseases of the horse. *Vet Immunol Immunopathol*, **126**: 351-361.

Martins L, Bento O & Inácio F (2016) Veterinary allergy diagnosis: past, present and future perspectives. *Allergo J Int*, **25**: 20-32.

McGorum BC, Dixon PM & Halliwell REW (1993) Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary-disease, before and after natural (hay and straw) challenges. *Vet Immunol Immunopathol*, **36**: 223-237.

McGorum BC, Nicholas DR, Foster AP, Shaw DJ & Pirie RS (2013) Bronchodilator activity of the selective muscarinic antagonist revatrope in horses with heaves. *Vet J*, **195**: 80-85.

Mellor PS, Boorman J & Baylis M (2000) Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Ann Rev Entomol*, **45**: 307-340.

Miyazawa K, Ito M & Ohsaki K (1991). An equine case of urticaria associated with dry garlic feeding. *J Vet Med Sci*, **53**: 747-748.

Morgan EE, Miller WH & Wagner B (2007) Comparison of intradermal testing and detection of allergen-specific immunoglobulin E in serum by enzyme-linked immunosorbent assay in horses affected with skin hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol*, **120**: 160-167.

Mueller RS, Janda J, Jensen-Jarolim E, Rhyner C & Marti E (2016) Allergens in veterinary medicine. *Allergy*, **71**: 27-35.

Nes AMT, Kort HSM, Koren LGH, Pernot CEE, Schellen HL, Boven FE & Bronswijk JE (1993) The abundance of house dust mites (Pyroglyphidae) in different home textiles in Europe, in relation to outdoor climates, heating and ventilation. *Proceedings of the 1st International Congress on Insect Pests in the Urban Environment*, 229-239.

Neuhaus S, Bruendler P, Frey CF, Gottstein B, Doherr MG & Berber V (2011) Increased parasite resistance and recurrent airway obstruction in horses of a high-prevalence family. *J Vet Intern Med*, **24**: 407-413.

Novak N & Leung DYM (2011) Advances in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol*, **26**: 778-783.

Olsén L, Bondesson U, Bronstöm H, Olsson U, Mazogi B, Sundgvist M, Tjälve H & Ingvast-Larsson C (2011) Pharmacokinetics and effects of cetirizine in horses with insect bite hypersensitivity. *Vet J*, **187**: 347-351.

- Olsén L, Bondesson U, Bronstöm H, Tjälve H & Ingvast-Larsson C (2008) Cetirizine in horses: pharmacokinetics and pharmacodynamics following repeated oral administration. *Vet J*, **177**: 242-249.
- O'Neill W, McKee S & Clarke AF (2002) Flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation associated with reduced skin test lesional area in horses with *Culicoides* Hypersensitivity. *Can J Vet Res*, **66**: 272-277.
- Pali-Schöll I, Herrmann I, Jensen-Jarolim E & Iben C (2017). Allergies, with Focus on Food Allergies, in Humans and Their Animals. In *Comparative Medicine, Disorders linking humans with their animals* ed. Jensen-Jarolim E, Springer International Publishing, Switzerland, ISBN: 9783319836362, pp. 109-129.
- Papadopoulos E, Rowlinson M, Bartram D, Carpenter S, Mellor P & Wall R (2010) Treatment of horses with cypermethrin against the biting flies *Culicoides nubeculosus*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Vet Parasitol*, **169**: 165-171.
- Peroni DL, Stanley S, Kollias-Baker C & Robinson NE (2002) Prednisone per os is likely to have limited efficacy in horses. *Equine Vet J*, **34**: 283-287.
- Perris EE (1995) Parasitic Dermatoses that Cause Pruritus in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **11**: 11-28.
- Pirie RS (2013) Recurrent airway obstruction: A review. *Equine Vet J*, **46**: 276-288.
- Pirie RS, Dixon PM, Collie DD & McGorum BC (2001) Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*, **33**: 311-318.
- Radcliffe RM (2016) Anaphylaxis. In *Equine Clinical Immunology* ed. Felipe MJ, Wiley Blackwell, Ames, Iowa, EUA, ISBN: 9781118558874, pp. 31-38.
- Radwanski N, Morris DO & Boston R (2011) A prospective evaluation of clinical and immunological responses to allergen-specific immunotherapy in horses with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, **23**: 42.
- Ramseyer A, Gaillard C, Burger D, Straub R, Jost U, Boog C, Marti E & Gerber V (2007) Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *J Vet Intern Med*, **21**: 149-156.
- Rede Portuguesa de Aerobiologia – Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica, obtido de <https://www.rpaerobiologia.com/>, consultado em 27 de setembro de 2019.
- Rees C (2005) Diagnosing and Managing Equine Pruritus: Insect Hypersensitivity. *Comp cont edu Pract*, **27**: 629-636.
- Rees CA (2001) Response to immunotherapy in six related horses with urticaria secondary to atopy. *J Am Vet Med Assoc*, **218**: 753-755.

