

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ESTUDO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA E DA ENDOTELINA-1 COMO
MARCADORES DE LESÃO PULMONAR EM CAVALOS
DE TROTE COM HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA
POR EXERCÍCIO EM ESTEIRA DE ALTA VELOCIDADE**

JANAINA SOCOLOVSKI BIAVA

**Botucatu - SP
Dezembro/ 2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ESTUDO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA E DA ENDOTELINA-1 COMO
MARCADORES DE LESÃO PULMONAR EM CAVALOS
DE TROTE COM HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA
POR EXERCÍCIO EM ESTEIRA DE ALTA VELOCIDADE**

JANAINA SOCOLOVSKI BIAVA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, na Área de Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Biava, Janaina Socolovski.

Estudo da enzima conversora de angiotensina e da endotelina-1 como marcadores de lesão pulmonar em cavalos de trote com hemorragia pulmonar induzida por exercício em esteira de alta velocidade / Janaina Socolovski Biava. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Capes: 40101002

1. Cavalo – Doenças. 2. Pulmão – Hemorragia.

Palavras-chave: Biomarcadores de lesão pulmonar; ECA; ET-1; Hemorragia pulmonar induzida por exercício HPIE.

Janaina Socolovski Biava

**ESTUDO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA E DA ENDOTELINA-1 COMO
MARCADORES DE LESÃO PULMONAR EM CAVALOS
DE TROTE COM HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA
POR EXERCÍCIO EM ESTEIRA DE ALTA VELOCIDADE**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Simone Biagio Chiacchio

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rogério Martins Amorin

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

SCA - UFPR – PR

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes

Membro

Departamento de Clínica Médica

FMVZ - USP - SP

Botucatu, 5 de dezembro de 2011.

“A jornada é a recompensa”

Steve Jobs

DEDICATÓRIA

Jean Carlo Paisani,

*pelo amor e carinho, pelas inúmeras idas e vindas, por
apoiar-me em tudo que realizei tendo paciência pela minha
ausência, sem cobrar minha falta na família, assim como pelo
encorajamento durante horas boas e ruins em minha vida e,
principalmente, pela confiança depositada e oportunidade
oferecida;*

Tudo que conquistei devo a você...

Amo você!

A meus país,

*Aos meus país, Fiorindo e Leoní, por todo amor e apoio
nestes momentos; por ensinar-me o valor dos animais em minha
vida!*

Aos meus irmãos,

*Júlio, Kellen, Elín e Juliano que mesmo longe sempre
estiveram ao meu lado;*

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tem me proporcionado e também pela realização de mais um ideal;

Ao Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves, um sábio educador e amigo, pelo incentivo nas idéias mais difíceis e pela tranquilidade com que soluciona todos os problemas baseados em enorme conhecimento de vida e, pelo carinho inestimável;

Ao Prof. Dr. Laurent Coüetif, pela co-orientação e oportunidade destes novos desafios e pelo seu exemplo de luta, força de vontade e alegria de evoluir e principalmente pela preocupação com meu aprendizado pessoal e melhoria como ser humano, até acima do profissional;

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo pelo apoio, incentivo e palavras de conforto, sempre;

A maravilhosa equipe de pesquisa da Purdue University School of Veterinary Medicine, da qual tive a felicidade de conhecer e trabalhar: Peter Constable, Mark Hiew, Katy Ivester, Stacy Tinkler, Katie Smith pela incomensurável ajuda e seriedade na execução das pesquisas. Vocês me deram amizade, carinho e o

*imenso prazer de trabalhar em equipe. Com simplicidade,
determinação eu venci todas as minhas dificuldades, auxiliada
por vocês;*

*Aos funcionários da Purdue University: Donna Griffey e
Anisa D. Dunham , sempre muito prestativas, pela ajuda
incondicional oferecida, por entender minhas dificuldades com o
idioma e mesmo assim estar ao meu lado e, pelo auxílio na
logística do experimento;*

*Aos meus amigos especiais Ana Márcia e Ricardo pela
amizade, carinho e risadas assim como pelas críticas que
propiciaram maior aprofundamento e, em especial à Ana Márcia
pelos ensinamentos passados; muito obrigada pelo auxílio nesta
conquista e pela paciência;*

*Aos amigos, Andrea, Elaine, Rafael, Débora, Nielsen, Carla
e Gale Pitner por transformarem meus dias em dias harmoniosos,
tranqüilos e cheios de paz;*

*Aos funcionários da Pós-graduação da UNESP/Botucatu:
José Roberto de Lalla Júnior e Maria Aparecida de Almeida
Manoel pela paciência e ajuda prestada;*

*E aos cavalos, pela inestimável oportunidade de aprender e
pelo “companheirismo”;*

*À CAPES por propiciar a realização deste trabalho,
fornecendo a bolsa PDTE com a qual eu pude aprofundar meus
conhecimentos e enfrentar este novo desafio.*

LISTA DE QUADROS

	Paginas
Quadro 2. Exame físico dos cavalos de trote antes do teste de esforço máximo e depois da 13ª semana em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....	43
Quadro 3. Quantidade de sangue e muco observadas por exame endoscópico em três repetições a cada 2 semanas em cavalos de trote após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....	44
Lista de Quadros do Apêndice	
Quadro 1. Protocolo de treinamento padrão usado para o condicionamento físico dos cavalos de trote, West Lafayette/IN – 2011.....	93

LISTA DE TABELAS

	Paginas
Tabela 1	Médias e desvios-padrão de hemácias no LBA antes ou após teste de esforço máximo em esteira em cavalos de trote com e sem HPIE, West Lafayette/IN, 2011.....
	45
Tabela 2	Média e desvios-pradrão da concentração de hemoglobina antes e após teste de esforço máximo em esteira em cavalos de trote com e sem HPIE, West Lafayette/IN,2011.....
	46
Tabela 3	Médias e desvio-padrão da contagem leucocitária no LBA de cavalos de trote após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....
	46
Tabela 4	Médias e desvios-padrão de células nucleadas e da contagem percentual dos principais tipos celulares no LBA de cavalos de trote com e sem HPIE, West Lafayette/IN, 2011.....
	47
Tabela 5	Médias e desvios-padrão da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote (n=8) em amostras coletadas antes condicionamento físico (M0), antes (M1) e depois de 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....
	48
Tabela 6	Médias e desvio-padrão da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com e sem HPIE em amostras coletadas antes (M1) e 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....
	48
Tabela 7	Média e desvios-padrão da atividade de ECA no plasma de cavalos de trote com e sem HPIE em amostras coletadas antes (M1) e 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....
	51
Tabela 8	Média e desvios-padrão da atividade de ECA no plasma de cavalos de trote com e sem HPIE em amostras coletadas antes (M1) e 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....
	52

Lista de Tabelas do Apêndice

Tabela 9	Médias e desvios-padrão da contagem de hemácias no LBA antes do condicionamento físico e depois da 13ª semana onde os cavalos realizaram o teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, comparando-se os 8 animais independentemente de apresentarem HPIE, West Lafayette/IN – 2011.....	94
Tabela 10	Médias e desvios-padrão da concentração de hemoglobina antes do condicionamento físico e depois da 13ª semana onde os cavalos realizaram o teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, comparando-se os 8 animais independentemente de apresentarem HPIE, West Lafayette/IN, 2011.....	94

LISTA DE FIGURAS

	Paginas
Figura 1 Monitoramento cardíaco realizado durante o teste de esforço máximo com frequencímetro digital (Polar), em cavalos de trote - West Lafayette/IN, 2011.....	33
Figura 2 Exemplos fotográficos dos escores endoscópico em Graus para quantificar a presença de sangue e a severidade da HPIE nas vias aéreas, segundo Hinchcliff et al. (2005a).....	36
Figura 3 Escore endoscópico em Graus para quantificar muco nas vias aéreas, adaptado de Gerber et al. (2004).....	37
Figura 4 Fluxograma com sequencia cronológica do experimento.....	42
Figura 5 Correlação da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com o escore endoscópico aos 30 minutos depois do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.....	49
Figura 6 Correlação da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com a concentração de hemoglobina no LBA, West Lafayette, 2011.....	50
Figura 7 Correlação da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com contagem de hemácias no LBA, West Lafayette/IN, 2011.....	50
Figura 8 Correlação da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com contagem de hemácias no LBA, West Lafayette/IN, 2011.....	52
Figura 9 Correlação da atividade de ECA no plasma de cavalos de trote com a concentração de hemoglobina no LBA após 90 minutos da fadiga, West Lafayette/IN, 2011.....	53

LISTA DE ABREVIACÕES

μL	- Microlitros
$\Delta\text{absm}/\text{min}$	- Absorbância por minuto
ABZ	- <i>o</i> -aminobenzoic acid-FRK (Dnp) P-OH
DPOC	- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DVD	- Disco Digital Versátil
DVD	- Disco Digital Versátil
DO	- Densidade Óptica
ECA	- Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	- Etilenodiaminotetraacético
ET-1	- Endotelina tipo 1
FAPGG	- Furylacryloyl- phenylalanyl-glycyl-glycine
FC	- Frequência cardíaca
FR	- Frequência respiratória
HPIE	- Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício
IV	- Intravenoso
LBA	- Lavado Broncoalveolar
mL	- Mililitros
mmHg	- Milímetro de mercúrio
m/s	- Metro por segundo
n/m	- Nanometro
pg/mL	- Picograma por mililitros
ORVA	- Obstrução recorrente das vias aéreas
RIA	- Radioimunoensaio

TMB	- Dihidrocloreto de tetrametilbenzidina
U/L	- Unidade por litro
V200	- Velocidade de exercício na qual a frequência cardíaca está em 200bpm

SUMÁRIO

	Paginas
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xvi
RESUMO.....	xx
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3. OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.1. Objetivos Específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Animais.....	32
4.2. Teste Padrão de exercício Progressivo em Esteira de Alta Velocidade.....	33
4.3. Exame Endoscópico.....	34
4.4. Lavado Broncoalveolar (LBA)	37
4.5. Sangue.....	39
4.6. Biomarcadores de Injúria Pulmonar.....	40
4.6.1. Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)	40

4.6.2. Determinação de endotelina (ET-1)	41
4.7. Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Resultados do Exame Clínico, Endoscópico e Citológico do Aparelho Respiratório.....	43
5.1.1. Exame físico.....	43
5.1.2. Endoscopia.....	43
5.1.3. Lavado Broncoalveolar.....	45
5.2. Resultados do Biomarcadores.....	47
5.2.1. Endotelina tipo-1.....	47
5.2.2. Enzima conversora de angiotensina.....	51
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	62
8. REFERÊNCIAS.....	63
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	76
APÊNDICE.....	93

BIAVA, J. S. Estudo da enzima conversora de angiotensina e da endotelina-1 como marcadores de lesão pulmonar em cavalos de trote com hemorragia pulmonar induzida por exercício em esteira de alta velocidade. Botucatu, 2011. 94p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O termo hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) tem sido usado para descrever o sangramento de origem pulmonar associado à atividade física intensa. HPIE é considerada um dos maiores problemas em cavalos atletas devido ao grande impacto econômico causado pelo uso indiscriminado de produtos farmacológicos, custos com veterinários e descarte do animal. Esta síndrome mundialmente conhecida tem sido objeto de intensa discussão devido sua etiopatogenia incerta e tratamento controverso. O exame endoscópico é essencial instrumento no diagnóstico da HPIE e deve ser realizado 30 a 120 minutos após esforço físico intenso, tempo necessário para o sangue ser eliminado das vias aéreas distais.