- Rivero JLL, Breda E, Rogers CW, Lindner A & Oldruitenborgh-Oosterbaan MM (2008) Unexplained underperformance syndrome in sport horses: Classification, potential causes and recognition. *Equine Vet J*, **40**: 611-618.
- Robinson NE (2007) How horses breathe: the respiratory muscles and the airways. In *Equine respiratory medicine and surgery* ed. McGorum B, Dixon NE, Robinson NE & Schumacher J, Elsevier Saunders, Philadelphia, EUA, ISBN: 9780702027598, pp. 19-31.
- Robinson NE, Berney C, Eberhart S, Feijter-Rupp HL, Jefcoat AM, Cornelisse CJ, Gerber VM & Derksen FJ (2003) Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, **64**: 550-557.
- Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA & Buechner-Maxwell VA (1996) The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J*, **152**: 283-306.
- Rosenkrantz W & White S (2014) Clinical aspects of equine atopic disease. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C & Foster A, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 334-337.
- Rosenkrantz W & White S (2014) Diagnostic workup of equine atopic disease. In *Veterinary Allergy* ed. Noli, C. & Foster, A., Wiley Blackwell, West Sussex, UK, pp. 353-359.
- Rosenkrantz, W. & White, S. (2014) Equine atopic disease symptomatic therapy and allergen-specific immunotherapy. In *Veterinary Allergy* ed. Noli, C. & Foster, A., Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 360-370.
- Samlaska CP & Winfield EA (1994) Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol*, **30**: 603-621.
- Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Bock SA, Branum A, Brown SGA, Camargo CA Jr, Cydulka R, Galli SJ, Gidudu J, Gruchalla RS, Harlor AD Jr, Hepner DL, Lewis LM, Lieberman PL & Metcalfe DD (2006) Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report-second national institute of allergy and infectious disease/food allergy and anaphylaxis network symposium. *J Allergy Clin Immunol*, **117**: 391-397.
- Schaer BD & Orsini JA (2014) Respiratory System: Diagnostic and Therapeutic Procedures. In *Equine Emergencies: Treatment and Procedures* ed. Orsini JA & Divers TJ, Elsevier Saunders, St. Louis, ISBN: 9781455708925, pp. 450-460.
- Schaffartzik A, Hamza E, Janda J, Cramer R, Marti E & Rhyner C (2012). Equine insect bite hypersensitivity: What do we know? *Vet Immunol Immunopathol*, **147**: 113-126.
- Scharrenberg GV, Swinburne JE, Wilson AD, Klukowska-Rötzler J, Laumen E & Marti E (2010) IgE, IgG_a, IgG_b and IgG(T) serum antibody levels in offspring of two sires affected with equine recurrent airway obstruction. *Anim Genet*, **42**: 131-137.
- Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HHL, Dixon PM, Halliwell REW, McGorum BC, Cramer R & Miller HRP (1998) Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and

IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol*, **66**: 245-256.

Scott DW & Miller WH (2011) Skin Immune System and Allergic Skin Diseases. In *Equine Dermatology* ed. Scott DW & Miller WH, Elsevier Saunders, Missouri, EUA, ISBN: 9781437709209, pp. 263-313.

Shaw SC, Wood JLN & Freeman J (2004) Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Am J Vet Res*, **65**: 1014-1020.

Simons FER (2013) Anaphylaxis: the acute episode and beyond. *Br Med J*, **346**: 1-10.

Sloet van Oldruitenborgh-Oosterban MM, van Poppel M, Raat IJ, van den Boom R & Savelkoul HF (2009) Intradermal testing of horses with and without insect bite hypersensitivity in the Netherlands using an extract of native *Culicoides* species. *Vet Dermatol*, **20**: 607-614.

Steinman A, Peer G, Klement E (2003) Epidemiological study of *Culicoides* hypersensitivity in horses in Israel. *Vet Rec*, **152**: 748-751.

Stepnik CT, Outerbridge CA, White SD & Kass PH (2011) Equine atopic skin disease and response to allergen-specific immunotherapy: a retrospective study at the University of California-Davis (1991-2008). *Vet Dermatol*, **23**: 29-35.

Swiderski C (1995). Hypersensitivity. In *The Horse: Diseases and Clinical Management* ed. Kobluk CN, Ames TR & Geor RJ, Saunders, Philadelphia, EUA, ISBN: 9780721659398, pp. 1065-1072.

Tahon L, Baselgia S, Gerber V, Doherr MG, Straub R, Robinson NE & Marti E (2009) In vitro allergy tests compared to intradermal testing in horses with recurrent airway disease. *Vet Immunol Immunopathol*, **127**: 85-93.

Taketomi EA, Sopenete MC, Moreira PF & Vieira FM (2006) Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Rev Bras Otorrinolaringol*, **72**: 562-567.

Tallarico NJ & Tallarico C (1998) Results of intradermal allergy testing and treatment by hyposensitization of 64 horses with chronic obstructive pulmonary disease, urticaria, headshaking, and/or reactive airway disease. *Vet Allergy Clin Immunol*, **6**: 25-35.

Tilley, P. (2011) Contribution to the staging and immunological study of equine recurrent airway disease (RAO). Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias: Especialidade Clínica. Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.

Tilley P, Luís JP & Ferreira MB (2010) Testes cutâneos por picada (TCP) na obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) equina. *Rev Port Imunoalergol*, **18**: 561-584.

Tilley P, Sales JP & Ferreira MB (2012) Comparison of Skin Prick Tests (SPT) with two In vitro allergy tests in the characterization of horses with Recurrent Airway Obstruction (RAO). *J Equine Vet Sci*, **32**: 719-727.

Tizard IR (2013) B Cells and Their Response to Antigens. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 150 - 164.

Tizard IR (2013) Dendritic Cells and Antigen Processing. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 91-101.

Tizard IR (2013) Helper T Cells and Their Response to Antigen. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 137 - 149.

Tizard IR (2013) Immune Complexes and Type III Hypersensitivity. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 355-364.

Tizard IR (2013) Innate Immunity: Macrophages and Recovery from Inflammation. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 41-51.

Tizard IR (2013) Innate Immunity: Neutrophils and Phagocytosis. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 30-40.

Tizard IR (2013) Innate Immunity: Proinflammatory and Antimicrobial Mediators. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 21-29.

Tizard IR (2013) Innate Immunity: Recognition of Invaders. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 11-20.

Tizard IR (2013) Innate Immunity: The Complement System. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 61-73.

Tizard IR (2013) Lymphocytes. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 127-136.

Tizard IR (2013) Organs of the Immune System. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 113-126.

Tizard IR (2013) The Defense of the Body. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 1-6.

Tizard IR (2013) The Major Histocompatibility Complex. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 102-112.

Tizard IR (2013) Type I Hypersensitivity. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 326-345.