O objetivo deste estudo foi mensurar potenciais marcadores plasmáticos de lesão pulmonar como a enzima conversora de angiotensina (ECA) e endotelina tipo 1 (ET-1), antes de iniciar condicionamento físico (M0); e depois do teste de esforço máximo (M1) e depois de 15 minutos após fadiga (M15) em esteira de alta velocidade em cavalos de trote com e sem HPIE. Oito cavalos de trote (4 fêmeas e 4 machos castrados) com idade de 3 a 5 anos (média de 4 anos de idade) foram incluídos neste estudo. A severidade da HPIE foi estabelecida em graus de 0 a 4 depois de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após fadiga, pelo exame traqueobrônquico por endoscopia, e pela contagem manual de hemácias e concentração de hemoglobina no lavado broncoalveolar (LBA) coletado 90 minutos após fadiga, na 13ª semana do experimento. A endoscopia determinou o grupo positivo e negativo para HPIE, sendo que três cavalos foram positivos para HPIE em três exames endoscópicos. A contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina estavam aumentadas no grupo positivo para

HPIE quando comparadas ao grupo negativo ajudando a determinar o grau de severidade observada ao exame endoscópico.

A atividade plasmática da ECA no grupo negativo para HPIE foram iguais a $50,60 \pm 8,69$ U/L no M1 e $70,46 \pm 15,08$ U/L no M15 e para o grupo positivo para HPIE $59,00 \pm 15,02$ U/L no M1 e $68,55 \pm 18,96$ U/L no M15. A atividade plasmática da ECA foi maior aos 15 minutos após a fadiga tanto no grupo positivo para a HPIE quanto no grupo negativo para HPIE. Diferença estatística pode ser mostrada quando se comparou os momentos antes do teste de esforço máximo (M1) e 15 minutos após fadiga (M15) ($p=0,0019$).

As concentrações plasmáticas de ET-1 no grupo negativo para HPIE foram iguais a $0,73 \pm 0,36$ pg/mL no M1 e $1,30 \pm 0,93$ pg/mL no M15 e para o grupo positivos $1,08 \pm 0,86$ pg/mL no M1 e $0,95 \pm 0,85$ pg/mL M15. As concentrações de ET-1 no plasma mensuradas antes do início do teste de esforço máximo não aumentaram no grupo positivo para HPIE e sim no grupo negativo.

De acordo com os resultados e nas condições do experimento a mensuração da ECA e de ET-1 não se mostrou adequada como biomarcadores específicos de lesão pulmonar em cavalos de trote com e sem HPIE.

Palavras-chaves: HPIE; ECA; ET-1; biomarcadores de lesão pulmonar; hemorragia pulmonar induzida por exercício; lavado broncoalveolar; marcadores; esteira.

BIAVA, J. S. **Study of angiotensin-converting enzym and endothelin-1 as markers of lung injury in trotting horses with Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage on high speed treadmill.** Botucatu, 2011. 94p. tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The term Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage (EIPH) has been used to describe the bleeding of pulmonary origin associated with physical activities of high-intensity. EIPH is considered one of the greatest problems in athlete horses due to the high economical impact caused by the indiscriminate use of pharmaceutical products, veterinary costs and disposal of the animal. This worldwide syndrome has been object of intense discussions because of its unclear etiopathogeny and controversial treatment. Endoscopic exam is an essential instrument to diagnose HPIE and it must be performed 30 to 120 minutes after intense physical exercise, the necessary amount of time for the blood to be eliminated from distal airways.

The objective of the present study was to measure potential markers of lung injury such as angiotensin-converting enzym (ACE) and endothelin-1 (ET-1), before the beginning of training (M0); and after maximum effort testing on the treadmill (M1); and 15 minutes after fatigue (M15) on high speed treadmill in Standardbred horses with and without HPIE. Eight Standardbred horses (4 fillies and 4 geldings) aged 3 to 5 years old (average 4 years old) were included in this study. The severity of EIPH was scored in degrees from 0 to 4 after 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after fatigue by tracheobronchoscopy exam and red blood cell count and hemoglobin concentration in BALF collected 90 minutes after fatigue on the 13th week of the experiment. The endoscopy determined positive and negative group for EIPH and three horses were EIPH positive upon three endoscopic exams. The red blood cell count and hemoglobin concentration were increased in positive group for EIPH when compared to negative group which helped to determine the degree of severity observed through endoscopic exam.

ACE activity in plasma in EIPH negative horse were equal to $50,60 \pm 8,69$ U/L in M1 and $70,46 \pm 15,08$ U/L in M15 and for EIPH positive $59,00 \pm 15,02$ U/L in M1 and $68,55 \pm 18,96$ U/L in M15. ACE activity in plasma was higher 15 min after fatigue for EIPH positive and EIPH negative alike. Statistical difference can be shown when comparing the moments before the maximum effort testing on treadmill (M1) and 15 min after fatigue (M15) ($p=0,0019$).

ET-1 concentration in plasma in EIPH negative group was equal to $0,73 \pm 0,36$ pg/mL in M1 and $1,30 \pm 0,93$ pg/mL in M15 and EIPH positive group $1,08 \pm 0,86$ pg/mL in M1 and $0,95 \pm 0,85$ pg/mL in M15. ET-1 concentration in plasma measured before the maximum effort testing on treadmill (M1) did not increase in EIPH positive group, while it increased in EIPH negative group.

According to the results and the conditions of the experiment the measurement of ACE and ET-1 might not be used as specific biomarkers for pulmonary injury in Standardbred horses with and without EIPH.

Keywords: EIPH; ACE; ET-1; biomarkers of lung injury; Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage, bronchoalveolar lavage; markers, treadmill.

1. INTRODUÇÃO

Os cavalos, atletas por excelência, são elementos ativos dos inúmeros avanços da medicina esportiva. O esforço físico realizado intensivamente pode provocar danos teciduais associados a lesões inflamatórias, assim como induzir à Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício (HPIE). Esta síndrome é de grande importância na indústria equina, pois resulta em implicações financeiras devido à queda de performance, perda dos dias treinados, necessidade de medicações antes das atividades físicas e aumento do tempo de recuperação após exercício intenso. São necessários muitos estudos para investigar a etiopatogenia e as possíveis terapias que possam impedir ou reduzir a HPIE em cavalos atletas, pois existem vários fatores que podem desencadear a HPIE. A HPIE é considerada uma síndrome que afeta todos os cavalos atletas e/ou em treinamento. Hoje a teoria fisiopatológica mais aceita é o aumento da pressão da vasculatura pulmonar, dependente de agentes vasoconstritores durante o exercício, resultando em falência por estresse dos capilares pulmonares e consequentemente extravasamento de sangue no espaço alveolar. A hemorragia originada da vasculatura pulmonar drena para as vias aéreas anteriores em 30 a 120 minutos após treino ou prova. Este processo gera uma resposta inflamatória devido à presença de sangue no pulmão que pode levar a sequelas crônicas ou até mesmo a morte. O método de diagnóstico mais utilizado da HPIE é a endoscopia 30 a 120 minutos após exercício intenso, combinada com a citologia do lavado broncoalveolar (LBA) que mostra presença de eritrócitos e/ou de hemossiderina. O tratamento é paliativo e as combinações de produtos terapêuticos como antibióticos, antiinflamatórios e corticóides podem minimizar a severidade da hemorragia subsequente e ou prevenir a HPIE. Devido à sua importância são necessárias mais alternativas para diagnosticar esta síndrome em cavalos atletas. Dois marcadores da injúria pulmonar, que mostram especialmente a participação dos mecanismos de hipertensão arterial e de lesão do endotélio capilar podem indicar a lesão vascular. Se estes marcadores podem indicar uma lesão pulmonar, talvez possam ajudar a prevenir HPIE nesses animais. O objetivo do presente estudo foi avaliar endotelina tipo-1 e a enzima conversora de

angiotensina como possíveis marcadores precoces da lesão pulmonar em cavalos com HPIE como uma estratégia para prevenir e/ou limitar o desenvolvimento de alterações na membrana alvéolo-capilar. A premissa básica é que os marcadores devem estar disponíveis na corrente sanguínea e podem ser monitorados ajudando evitar a HPIE em cavalos atletas. Para isso foram avaliados os marcadores de lesão pulmonar em cavalos com e sem HPIE, como uma medida quantitativa da disfunção capilar endotelial. A disponibilidade de uma técnica menos invasiva e/ou de teste de diagnóstico capaz de identificar precocemente esta síndrome pode ser útil para melhor monitorar cavalos com HPIE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A presença de sangue nas narinas dos cavalos durante ou após uma corrida, independentemente de sua origem é conhecida como epistaxe ou sangramento nasal (EPPINGER, 1990; BARAKZAI et al., 2004; RAINS et al., 2007). A presença de sangue na árvore traqueobrônquica é característica de hemorragia pulmonar e pode chegar até as cavidades nasais ocasionando epistaxe (TAKAHASI et al., 2001; DOUCET e VIEL, 2002a). Em 1981, o termo Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício (HPIE) foi introduzido por Pascoe et al. Atualmente a HPIE é definida como sendo a presença de sangue livre de origem pulmonar na árvore traqueobrônquica, após exercício intenso, geralmente identificado por endoscopia realizada depois de 30 a 120 minutos após a atividade física (COSTA, 2004; NEWTON, et al., 2005).