- Tizard IR (2013) Antibodies: Soluble Antigen Receptors. In *Veterinary Immunology* ed. Tizard IR, Elsevier Saunders, St.Louis, Missouri, EUA, ISBN: 9781455703623, pp. 165-174.
- Van der Haegen A, Kunzle F, Gerber V, Welle M, Robinson NE & Marti E (2005) Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses. *Vet Immunol Immunopathol*, **108**: 325-334.
- van der Meide MA, Meulenbroeks C, Schurink A, Ducro BJ, Wagner B, Leibold W, Rohwer J, Jacobs F, Oldruitenborgh-Oosterbaan MS, Savelkoul HF & Tijhaar E (2012) Culicoides obsoletus extract relevant for diagnostics of insect bite hypersensitivity in horses. *Vet Immunol Immunopathol*, **149**: 245-254.
- Verdon M, Lanz S, Rhyner C, Gerber V & Marti E (2018) Allergen-specific immunoglobulin E in sera of horses affected with insect bite hypersensitivity, severe equine asthma or both conditions. *J Vet Intern Med*, **33**: 266-274.
- Vitte J & Bongrand P (2013) Serum tryptase determinations in patients with acute allergic reactions . *J Allergy Clin Immunol*, **131**: 1714-1715.
- Wagner B (2009) IgE in horses: Occurrence in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol*, **132**: 21-30.
- Wagner B (2014) Pathogenesis and epidemiology of Culicoides hypersensitivity. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C & Foster A, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 275-278.
- Wagner B (2016) Allergy. In *Equine Clinical Immunology* ed. Felipe MJ, *Equine Clinical Immunology*, Wiley Blackwell, Ames, Iowa, EUA, ISBN: 9781118558874, pp. 39-45.
- Wagner B, Burton A & Ainsworth DM (2010) Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet Res*, **41**: 47.
- Wagner B, Miller WH, Erb HN, Lunn DP & Antczak DF (2009) Sensitization of skin mast cells with IgE antibodies to Culicoides allergens occurs frequently in clinically healthy horses. *Vet Immunol Immunopathol*, **132**: 53-61.
- Wagner B, Miller WH, Morgan EE, Hillegas JM, Erb HN, Leibold W & Antczak DF (2006) IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. *Vet Res*, **37**: 813-825.
- Watson JL, Stott JL, Blanchard MT, Lavoie JP, Wilson WD, Gershwin LJ & Wilson DW (1997) Phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease and in normal controls. *Vet Pathol*, **34**: 108-116.
- White SD (2005) Advances in Equine Atopic Dermatitis, Serologic and Intradermal Allergy Testing. *Clin Tech Equine Pract*, **24**: 311-313.

World Health Organization (Setembro de 2017). *Features/QA's*. Obtido de <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>, consultado em 5 de Agosto de 2019.

Yates RM (2014). Acute Inflammation. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 67-87.

Yates RM (2014) Innate Cellular Effect Mechanisms. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 89-106.

Yates RM (2014) Innate Immune Recognition. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 37-50.

Yates RM (2014) Overview of Innate Immune System. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 17-35.

Yates RM (2014) The Complement System. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan GN & Yates RM, Boulder, Colorado, EUA, ISBN: 9781607322184, pp. 53-64.

Yu AA (2014) Culicoides hypersensitivity: therapy. In *Veterinary Allergy* ed. Noli C & Foster A, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 9780470672419, pp. 297-305.

Ziegler A, Hamza E, Jonsdottir S, Rhyner C, Wagner B, Schüpbach G, Svansson V, Torsteinsdottir S & Marti E (2017) Longitudinal analysis of allergen-specific IgE and IgG subclasses as potential predictors of insect bite hypersensitivity following first exposure to Culicoides in Icelandic horses. *Vet Dermatol*, **29**: 51-e22

Anexos

Anexo A

Caracterização da população de equinos dos dois grupos do presente estudo.

GRUPO CONTROLO						
CII	Idade	Sexo	Raça	Ambiente	Alimentação	
22	21	F	X PSI	A campo	Feno e erva	
23	12	F	X PSL	A campo	Feno e erva	
24	7	F	X PSL	A campo	Feno e erva	
25	11	F	X PSL	A campo	Feno e erva	
26	25	F	X PSL	A campo	Feno e erva	
27	10	F	X PSL	A campo	Feno e erva	
28	11	F	X PSL	A campo	Feno e erva	

GRUPO ALÉRGICO									
CII	Idade	Sexo	Raça	Ambiente	Tipo Sx	Alimentação	Se grosseiro, molhado?	De onde come?	Ventilação adequada?
1	11	F	X árabe	A campo	Derma	Erva		Chão	
2	10	F	X árabe	A campo	Derma	Erva		Chão	
3	5	MC	X árabe	A campo	Resp	Feno e Ração	Não	Chão	
4	18	F	X árabe	A campo	Derma	Feno/Luzerna/Erva	Não	Comedouro	
5	8	MC	PSL	Estabulado	Derma	Feno/Ração/Outros	Não	Chão	Sim
6	9	F	PSL	A campo	Resp	Feno e Ração	Não	Chão	
7	14	MC	X português	A campo	Derma	Feno/Ração/Erva	Não	Chão	
8	20	MC	X português	A campo	Mista	Feno/Ração/Erva	Não	Chão	
9	23	MI	X português	A campo	Derma	Feno/Ração/Outros	Não	Comedouro	
10	11	MC	X português	A campo	Derma	Feno/Ração/Outros	Não	Comedouro	
11	9	MC	X português	A campo	Derma	Feno/Ração/Outros	Não	Comedouro	
12	13	MC	X português	A campo	Resp	Feno/Ração/Outros	Não	Comedouro	
13	3	MI	PSL	A campo	Derma	Feno e Ração	Não	Chão	
14	15	MC	PSL	A campo	Resp	Feno e Ração	Não	Chão	
15	11	MC	PSL	Estabulado	Misto	Feno e Ração	Não	Chão	Não
16	8	F	PSL	Estabulado	Misto	Feno e Ração	Não	Chão	Sim
17	10	MC	PSL	Estabulado	Misto	Feno e Ração	Não	Chão	Não
18	15	MC	Cruzado	A campo	Derma	Feno/Luzerna/Erva	Não	Chão	
19	20	MC	Cruzado	A campo	Derma	Feno/Luzerna/Erva	Não	Chão	
20	29	MC	Cruzado	A campo	Derma	Feno/Luzerna/Erva	Não	Chão	
21	22	MC	Cruzado	A campo	Derma	Feno/Luzerna/Erva	Não	Chão	

Anexo B

Questionário realizado aos proprietários ou tratadores para levantamento da história progressa.

Questionário Individual Imunoalergológico

Data: _____ Ficha/Ref. nº: _____

1. Identificação do animal

Nome: _____

Sexo: _____ Raça: _____ Idade: _____

Pelagem: _____ Peso Aproximado: _____

2. Identificação Proprietário:

Nome: _____

Morada: _____

Contactos: _____

Email: _____

3. Vacinação e desparasitação:

Última vacinação com: _____ / Data: _____

Última desparasitação com: _____ / Data: _____

4. Alojamento:

Estabulado A campo Estabulado e a Campo

4.1. Se estabulado, apresenta ventilação adequada (passagem de ar por pelo menos 2 entradas de ar)?

Sim Não

4.2. Mudou recentemente de alojamento? Sim Não

4.3. Se sim, há quanto tempo? _____

4.4. Costuma ausentar-se do seu alojamento regular? Sim Não

5. Alimentação:

Feno Palha Luzerna Ração Cenouras Outro _____

5.1. O alimento grosseiro é molhado? Sim Não

5.2. O alimento é disponibilizado no:

Chão Comedouro Num ponto mais alto Outro _____

6. Ambiente de trabalho:

Picadeiro Interior Picadeiro Exterior Picadeiro coberto, mas aberto lateralmente

7. Exercício/Tipo de trabalho:

Mínimo (Éguas a campos) Moderado (Cavalos de passeio; ensino)