Scott (1953) considerou provável que a hemorragia nasal pudesse ser induzida pelo uso indiscriminado de estimulantes cardíacos, hormônios e concentrados de vitaminas, que costumam ser administrados na tentativa de aumentar a velocidade dos eqüinos nas corridas. Atualmente, os mecanismos fisiopatológicos da hemorragia pulmonar são bastante discutidos (NEWTON et al., 2005). Entretanto, a teoria fisiopatológica mais aceita é a falência por estresse dos capilares pulmonares, resultante do mecanismo de hipertensão que se desenvolve nesses vasos durante o exercício (BIRKS et al., 2003; SCHROTER et al., 1998). Os cavalos estão sendo selecionados, cada vez mais para velocidade e este fato gera um trabalho cardíaco enorme e uma exigência dos mecanismos de compensação cárdio-respiratórios, que provocam grande aumento na pressão transmural durante o exercício (GOETZ et al., 1997; OLIVER et al., 2003). Birks et al. (1997) demonstraram falência por estresse e consequente ruptura dos capilares pulmonares em cavalos exercitados em altas velocidades e maior risco de HPIE quando havia aumento da pressão arterial pulmonar. A pressão da artéria pulmonar em cavalos varia de 28 mmHg no descanso à 84 mmHg em galope rápido e excede 120 mmHg durante o exercício intenso (ART et al., 2001; ERICKSON e POOLE, 2007). Para Moore (1996), a pressão atrial esquerda é de 5 mmHg e sobe para 70 mmHg após o exercício máximo e, a pressão dos capilares pulmonares é

estimada em 80 a 95 mmHg. Às vezes este aumento supera a capacidade de resistência na membrana alveolar e se produz ruptura por hipertensão na parede do capilar pulmonar com conseqüente hemorragia pulmonar (WEST et al., 1997; TEJERO, 2001; COUETIL e HINCHCLIFF, 2004). Entretanto, a pressão arterial requerida para causar ruptura por hipertensão dos capilares pulmonares em cavalos de corrida é desconhecida (BIRKS et al., 1997; MOORE, 1996). Os pulmões de cavalos afetados por HPIE, necropsiados após exercício máximo, revela falência dos capilares pulmonares, incluindo ruptura no endotélio capilar e alveolar, acúmulo de sangue na parede alveolar e nos espaços alveolares e edema intersticial (WEISS e SMITH, 1998, COUETIL e HINCHCLIFF, 2004). Na maioria das vezes esta hemorragia origina-se da porção caudodorsal do pulmão (BIRKS et al., 1997; OIKAWA, 1999; ART et al., 2001). Segundo Oliver et al. (2003), reduzindo a intensidade da atividade atlética o problema regride, porém esta não é a melhor solução devido à desvalorização econômica dos cavalos, especialmente durante o período de provas. Do ponto de vista farmacológico, a melhor forma de reduzir a ruptura por estresse dos capilares pulmonares é diminuindo a pressão sangüínea do circuito pulmonar, aumentada pelo exercício intenso (MANOHAR et al., 1997; OLIVER et al, 2003; HINCHCLIFF et al., 2005b).

Provavelmente, a doença não é causada por um único mecanismo, mas sua associação é necessária para que a HPIE se manifeste (NEWTON et al., 2005). Ao submeter os cavalos a exercício provocamos muitas mudanças como aumento da temperatura corpórea, frequência cardíaca e respiratória, alto consumo de oxigênio que resulta em alteração do débito cardíaco e das trocas gasosas. Todas estas alterações são suficientes para levar à HPIE (ERICKSON, 2000).

Pesquisas tem demonstrado que indicadores de danos pulmonares, incluindo biomarcadores de lesão pulmonar, podem ser mensurados como medida da disfunção endotelial (ORFANOS et al., 1999; ORFANOS et al., 2000; COMELLAS e BRIVA, 2009). Desta forma, estudar biomarcadores que estejam relacionados à integridade vascular e ou pressão sanguínea, como a angiotensina e a endotelina, pode contribuir no diagnóstico precoce desta síndrome em cavalos atletas.

A angiotensina é um importante peptídeo do sistema renina-angiotensina-aldosterona (TRAPP et al., 2009). Esta proteína é encontrada primariamente nas membranas das células endoteliais da vasculatura pulmonar (SKIDGEL e ERDOS, 1993) e pode ser sintetizada localmente em muitos tecidos (DZAU, 1988). A angiotensina é um potente vasoconstritor que aumenta a resistência vascular e a pressão sanguínea (TILLMAN e MOORE, 1989).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma peptidase envolvida na tensão arterial e, seu estudo em várias condições fisiológicas e fisiopatológicas, mostra sua participação em enfermidades tais como hipertensão, diabetes e no diagnóstico de doenças pulmonares e sarcoidose (UÇAR et al., 1997). O principal papel desta enzima é participar na regulação da pressão sanguínea e homeostase dos fluídos corporais, através da conversão da angiotensina I em angiotensina II, assim como influenciar na função cardiovascular em mamíferos (COSTA et al., 2011c). A mensuração da atividade da ECA tem uso clínico em seres humanos e pode estar relacionada com a performance atlética em cavalos (COSTA et al., 2011b). A atividade da ECA é mensurada no sangue, sendo vantajosa na medicina para a detecção precoce, sensível e quantificável de injúrias pulmonares (ORFANOS et al., 2000). As lesões pulmonares se forem graves, agudas e difusas afetam a estrutura pulmonar, e podem determinar alterações na atividade metabólica do órgão que influenciam a homeostase pulmonar e sistêmica (ORFANOS et al., 1999).

Vários métodos para a mensuração da ECA plasmática estão disponíveis, incluindo ensaios colorimétricos, fluorimétricos e espectrofotométricos (CARMONA et al., 2006). A concentração de ECA no plasma de cavalos de trote adultos é de 112 ± 20 U/L em repouso e 119 ± 30 U/L após o exercício em esteira (RICHARD et al., 2010). Coomer et al. (2003) mostraram que a idade exerce influência nesses valores, pois em animais jovens esses valores são mais altos que em animais adultos. Podem ser observadas ainda variações no valor da atividade da ECA quando se utiliza diferentes métodos de determinação ou diferentes substratos sintéticos de ECA, existentes no mercado, como Furylacryloyl-phenylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG) e *o*-aminobenzoic acid-FRK (Dnp) P-OH (ABZ) (COSTA et al., 2011c).

Outro biomarcador de injúria tecidual são as endotelinas. São peptídeos que promovem constrição dos vasos sanguíneos e aumentam a pressão arterial (BENAMOU et al., 2003) sendo consideradas um dos vasoconstritores mais potentes (MARKEWIT et al., 1995) com efeitos duradouros. Benamou et al. (1999) demonstraram que o efeito da endotelina na circulação pulmonar é menor que 10 minutos e, na circulação sistêmica, de aproximadamente 40 minutos. Ela normalmente é mantida em equilíbrio por diferentes mecanismos, mas quando estão em altas concentrações, especialmente na hipóxia, contribui para a hipertensão arterial e doença cardíaca. As endotelinas são peptídeos constituídos de 21 resíduos de aminoácidos, sintetizados e liberados a partir das células endoteliais e têm papel fundamental na homeostase vascular. Apresentam-se em três formas moleculares: endotelina 1 (ET-1), endotelina 2 (ET-2) e endotelina 3 (ET-3), sendo ET-1 e ET-2 mais abundantes no pulmão (FAGAN et al., 2001). A ET-1 é a isoforma presente em maior quantidade e, induz a formação de edema pulmonar através do aumento da pressão hidrostática capilar, recrutamento de células inflamatórias e ruptura na barreira endotelial (COMELLAS e BRIVA, 2009). Ela tem sido relacionada à doenças inflamatórias tal como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em seres humanos e obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) nos cavalos (BENAMOU et al., 1998). Nas vias aéreas a ET-1 é predominantemente liberada pelas células epiteliais bronquiais e alveolares nas situações de hipóxia em concentrações maiores que a normal podendo induzir mudanças estruturais na parede vascular (MARKEWITZ et al., 1995). Tem sido demonstrado que a ET-1 pode estar aumentada no plasma e no LBA em cavalos, tanto durante exercício intenso, quanto em animais com ORVA (BENAMOU et al., 1998; BENAMOU et al., 1999), mostrando seu envolvimento com a hipóxia pulmonar (BENAMOU et al., 2001). De acordo com Tarquini et al. (1998) níveis de ET-1 no plasma podem ser mensurados por técnicas de radioimunoensaio (RIA).

As concentrações de endotelina no plasma humano variam de 0,25 a 20pg/mL, sendo bastante dependentes da técnica de dosagem utilizada (LOEFFLER e MAIRE, 1992). A concentração de ET-1 em cavalos sadios varia no descanso de $0,18 \pm 0,03$ pg/mL a $0,20 \pm 0,03$ pg/mL, após dois minutos de

exercício em esteira e, retorna aos níveis basais, depois de 10 minutos (McKEEVER et al., 2002). Entretanto, esses valores não são os mesmos para cavalos com anormalidades tal como doença pulmonar obstrutiva crônica (BENAMOU et al., 1999). Desta maneira, mais pesquisas são necessárias para entender o real papel das endotelinas como moduladoras da pressão sanguínea, especialmente na HPIE.

3. OBJETIVOS GERAIS

- determinar a incidência e severidade de HPIE, em cavalos de trote atletas, em esteira de alta velocidade;
- avaliar biomarcadores da lesão pulmonar em cavalos com HPIE como medida quantitativa da disfunção endotelial capilar.

3.1. Objetivos Específicos

- avaliar endoscopicamente as vias aéreas inferiores de cavalos de trote após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, buscando evidências de hemorragia, avaliadas segundo escore para HPIE.
- avaliar citologicamente o lavado broncoalveolar por endoscopia, considerando a quantidade de hemácias nas amostras colhidas, concentração de hemoglobina no lavado e contagem diferencial de células;
- mensurar e comparar os níveis de marcadores da injúria pulmonar, enzima conversora de angiotensina (ECA) e endotelina-1 (ET-1) no sangue periférico de cavalos com e sem HPIE submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade;
- correlacionar os valores quantitativos destes marcadores (enzima conversora de angiotensina e endotelina-1) e a severidade de HPIE.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todo o procedimento realizado foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu - SP sob o número de registro 159/2009 – CEUA, e pelo Comitê de Ética da Universidade de Purdue.