Máximo (obstáculos, endurance)

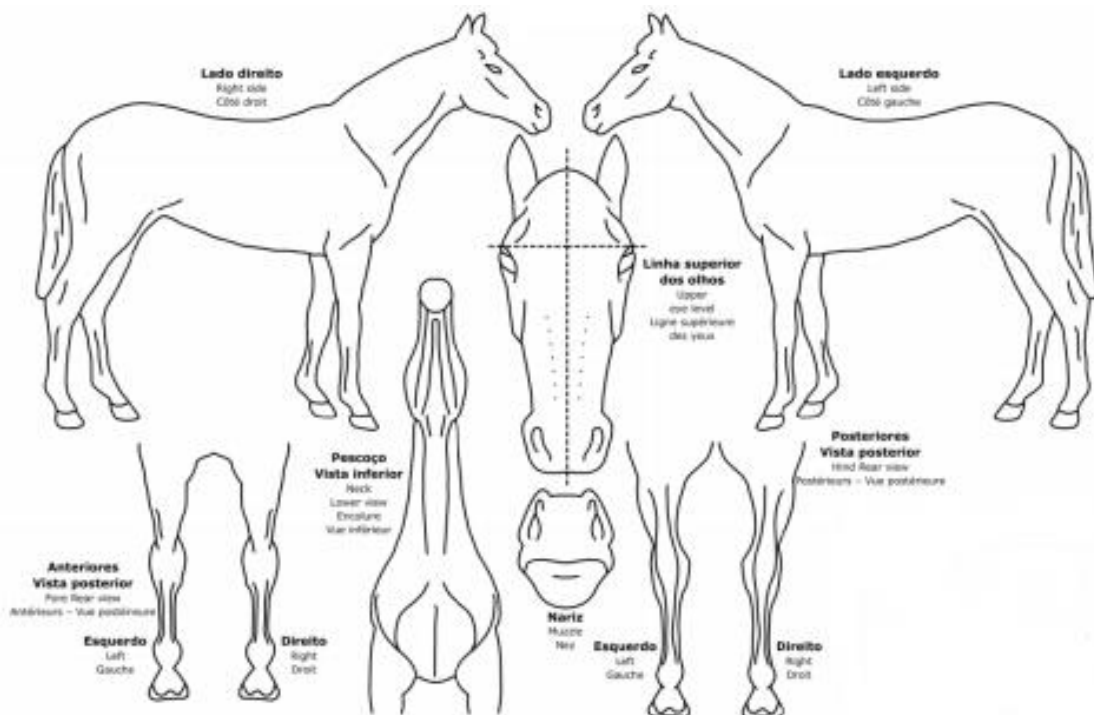
8. Sintomatologia que apresenta/apresentou compatível com resposta alérgica:

Manifestação cutânea Manifestação respiratória Ambas

8.1. Qual o tipo de manifestação cutânea?

Pápulas Prurido Alopecia Crostas

8.1.1. Localização das lesões cutâneas:



8.2. Qual o tipo de manifestação respiratória?

Tosse Dispneia/Taquipneia Rinorreia De que tipo? _____

Muco traqueal Espirros Respiração Abdominal

Auscultação pulmonar c/ alterações _____

8.3. Detalhes não incluídos atrás, com pertinência para o caso:

8.4. Efetuou algum tratamento ou foi tomada alguma ação profilática?

Sim Não

8.4.1. Se sim, qual e quando?

8.4.2. Resultados:

8.5. Realizou exames complementares anteriormente (por exemplo, lavagem broncoalveolar ou lavagem traqueal)?

Sim Não

8.5.1. Resultados:

Anexo C

Classificação atribuída a cada uma das reações cutâneas verificadas nos dois grupos.