Oito cavalos de trote, 4 fêmeas e 4 machos castrados, com idade entre 3 a 5 anos foram comprados pela Purdue University School of Veterinary Medicine, West Lafayette/IN. O critério de seleção foi: histórico negativo de disfunções músculo-esqueléticas e de obstrução das vias aéreas que pudessem interferir no desempenho atlético dos cavalos. Durante todo o experimento os cavalos foram mantidos em baias individuais fechadas, e alimentados com dieta constituída de ração comercial Purina, de nome Omolene 200, com acesso “*ad libitum*” água e feno de alfafa.

Os cavalos foram familiarizados com o ambiente do laboratório, que foi climatizado a 25°C, com dois ventiladores em frente à esteira de alta velocidade, e seguiu-se o protocolo padrão de treinamento desenvolvido pela Universidade de Purdue (Quadro 1- Apêndice). Todos os cavalos treinaram cinco vezes por semana, por seis semanas, para se conseguir padrão uniforme da performance, antes do início do estudo. Os animais foram submetidos a exames clínicos, endoscópicos e citológicos do sistema respiratório e, amostras de sangue para obtenção de plasma foram colhidas antes do condicionamento físico em esteira e acondicionadas em freezer a -20°C para estabelecer os dados basais no pré-exercício.

Um dia por semana, os cavalos eram pesados e monitorados com monitor cardíaco (Polar New York, USA), durante todo o período do condicionamento físico e o experimental, para assegurar a gravação contínua durante o teste de esforço máximo (Figura 1).



Figura 1: Monitoramento cardíaco realizado durante o teste de esforço máximo com frequencímetro digital (Polar), em cavalos de trote - West Lafayette/IN, 2011.

4.2 Teste padrão de exercício progressivo em esteira de alta velocidade

Após o período de condicionamento físico de seis semanas os cavalos iniciaram o experimento composto de 3 fases, durante a semana, de acordo com a velocidade e o tempo do exercício na esteira.

Fase 1 - Os cavalos eram mantidos em treinamento constante, constituído de três etapas: 4 minutos em caminhada de 1,7m/s com inclinação da esteira de 0%, 15 minutos em trote, com velocidade de 5m/s e inclinação de 3% da esteira e, 1 ½ minutos de caminhada a 1,7m/s e 0% de inclinação, para recuperação do exercício.

Fase 2 - Na véspera do teste de esforço máximo os cavalos eram submetidos a um esforço maior do exercício ("split" de 9m/s e inclinação da

esteira de 5%), descrito como segue: 4 minutos em caminhada de 1,7m/s com inclinação da esteira de 0 %, seguido de 4 minutos em velocidade de 5m/s e inclinação de 3%, 2 minutos em velocidade de **9m/s e inclinação de 5%**, 3 minutos em velocidade de 5m/s com inclinação de 3%, e 2 minutos em velocidades de **9m/s com inclinação de 5%** e, finalmente, 4 minutos de caminhada a 1,7m/s e 0% de inclinação, para recuperação do exercício.

Fase 3 - No dia do teste de esforço máximo os cavalos tinham 6 minutos em caminhada de 1,7 m/s com inclinação da esteira de 0%, 2 minutos em velocidade de 5 m/s em inclinação de 3%, 1 minuto em velocidade de 8m/s em inclinação de 5%, 2 minutos em velocidade de 1,7m/s com inclinação de 0%, e fases de 1½ minutos em velocidades de **9, 12 e 13m/s com 5% de inclinação**, até o cavalo apresentar sinais de fadiga ou ser incapaz de manter a sua posição na esteira. Somente na fase 3 colhia-se sangue para determinação dos biomarcadores plasmáticos da injúria vascular pulmonar e, realizavam-se as endoscopias, para avaliação da severidade da HPIE e para determinação dos escores para muco, sendo que os momentos de coleta de sangue e endoscopia foram os mesmos em todos os animais.

O experimento total durou 13 semanas, sendo a fase de condicionamento físico com duração de seis semanas, fase experimental de mais 6 semanas que incluiu os momentos de colheita antes e após o teste de esforço máximo e, a 13ª semana quando se realizou o lavado broncoalveolar. Neste período, os animais que não eram submetidos ao teste de esforço máximo, mantinham-se em treinamento, como descrito na fase 1.

Para o lavado broncoalveolar, dois cavalos por dia foram submetidos ao teste de esforço máximo, exame endoscópico, colheita de sangue para dosagem dos biomarcadores e, colheita de lavado broncoalveolar após 90 minutos da fadiga para estudo citológico (Figura 4).

4.3 Exame endoscópico

O exame do aparelho respiratório anterior e posterior foi realizado com o aparelho de videoendoscopia com 200 cm de comprimento útil e 9 mm de

diâmetro externo. Utilizou-se uma fonte de luz halógena de 250 watts, com intensidade de iluminação ajustável e todas as imagens foram gravadas em DVD, para análise e classificação da quantidade de sangue ou muco e outras alterações na árvore traqueobrônquica. O endoscópio foi introduzido pela narina direita e dirigido à traqueia na sua porção final. A avaliação endoscópica foi realizada em todos os animais nos momentos M15, M30, M60, M90 e M120 que correspondiam a 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após o tempo de fadiga em esteira de alta velocidade respectivamente. Fotos foram realizadas em 15, 60, 90 e 120 cm da traqueia e carina. Pela endoscopia inspecionaram-se as vias aéreas anteriores avaliando-se os movimentos das cartilagens aritenóides, presença ou ausência de hiperplasia folicular linfóide, deslocamento de palato mole, e presença de secreções e/ou sangue nas porções proximal, medial e distal da traqueia. Com a endoscopia determinou-se o grupo positivo e negativo para HPIE. A gravidade da hemorragia induzida pelo exercício foi determinada pela quantidade e distribuição de sangue encontrados na superfície da traqueia e foi classificada segundo o escore padronizado por Hinchcliff et al. (2005a), em quatro graus: Grau 0: Não detecção de sangue na faringe, laringe, traqueia ou brônquios principais; Grau 1: presença de uma ou duas pequenas estrias e/ou coágulos (menos que um quarto da traqueia) ou <10% da superfície da traqueia distal (Carina); Grau 2: filetes de sangue distribuídos aleatoriamente (não uniformes) por toda extensão da traqueia, ou coágulos maiores, ocupando menos que um terço da circunferência da traqueia; Grau 3: múltiplos coágulos e/ou sangue distribuídos uniformemente por toda extensão da traqueia; Grau 4: quantidade abundante de sangue por toda a traqueia, laringe, faringe e fossas nasais, ocupando mais de 90% da sua superfície, formando um “rio” (Figura 2).

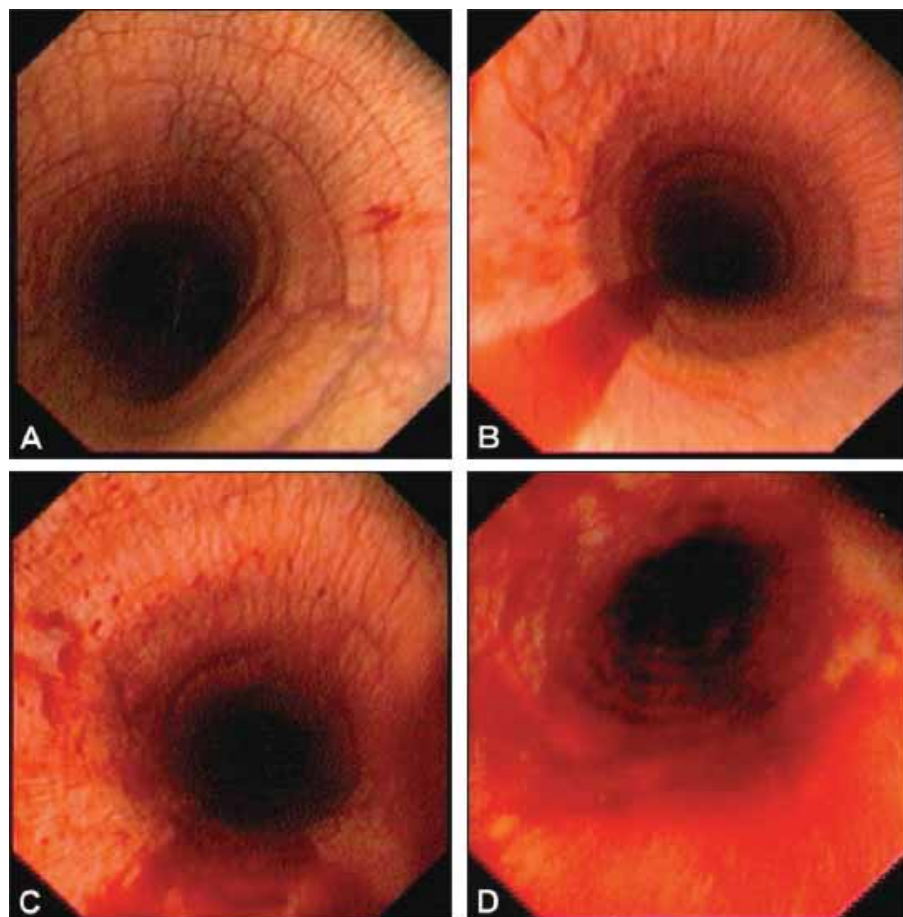


Figura 2: Exemplos fotográficos dos escores endoscópico em Graus para quantificar a presença de sangue e a severidade da HPIE nas vias aéreas segundo Hinchcliff et al. (2005).

A avaliação da quantidade de muco foi estabelecida segundo o escore de Gerber et al., (2004) em cinco graus: Grau 0: Muco não visível; Grau 1: uma pequena bolha de muco; Grau 2: múltiplas bolhas de muco parcialmente confluentes; Grau 3: muco confluyente no lume ventral da traqueia ou múltiplas bolhas ao longo da circunferência das vias aéreas; Grau 4: grande quantidade de muco na parte ventral das vias aéreas, formando um “rio”; Grau 5: profusa quantidade de muco, ocupando mais de 25% do lume traqueal (Figura 3). O exame endoscópico foi repetido a cada duas semanas, tempo necessário para todos os cavalos (n=8) realizassem o teste de esforço máximo. O exame traqueobrônquico das vias aéreas foi realizado sem sedativo e foi necessário uso de contenção física (cachimbo) em alguns animais.

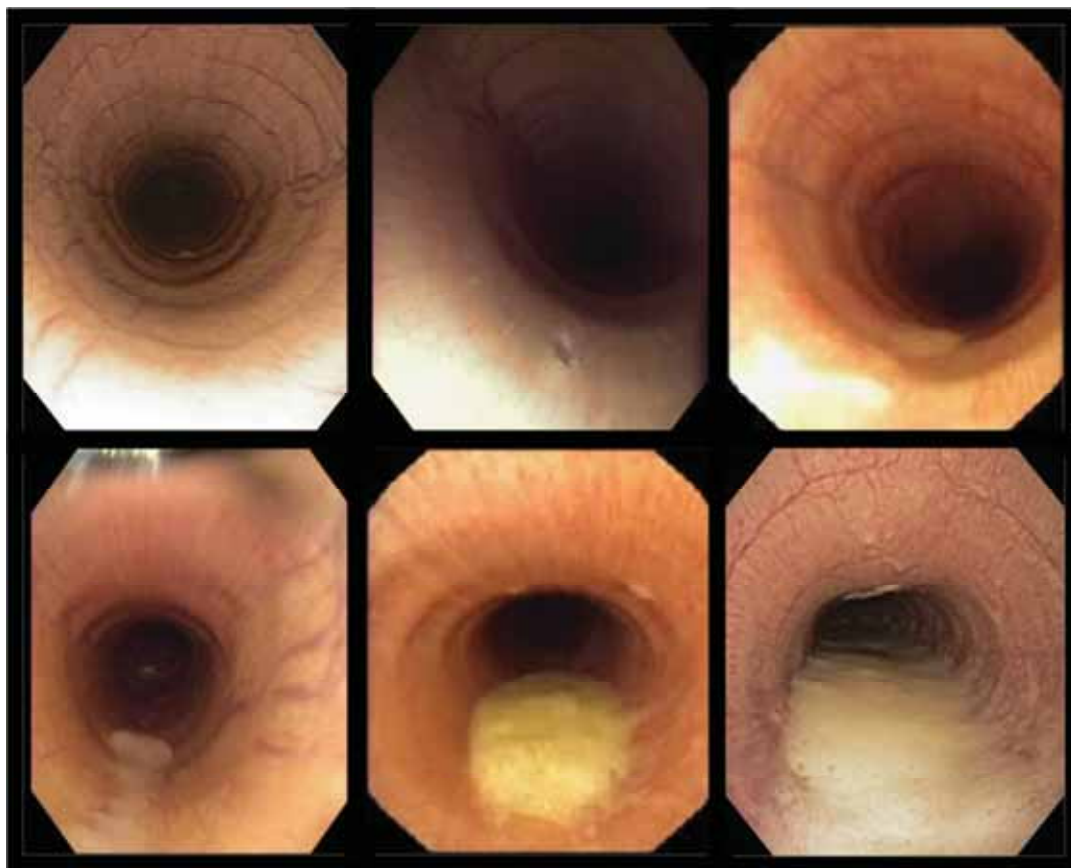


Figura 3 – Escore endoscópico em Graus para quantificar muco nas vias aéreas, adaptado de Gerber et al. (2004).

4.4 Lavado broncoalveolar (LBA)

O lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado 90 minutos após o teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade na 13ª semana, devido necessidade de sedação (Figura 4). Os cavalos foram contidos com cachimbo e sedados com cloridrato de xilazina (0,4 a 0,6mg/kg, IV). O LBA foi realizado com vídeoendoscópio introduzido na narina direita até atingir a região caudo-dorsal do pulmão direito que provocasse resistência ao endoscópio. O reflexo de tosse foi reduzido pela pulverização de aproximadamente 60mL de cloridrato de lidocaína a 2% nas vias aéreas, enquanto o endoscópio avançava pela traqueia. Um frasco de 250mL de solução fisiológica pré-aquecida a 37°C foi acoplado a um equipo que estava ligado ao canal de trabalho do

videoendoscópio. Através de insuflação de ar com uma pêra de borracha em manguito de esfigmomanômetro pressionou-se o frasco de solução salina infundindo-se rapidamente todo o volume. Após a infusão removeu-se o equipo e o fluído foi aspirado por uma bomba de sucção acoplada ao canal de trabalho do endoscópio, e o líquido resultante, cerca de 60% do inoculado, foi acondicionado em tubo cilíndrico graduado e mantido em gelo até o processamento. Todas as amostras de lavado foram processadas no máximo em 30 minutos após as colheitas.

As amostras foram divididas em três partes:

1. Uma alíquota de 1mL LBA para contagem de hemácias utilizando-se câmara de Neubauer. O número de hemácias no LBA foi determinado contando-se as células nos 4 quadrantes, determinando-se a média das contagens nos dois lados do hemocítômetro e multiplicando-se o valor encontrado por mil, para quantificar em células/mL segundo Perez-Moreno et al. (2009).
2. Cinco mililitros de LBA fresco foram acondicionados em microtubos tipo Eppendorf®, distribuindo-se 1mL em cada tubo, para determinação da concentração de hemoglobina. Os tubos foram armazenados a -20°C, até o dia do teste. A concentração de hemoglobina no LBA foi realizada de acordo com Perez-Moreno et al. (2009), utilizando-se 3,3', 5,5' dihidroclorato de tetrametilbenzidina - TMB (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) como substrato. O método de espectrofotometria apresenta alta sensibilidade e rapidez para determinar a concentração de hemoglobina em LBA, causando a mudança de cor que é lida por densidade óptica, em comprimento de onda de 600nm. Para a determinação da concentração de hemoglobina as amostras de LBA foram descongeladas e, o proceso de descongelamento promoveu a lise das hemácias das amostras. O "branco" foi preparado usando-se solução salina e, o padrão, utilizando-se hemoglobina equina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO). O resultado final foi obtido por cálculos matemáticos fornecidos pelo fabricante.

$$\text{Concentração da amostra} = \frac{\text{DO amostra} - \text{DO branco}}{\text{DO padrão} - \text{DO branco}} \times 0,005\text{mg/mL}$$

3. O restante do LBA (144mL) foi enviado ao laboratório para contagem diferencial. As amostras foram pré-centrifugadas por 20 minutos para a obtenção de um concentrado celular. Após desprezar o sobrenadante e ressuspender as células, 200µl deste líquido foram processados em citocentrífuga a 250 x G, durante 10 minutos. O botão celular formado na lâmina foi corado pela técnica de Giemsa. As lâminas foram confeccionadas em duplicata. A leitura foi realizada em microscópio óptico de imersão com aumento de 1.000 X. Contou-se 400 células identificando-se macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e células epiteliais. Do total de macrófagos contou-se a porcentagem hemossideróforos.

4.5 Sangue

Colheu-se 0,9 mL de sangue em dois tubos do tipo Vacutainer®, sendo 0,3 mL com anticoagulante EDTA e 0,6 mL com heparina, para as mensurações ET-1 e ECA respectivamente. Estas amostras foram colhidas antes dos cavalos iniciarem o condicionamento físico em esteira de alta velocidade (M0), pela manhã, por venopunção da jugular.

Amostras foram centrifugadas a 1.000 x G por 10 minutos para obtenção de plasma, e alíquotas de 0,25mL foram distribuídas em 4 tubos tipo Eppendorf® sendo dois com EDTA e dois com heparina e armazenadas em freezer a -20°C, até sua análise.

Antes do teste de esforço máximo (M1) e 15 minutos após a fadiga (M15), colheram-se novas amostras de sangue para obtenção de plasma e dosagem de ECA e ET-1. Para tanto instalou-se um cateter com circuito de colheita (16G, BD Angiocath™, 8 cm), na veia jugular após a anestesia local com 1mL de lidocaína sem vasoconstritor. Dois tubos extensores foram acoplados ao

cateter juntamente com torneira de três vias. O circuito de coleta foi preenchido com solução de heparina para evitar a coagulação do sangue no seu interior (Figura 4).

4.6 Biomarcadores de injúria pulmonar

4.6.1 Determinação da atividade da Enzima conversora de angiotensina (ECA)

O ensaio para a medição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) empregando como substrato o furylacryloyl-L-fenilalanil-glicina-glicil – FAPGG. Este substrato utiliza a espectrofotometria de método cinético e tem duração de 5 a 10 minutos para sua realização. A determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), foi realizada de acordo com Costa et al. (2010c) utilizando-se “kit” comercial, ACE Infinity (Termo-Fisher, EUA) desenvolvido para a mensuração da ECA no plasma heparinizado de cavalos. O “kit” é composto por controle positivo e negativo (TR85101), calibrador (TR85201) e reagentes para ECA. Em microplaca de 96 poços, adicionaram-se 300µl dos reagentes e 30µl de plasma em duplicata. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 340nm de absorbância, mantendo-se temperatura de 37°C por 5 minutos.

Os resultados foram calculados segundo fórmula matemática e expressos em U/L.

$$\text{ECA} = \frac{\Delta\text{abs/min da amostra}}{\Delta\text{abs/min do calibrador}} \times 66\text{U/L}$$

4.6.2 Determinação de endotelina (ET-1)

A concentração de endotelina (ET-1) no plasma foi realizada por imunoensaio modificado, ELISA (Quanti Glo, R&D Systems Inc, Minneapolis, Minn.). A curva padrão para o imunoensaio foi preparada de acordo com as instruções do “kit”. Foram adicionados 100µL de diluente RD1-19, em duplicata, à placa de 96 poços. A seguir, 100µL do controle, do branco e das amostras foram adicionadas em cada poço. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 80µL de substrato L-tirosina para medir a atividade anti-tirosinase. A microplaca de 96 poços foi coberta com plástico adesivo e incubada por 90 minutos, em agitador orbital de microplacas, em temperatura ambiente. Após a incubação, o líquido foi removido e a microplaca lavada por 4 vezes com solução tampão. Foram adicionados 200µL de conjugado de ET-1 dentro dos poços e a placa, coberta com plástico adesivo novamente. Após incubação em temperatura ambiente, em agitador orbital de microplacas por 3 horas, a microplaca foi lavada por 4 vezes, da mesma forma. Foram adicionados 100µL de reagente luminol e 100µL peroxidase em cada poço e a placa incubada por 5 a 20 minutos, em temperatura ambiente, sempre protegida da luz. Na microplaca determinou-se a intensidade de luz emitida e, a concentração de ET-1, foi expressa em pg/mL.

4.7 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística comparativa usando software “Statistica 10” (Statsoft Inc., OK). O teste “post-hoc” foi conduzido quando necessário. Associação entre ECA, ET-1 e severidade da HPIE (por escore endoscópico) foi avaliada usando coeficiente de correlação de Person.

Os resultados estatísticos foram considerados significativos quando *p* foi menor que 0,05.