GRUPO CONTROLO																	
CODE	FA	Aa	Af	GS	Qi	Dg	Pp	CI	CII	Pj	Dp	Df	Ld	As	Tp	Em	Culicoides
22		1				1	1			1					1		2
23																	1
24													1				
25																	
26																	2
27																	
28																	

GRUPO ALÉRGICO																	
CODE	FA	Aa	Af	GS	Qi	Dg	Pp	CI	CII	Pj	Dp	Df	Ld	As	Tp	Em	Culicoides
1		1										1	1	2			2
2	1	1		1							2				2		
3	3										1	1					
4		1	1													2	
5												3		2	3		1
6	2						1		1					2		1	
7	3	2									1				1		3
8			1						2				1				1
9	1							1				3			2	1	3
10										3					1	3	2
11										1		2				4	2
12		1							1				1			2	3
13		2						2		2				1	1	2	4
14				1					1	1		1	1	2	2		
15		2	1						1								
16		2															3
17			2									1	1				3
18													3				2
19		1						1								1	2
20										2							
21			1				2	1									1

Anexo D - Resultados dos testes de correlação de Spearman entre os diferentes extratos alérgicos (existe correlação significativa para um $p\text{-value} \leq 0,1$).

Fungos aero.	A. Alternata	Aspergillus fumigatus	Gramineas selvagens	Quercus ilex	D. glomerata	Phleum pratense	Cizânias I	Cizânias II	Parietária judaica	D. pteronyssinus	D. farinae	L. destructor	A. Siro	T. putrescentiae	Euroglyphus maynei	Culicoides
Correlation Coefficient	1,000	-0,100	0,316	0,316	0,316	0,316	0,316	-0,060		0,775	-0,100	-0,598	-0,316	0,350	0,158	-0,350
Sig. (2-tailed)		0,798	0,407	0,407	0,407	0,407	0,407	0,879		0,024	0,798	0,089	0,407	0,356	0,685	0,356
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	9	9	9	9	9	9
Correlation Coefficient	-0,100	0,032	0,047	0,047	-0,281	-0,281	0,070	-0,122	-0,228	0,293	-0,408	-0,122	-0,332	0,000	0,113	0,000
Sig. (2-tailed)	0,798	0,890	0,840	0,840	0,217	0,763	0,589	0,433	0,356	0,066	0,066	0,599	0,890	1,000	0,625	1,000
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	-0,598	-0,032	0,089	0,089	0,200	0,014	0,141	0,141	-0,258	-0,333	-0,158	0,141	-0,313	-0,395	-0,208	-0,079
Sig. (2-tailed)	0,089	0,890	0,431	0,431	0,386	0,953	0,541	0,373	0,290	0,290	0,494	0,541	0,168	0,076	0,365	0,733
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	0,316	0,047	0,407	0,407	-0,105	-0,157	0,154	0,154	0,194	0,522	0,115	0,154	0,200	0,459	-0,255	-0,459
Sig. (2-tailed)	0,407	0,840	0,431	0,431	0,650	0,486	0,505	0,507	0,507	0,082	0,621	0,505	0,386	0,036	0,266	0,036
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient																
Sig. (2-tailed)																
N	1	13	13	13	5	13	13	13	6	4	13	13	13	13	13	13
Correlation Coefficient																
Sig. (2-tailed)																
N	0	5	5	5	5	5	5	5	5	0	2	5	5	5	5	5
Correlation Coefficient	0,316	-0,281	0,200	-0,105	1,000	0,256	0,154	-0,175	-0,175	-0,258	-0,229	-0,205	0,200	-0,229	0,080	-0,115
Sig. (2-tailed)	0,407	0,217	0,386	0,650	0,263	0,505	0,549	0,418	0,372	0,372	0,317	0,386	0,317	0,317	0,732	0,621
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	0,316	0,070	0,014	-0,157	0,256	1,000	-0,307	0,194	0,194	-0,258	-0,086	-0,307	0,014	0,171	0,369	0,343
Sig. (2-tailed)	0,407	0,763	0,953	0,486	0,263	0,507	0,176	0,507	0,507	0,418	0,712	0,176	0,953	0,457	0,100	0,128
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	-0,060	-0,122	0,141	0,154	0,154	-0,307	1,000	-0,307	-0,307	-0,333	-0,224	0,300	0,141	-0,224	-0,062	-0,447
Sig. (2-tailed)	0,879	0,599	0,541	0,505	0,505	0,176	0,865	0,290	0,865	0,290	0,330	0,186	0,541	0,330	0,789	0,042
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient		-0,228	0,194	0,194	-0,175	0,194	-0,050	1,000	1,000	0,091	0,091	-0,050	0,189	0,316	0,316	0,141
Sig. (2-tailed)		0,433	0,373	0,507	0,549	0,507	0,865	0,865	0,865	0,756	0,756	0,330	0,163	0,163	0,163	0,143
N	9	14	14	14	0	14	14	14	14	8	14	14	14	14	14	14
Correlation Coefficient	0,775	0,293	-0,333	0,522	-0,258	-0,333	-0,333	-0,333	-0,333	1,000	0,111	-0,333	-0,333	-0,333	-0,333	-0,293
Sig. (2-tailed)	0,024	0,356	0,290	0,082	0,418	0,418	0,290	0,290	0,290	0,731	0,731	0,290	0,290	0,061	0,290	0,356
N	8	12	12	12	2	12	12	12	8	12	12	12	12	12	12	12
Correlation Coefficient	-0,100	-0,408	-0,158	0,115	-0,229	-0,086	-0,224	0,091	0,091	0,111	1,000	0,224	0,316	0,143	-0,139	0,071
Sig. (2-tailed)	0,798	0,066	0,494	0,621	0,317	0,712	0,330	0,796	0,796	0,731	0,330	0,330	0,163	0,537	0,549	0,758
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	-0,598	-0,122	0,141	0,154	-0,205	-0,307	0,300	-0,050	-0,050	-0,333	0,224	1,000	0,141	-0,224	-0,279	0,224
Sig. (2-tailed)	0,089	0,599	0,541	0,505	0,372	0,176	0,186	0,865	0,865	0,290	0,330	0,330	0,541	0,330	0,221	0,330
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	-0,316	-0,032	-0,313	0,200	0,200	0,014	0,141	0,189	0,189	-0,333	0,316	0,141	1,000	0,316	0,022	-0,079
Sig. (2-tailed)	0,407	0,890	0,168	0,386	0,386	0,953	0,541	0,519	0,519	0,290	0,163	0,541	0,163	0,163	0,925	0,733
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	0,350	0,000	-0,395	0,459	-0,229	0,171	-0,224	0,316	0,316	0,566	0,143	-0,224	0,316	1,000	0,069	0,071
Sig. (2-tailed)	0,356	1,000	0,076	0,036	0,317	0,457	0,330	0,271	0,271	0,061	0,537	0,330	0,163	0,061	0,765	0,758
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	0,158	0,113	-0,208	-0,255	0,080	0,389	-0,082	0,316	0,316	-0,333	-0,139	-0,279	0,022	0,069	1,000	0,139
Sig. (2-tailed)	0,685	0,625	0,365	0,266	0,732	0,100	0,769	0,271	0,271	0,290	0,549	0,221	0,925	0,069	0,069	0,459
N	9	21	21	21	5	21	21	21	14	12	21	21	21	21	21	21
Correlation Coefficient	-0,350	0,000	-0,079	-0,459	-0,115	0,343	-0,447	0,141	0,141	-0,293	0,071	0,224	-0,079	0,071	0,139	1,000
Sig. (2-tailed)	0,356	1,000	0,733	0,036	0,621	0,128	0,042	0,630	0,630	0,356	0,758	0,330	0,733	0,758	0,549	0,549
N	9	21	21	21	5	21	21	14	14	12	21	21	21	21	21	21

Significant at the 0.1 level (2-tailed).