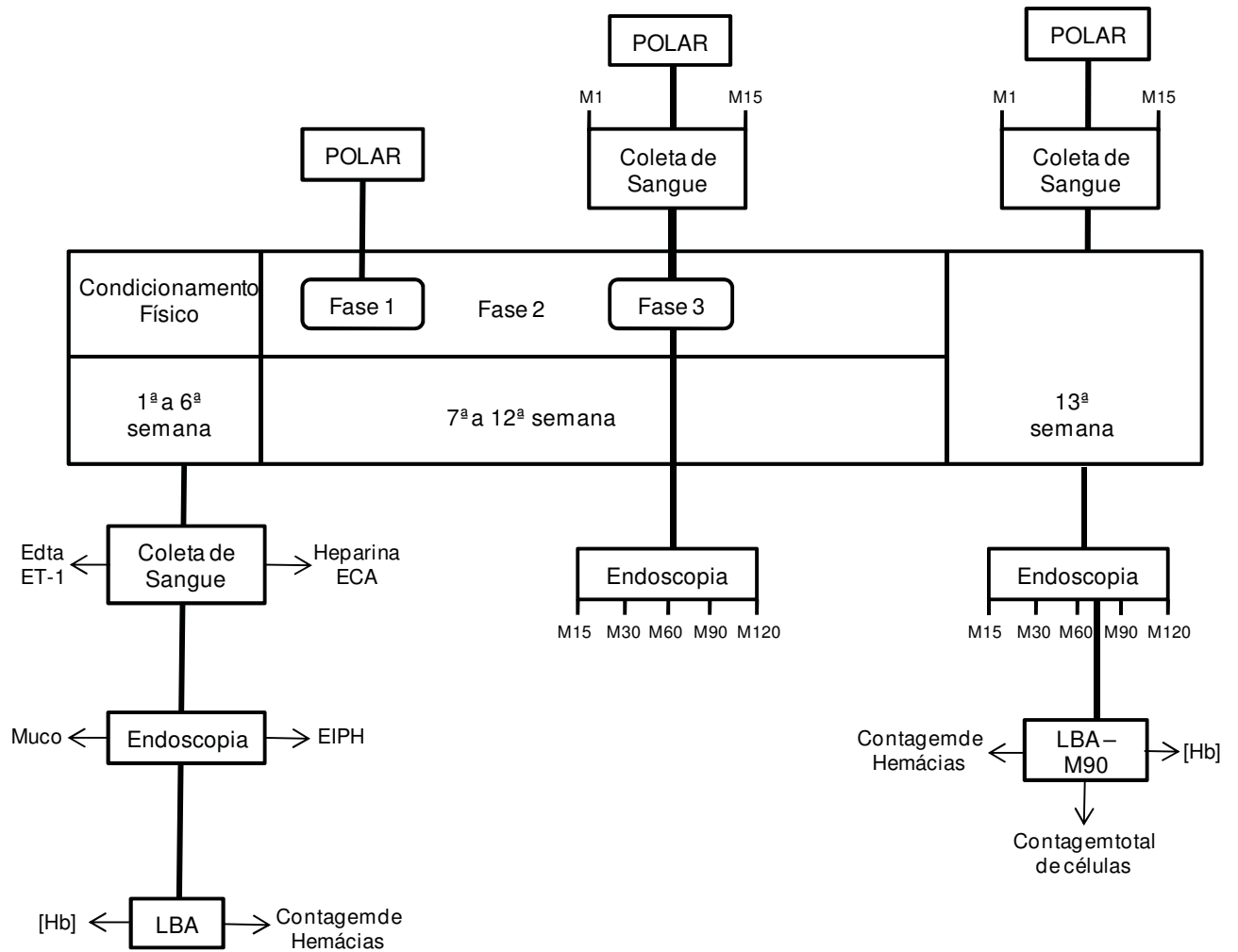


Figura 4: Fluxograma com sequencia cronológica do experimento

5. RESULTADOS

5.1 Resultados do Exame Físico, Endoscópico e Citológico do aparelho respiratório.

5.1.1 Exame Físico

Todos os cavalos de trote foram avaliados pelo exame clínico, endoscópico e citológico do lavado broncoalveolar antes do início ao condicionamento físico (M0) até a 13ª semana após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade. Ao exame físico nenhum animal apresentou alterações quanto aos valores de frequência cardíaca, respiratória, temperatura antes do início do condicionamento e depois da 13ª semana (Quadro 2).

Quadro 2: Exame físico dos cavalos de trote antes do teste de esforço máximo e depois da 13ª semana em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.

Animais	Antes do início do treinamento (M0)				Depois da 13ª semana			
	Peso (Kg)	FC (bpm)	FR (mpm)	Temperatura (°C)	Peso (Kg)	FC (bpm)	FR (mpm)	Temperatura (°C)
1	454.0	24	16	36.9	464.9	38	14	36.8
2	409.1	56	20	37.5	413.2	56	24	38.4
3	412.0	40	12	36.8	449.0	28	18	37.4
4	414.0	32	16	37.2	409.1	26	16	35.6
5	380.0	46	15	36.8	397.3	32	16	37.3
6	453.6	32	16	37.2	464.0	32	16	37.6
7	417.0	42	18	36.9	426.3	36	19	36.9
8	433.6	44	20	37.0	433.1	34	14	37.3

5.1.2 Endoscopia

Ao exame endoscópico três cavalos apresentaram sangue visível na traqueia após o teste de esforço máximo em esteira nos diferentes momentos, M15; M30; M60; M90 e M120, (Quadro 3), sendo repetida em todos os animais a cada duas semanas, em três repetições, mostrando que os cavalos que apresentaram HPIE na primeira semana mantiveram-se sangradores nas

outras duas semanas (Quadro 3). As alterações endoscópicas compatíveis com processos hemorrágicos e/ou inflamatórios do trato respiratório posterior encontradas foram classificadas em escores de Hinchcliff et al. (2005a) e Gerber et al. (2004) respectivamente. Ao exame endoscópico três animais apresentaram evidências de hemorragia após o teste de esforço máximo, e todos apresentaram secreções ao longo das vias aéreas (Quadro 3).

As secreções traqueobrônquicas visualizadas pela endoscopia eram de aspecto mucopurulento em todos os animais HPIE positivos.

Dos achados anatômicos encontrados somente dois animais apresentaram deslocamento dorsal do palato mole e um com hemiplegia laringiana esquerda com grau 2 de intensidade.

Quadro 3 - Quantidade de sangue e muco observadas por exame endoscópico em três repetições a cada 2 semanas em cavalos de trote após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.

Animais	15 min./Score		30 min./Score		60 min./Score		90 min./Score		120 min./Score	
	HPIE-15	Muco-15	HPIE-30	Muco-30	HPIE-60	Muco-60	HPIE-90	Muco-90	HPIE-120	Muco-120
1	1	2	1	1	0	1	0	0	0	1
2	0	2	0	2	0	3	0	3	0	3
3	0	2	0	2	0	1	0	0	0	1
4	1	2	1	2	0	4	0	1	0	1
5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
6	0	0	0	2	0	2	0	1	0	1
7	1	2	2	1	2	0	2	0	1	0
8	0	1	0	2	0	1	0	2	0	0
1	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0
2	0	1	0	1	0	3	0	2	0	1
3	0	2	0	2	0	3	0	2	0	2
4	0	3	0	2	0	3	0	1	0	0
5	0	4	0	4	0	3	0	1	0	1
6	0	0	0	2	0	1	0	3	0	1
7	2	3	2	0	2	0	2	0	1	1
8	0	0	0	1	0	3	0	3	0	0
1	1	3	1	1	1	3	1	0	1	0
2	0	0	0	3	0	3	0	2	0	1
3	0	2	0	4	0	2	0	1	0	1
4	0	3	0	3	0	3	0	0	0	1
5	0	2	0	4	0	2	0	2	0	2
6	0	1	0	1	0	2	0	3	0	3
7	1	2	2	1	3	0	2	0	2	0
8	0	2	0	3	0	4	0	3	0	3

*Escore para sangue e muco baseado em Hinchcliff et al. (2005a) e Gerber et al. (2004) respectivamente.

5.1.3 Lavado Broncoalveolar

A proporção média de líquido do LBA recuperado foi de 67,49 % antes do condicionamento físico. A contagem automática não foi sensível suficiente para detectar níveis acima de 88.000 células, sendo falha para LBA de coloração rósea. Desta maneira utilizou-se, comparativamente, a contagem de células em contador automático e de forma manual. Não foram encontradas diferenças significativas entre a contagem de hemácias manual antes ou após teste de esforço máximo em esteira ($p=0,521$) (Tabela 9 – Apêndice). Assim como não foram encontradas diferenças significativas entre contagem automática de hemácias manual para o grupo positivo para HPIE e grupo negativo para HPIE ($p=0,1038$) (Tabela 1).

Tabela 1: Médias e desvios-padrão de hemácias no LBA antes ou após teste de esforço máximo em esteira em cavalos de trote com e sem HPIE, West Lafayette/IN, 2011.

Grupos de animais	Hemácias-Antes Cel/mL $\bar{x} \pm s$	Hemácias-Depois Cel/mL $\bar{x} \pm s$
Todos (n=8)	147.812,62±126.796,12	1.923.437,75±4.627.885,42
Positivos (n=3)	240.520,67±186.809,30	4.699.687,66±7.510.028,08
Negativos (n=5)	92.187,5±19.302,95	257.687,8±176.008,12

Não houve diferença entre contagem de hemácias antes ou após teste de esforço máximo em esteira ($p=0,521$). Não houve diferença entre contagem de hemácias para HPIE positivos e negativos ($p=0,1038$).

A concentração de hemoglobina do LBA foi determinada em todos os cavalos e não mostrou diferença nos valores antes ou após teste de esforço máximo em esteira ($p=0,420$) (Tabela 10 - Apêndice). Além disso, a concentração de hemoglobina não foi diferente entre o grupo positivo e negativo para HPIE ($p=0,082$) (Tabela 2).

Houve correlação significativa entre a endoscopia após 60 minutos do tempo de fadiga e a contagem manual de hemácias ($r=0,8658$; $p<0,05$) e concentração de hemoglobina ($r=0,8997$; $p<0,05$) no LBA.

Tabela 2: Média e desvios-pradrão da concentração de hemoglobina antes e após teste de esforço máximo em esteira em cavalos de trote com e sem HPIE, West Lafayette/IN, 2011.

Grupos de animais	[Hb]-Antes mg/mL $\bar{x} \pm s$	[Hb]-Depois mg/mL $\bar{x} \pm s$
Todos (n=8)	0,0120 $\pm$ 0,0134	0,0920 $\pm$ 0,2063
Positivos (n=3)	0,0219 $\pm$ 0,0218	0,2304 $\pm$ 0,3524
Negativos (n=5)	0,0061 $\pm$ 0,0022	0,0090 $\pm$ 0,0042

Não houve diferença nos valores antes e após teste de esforço máximo em esteira ($p=0,420$).

Não houve diferença entre o grupo positivo e negativo para HPIE ($p=0,082$).

A contagem leucocitária no LBA no grupo positivo para HPIE foi mais elevada (730 cell/mL) que no grupo negativo para HPIE (550 cell/mL), como esta mostrando na Tabela 3, embora sem diferença estatística significativa ($p>0,05$).

Tabela 3: Médias e desvio-padrão da contagem leucocitária no LBA de cavalos de trote após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade.

Grupos de animais	Leucócitos Cell/mL $\bar{x} \pm s$
Positivos (n=3)	730 $\pm$ 460,01
Negativos (n=5)	550 $\pm$ 123,74

Não houve diferença entre o grupo positivo e negativo para HPIE ($p>0,05$).

Os valores percentuais das contagens diferenciais de linfócitos (36,9%), neutrófilos (7,5%), eosinófilos (0,6%), mastócitos (1,4%) e hemossiderófagos (5,2%) foram mais elevados no Grupo HPIE positivo quando comparados ao grupo HPIE negativo, onde os valores encontrados foram respectivamente 35,7%; 5,5%; 0,0%; 1,2% e 2,3% (Tabela 4).

O número de macrófagos foi mais elevado no grupo HPIE negativo (57,6%) que no Grupo HPIE positivo (53,6%) (Tabela 4), entretanto sem diferença significativa $p>0,05$.

A excessão dos hemossiderófagos que foi maior nos animais positivos ($p>0,05$), os outros tipos celulares mostraram valores muito parecidos (Tabela 4).

Tabela 4: Médias e desvios-padrão de células nucleadas e da contagem percentual dos principais tipos celulares no LBA de cavalos de trote com e sem HPIE.

	CTCN (células μ L)	Macróf % $\bar{x} \pm s$	Linfóc % $\bar{x} \pm s$	Neutróf % $\bar{x} \pm s$	Eosinó % $\bar{x} \pm s$	Masto % $\bar{x} \pm s$	Hemos % $\bar{x} \pm s$
Positivos (n=3)	391,67 $\pm$ 47,64	53,6 $\pm$ 8,0	36,9 $\pm$ 9,6	7,5 $\pm$ 2,6	0,6 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 1,8	5,2 $\pm$ 0,3
Negativos (n=5)	459,00 $\pm$ 32,68	57,6 $\pm$ 8,6	35,7 $\pm$ 11,4	5,5 $\pm$ 2,4	0,0 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 1,9

CTCN= Contagem total de células nucleadas; Macróf= macrófagos; Linfóc= Linfócitos; Neutróf= Neutrófilos; Eosinó= Eosinófilos; Masto= mastócitos; Hemos= hemossiderófagos.

Não houve diferença entre o grupo positivo e negativo para HPIE ($p>0,05$).

5.2 Resultados dos Biomarcadores Plasmático da Lesão Pulmonar

5.2.1 Endotelina (ET-1)

A concentração de endotelina foi determinada antes do início do condicionamento físico por 6 semanas ($M0=0,92 \pm 0,63$ pg/mL) e após teste de esforço máximo em dois momentos: antes do teste de esforço máximo em

esteira (M1=0,67 $\pm$ 0,23 pg/mL) e 15 minutos após o tempo de fadiga (M15=0,84 $\pm$ 0,49 pg/mL) (Tabela 5).

Tabela 5: Médias e desvios-padrão da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote (n=8) em amostras coletadas antes condicionamento físico (M0), antes (M1) e depois de 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.

	M0-pg/mL	M1-pg/mL	M15-pg/mL
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
ET-1 (n=8)	0,92 $\pm$ 0,63	0,67 $\pm$ 0,23	0,84 $\pm$ 0,49

Não houve diferença significativa entre os momentos M0, M1 E M15 ($p > 0,05$)

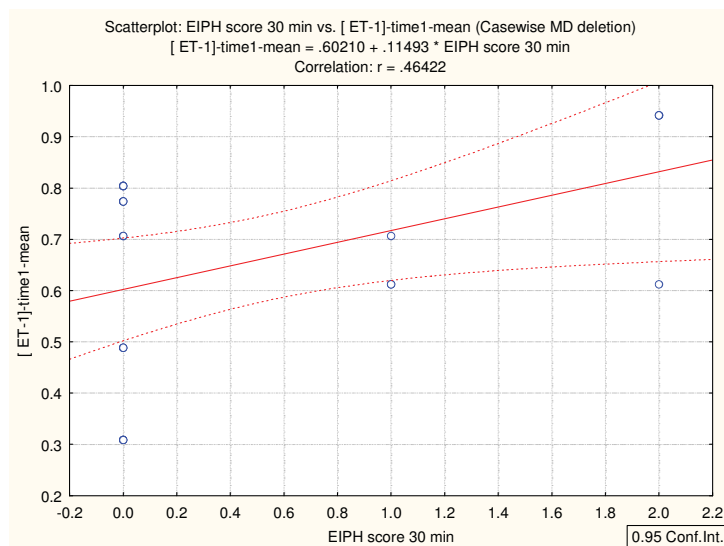
A concentração de endotelina foi determinada em dois momentos para o grupo positivo e negativo para HPIE, sendo que houve diferença significativa para ET-1 no grupo positivo e negativo para HPIE ($p = 0,026$) (Tabela 6).

Tabela 6: Médias e desvio-padrão da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com e sem HPIE em amostras coletadas antes (M1) e 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.

	[ET-1] /M1	[ET-1] /M15
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
HPIE negativo (n=5)	0,74 $\pm$ 0,36	1,30 $\pm$ 0,93
HPIE positivo (n=3)	1,08 $\pm$ 0,86	0,95 $\pm$ 0,85

Houve diferença entre o grupo positivo e negativo para HPIE ($p = 0,026$).

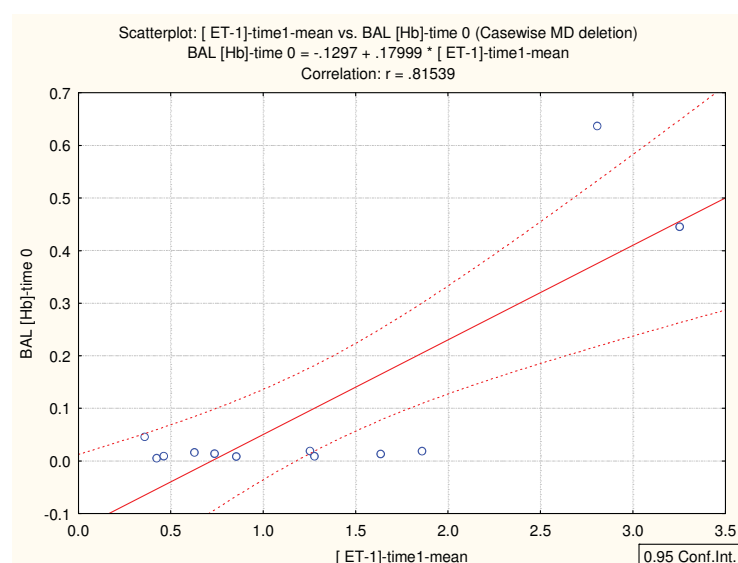
A concentração de ET-1 antes do teste de esforço máximo foi correlacionada ao escore endoscópico 30 minutos após fadiga (M30) ($r=0,46$; $p<0,05$) (Figura 5).



*Baixa correlação entre a concentração de ET-1 e o escore endoscópico aos 30 minutos depois da fadiga ($r=0.46$; $p>0,05$).

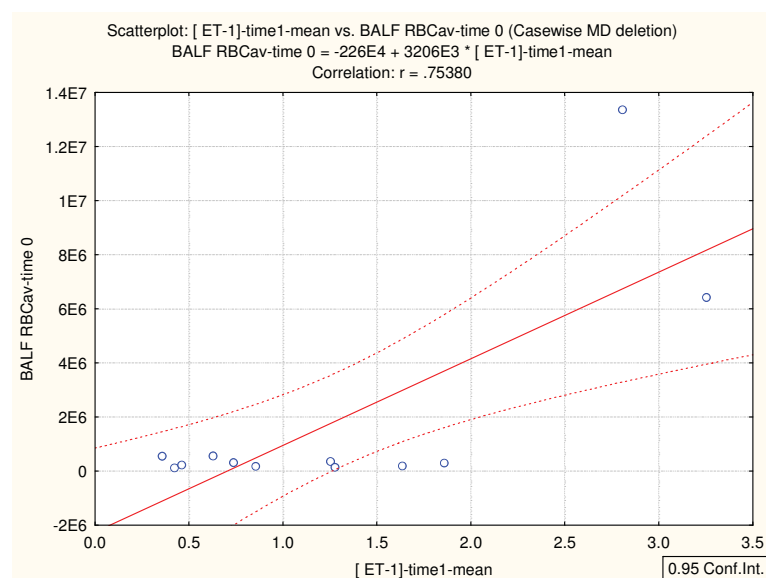
Figura 5: Correlação da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com o escore endoscópico aos 30 minutos depois do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.

A concentração de hemoglobina ($r=0,81$; $p<0,05$) apresentou alta correlação quando comparada aos resultados de ET-1 após condicionamento físico (Figura 6) assim como a contagem de hemácias ($r=0,75$; $p<0,05$) (Figura 7).



*Alta correlação entre a concentração de ET-1 e a concentração de hemoglobina no LBA ($r=0.81$; $p>0,05$).

Figura 6: Correlação da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com a concentração de hemoglobina no LBA, West Lafayette/IN, 2011.



*Alta correlação entre a concentração de ET-1 e a contagem de hemácias no LBA ($r=0,75$; $p>0,05$).

Figura 7: Correlação da concentração de ET-1 no plasma de cavalos de trote com contagem de hemácias no LBA, West Lafayette/IN, 2011.

5.2.2 Enzima conversora de angiotensina (ECA)

A atividade da ECA foi determinada antes do início do condicionamento físico de 6 semanas (M0), e antes (M1) e depois (M15) do teste de esforço máximo. Com relação a HPIE, os resultados encontram-se na tabela 7.

As atividades plasmáticas da ECA no grupo negativo para HPIE foram iguais a $50,60 \pm 8,69$ U/L no M1 e $70,46 \pm 15,08$ U/L no M15, e para o grupo positivos para HPIE $59,00 \pm 15,02$ U/L no M1 e $68,55 \pm 18,96$ U/L no M15. Não houve diferença significativa entre os grupos positivos e negativos para HPIE ($p=0,118$).

Tabela 7: Média e desvios-padrão da atividade de ECA no plasma de cavalos de trote com e sem HPIE em amostras coletadas antes (M1) e 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.

	[ECA] /M1	[ECA] /M15
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
HPIE positivo n=3	$59,00 \pm 15,02$	$68,55 \pm 18,96$
HPIE negativo n=5	$50,60 \pm 8,69$	$70,46 \pm 15,08$

Não houve diferença entre o grupo positivo e negativo para HPIE ($p=0,118$).

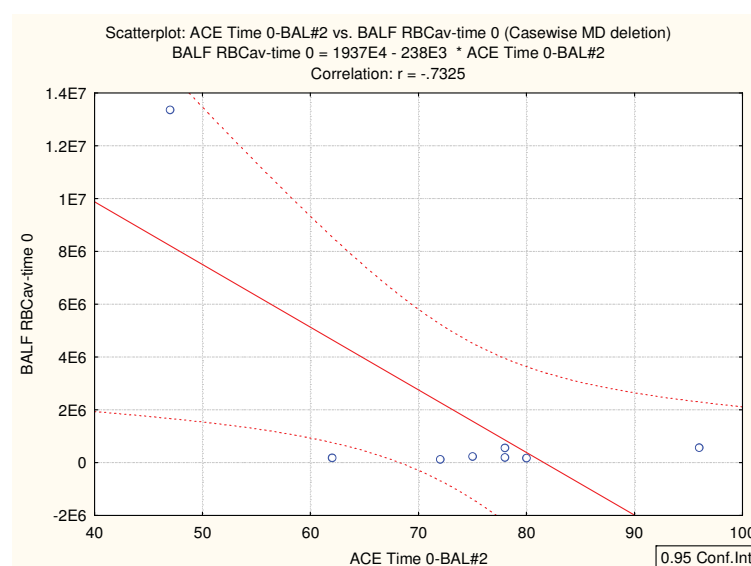
A atividade da ECA determinada 15 minutos após fadiga em esteira (M15) foi maior ($69,75 \pm 16,26$ U/L) que a atividade antes do teste de esforço máximo (M1) ($53,75 \pm 11,90$ U/L), sendo estatisticamente diferentes ($p=0,0019$) (Tabela 8).

Tabela 8: Média e desvios-padrão da atividade de ECA no plasma de cavalos de trote com e sem HPIE em amostras coletadas antes (M1) e 15 minutos (M15) do teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, West Lafayette/IN, 2011.

	M1-U/L	M15-U/L
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
ECA (n=8)	53,75±11,90	69,75±16,26

Houve diferença significativa entre os momentos M1 e M15 ($p=0,0019$).

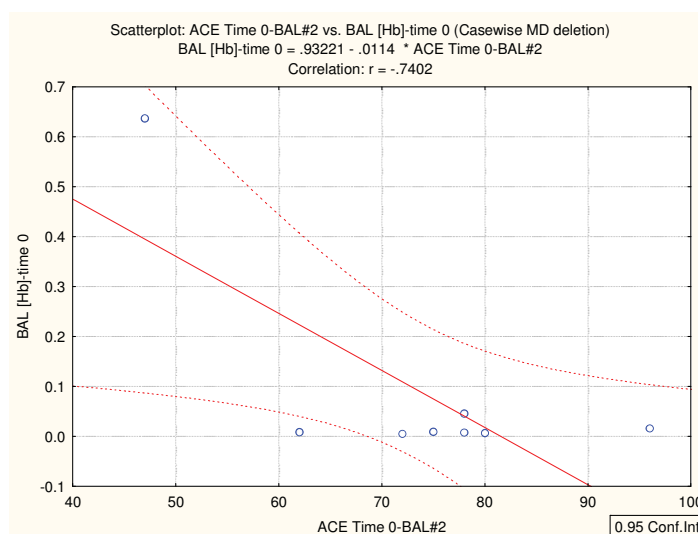
A atividade da ECA mostrou boa correlação, antes do teste de esforço máximo (M1), com a contagem de hemácias ($r=0,7325$; $p<0,05$) (Figura 8)



*Correlação positiva entre a atividade da ECA e a contagem de hemácias no LBA ($r=0.73$; $p>0,05$).

Figura 8 - Correlação da atividade de ECA no plasma de cavalos de trote com a contagem de hemácias no LBA após 90 minutos da fadiga, West Lafayette/IN, 2011.

A atividade da ECA também mostrou boa correlação com a concentração de hemoglobina ($r = 0,7402$; $p < 0,05$) (Figura 9).



*Correlação positiva entre a atividade da ECA e a concentração de hemoglobina no LBA ($r=0.74$; $P>0,05$).

Figura 9- Correlação da atividade de ECA no plasma de cavalos de trote com a concentração de hemoglobina no LBA após 90 minutos da fadiga, West Lafayette/IN, 2011.

6. DISCUSSÃO

Uma forma de se avaliar a capacidade física de um cavalo é testar as respostas do coração e dos vasos sanguíneos responsáveis pelas funções cardiovasculares, submetendo o animal ao exercício intenso. Relacionando-se a velocidade com a frequência cardíaca (FC) tem-se a resposta comumente utilizada para avaliar o potencial atlético dos cavalos. Geralmente a frequência cardíaca descreve um aumento linear com o incremento da velocidade até o ponto em que a FC chega ao seu máximo (acima de 200 bpm). A condição física desejada dos cavalos durante o período de treinamento foi avaliada pela mensuração da velocidade atingida em esteira, a qual marca a velocidade com precisão, e a frequência cardíaca a 200 batimentos por minuto (V200), aferida por frequencímetro digital (Polar), acoplado ao animal (Figura 1), porém sem a variável do peso do cavaleiro. Como esperado, o treinamento diário resultou em significativa melhora na capacidade cardiovascular dos cavalos. Este achado concorda com outros estudos que V200 e as velocidades de 9m/s a 10m/s melhoram a performance no fim de 6 semanas de treinamento (COUROUCE et al., 1999), embora outro estudo mostra que V200 a 8m/s melhora a performance somente depois de 9 semanas (EATON et al., 1999).

No presente estudo utilizou-se como meio de diagnóstico para HPIE a endoscopia 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, detectando-se maior quantidade de sangue nas vias aéreas aos 30 minutos após o teste de esforço máximo. Muitos pesquisadores consideram o exame endoscópico como elemento fundamental no diagnóstico definitivo de HPIE (TEJERO, 2001; BACCARIN, 2005; COUETIL e HINCHCLIFF, 2004). A grande vantagem do uso da endoscopia é a visualização das estruturas das vias aéreas anteriores e posteriores, definindo com isso, suas alterações anatômicas (ROY e LAVOIE, 2003), assim como a detecção e graduação em graus de sangue e muco nas vias aéreas. Apesar da subjetividade da graduação para HPIE, através da endoscopia, ela ainda é o teste de escolha após competições (BIRKS et al., 2002; DOUCET e VIEL, 2002a; DOUCET e VIEL, 2002b). Sendo um exame prático e rápido, a endoscopia permite uma boa quantificação da hemorragia.

Dos oitos cavalos de trote submetidos ao teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade somente 37,5% (n=3) apresentaram sangramento visível ao endoscópio, dentro de 15 a 120 minutos após fadiga, por três vezes em um mesmo indivíduo. Segundo Birks et al. (2002) endoscopias repetidas aumentam o percentual de animais positivos em algum grau.

A hemorragia observada nestes animais não foi severa, acredita-se que com os períodos de condicionamento físico gradual (Quadro 1 – Apêndice) não levou a hipertensão suficiente para causar hemorragia, outro fato que deve ser considerado é que estes cavalos são de trote e não galoparam na esteira, conseqüentemente não criou-se ondas de choque contínuas que pudesse causar HPIE. Todos os cavalos apresentaram algum grau de muco na traqueia durante endoscopia, mostrando que existe inflamação nestes animais. A inflamação das vias aéreas já foi correlacionada à etiopatogenia da HPIE por alguns pesquisadores (WEST, et al., 1997; OLIVER, et al., 2003; HINCHCLIFF et al., 2005b), apesar dos mecanismos pelos quais esta associação ocorre ainda serem apresentados de forma hipotética, como no recente estudo de Derksen et al. (2009). É importante lembrar que a presença de sangue no pulmão pode causar inflamação, por si só, nas vias aéreas (COUETIL e DENICOLA, 1999). Conseqüentemente, episódios sucessivos de hemorragias no pulmão podem, em parte, serem responsáveis pela presença de muco observado, nestes animais.

A utilização da técnica de lavado broncoalveolar (LBA) com auxílio de endoscopia é importante instrumento na avaliação citológica das vias respiratórias posteriores, permitindo diagnóstico mais preciso das afecções respiratórias em cavalos. Alguns cavalos têm evidências de hemorragia no pulmão, mas não apresentam sangue visível na traqueia. A taxa percentual de falsos negativos na traqueobroncoscopia para HPIE ainda é desconhecida (HINCHCLIFF, 2000). O padrão citológico faz com que aumentem as chances de diagnóstico de HPIE (ZINKL, 1992). A citologia pode auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios de etiologia alérgica, fúngica, bacteriana, parasitária entre outras e até processos físicos, como no caso da hemorragia induzida por exercício (BIAVA et al., 2006a; BIAVA et al., 2006b). No presente estudo, somente três cavalos mostraram sangue visível na traqueia após teste de

esforço máximo, em endoscopia seriadas, aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A avaliação citológica mostrou-se dentro dos valores de referência para o LBA nos cavalos com ou sem histórico de HPIE. Segundo Zinkl (1992) é difícil mensurar valores de referência para o LBA, pois a contagem pode variar conforme a técnica de colheita e processamento, porém a contagem diferencial de células no LBA de cavalos clinicamente sadios sempre mostrou predomínio de macrófagos e linfócitos, como nas citologias de animais clinicamente sadios (HEWSON e VIEL, 2002; BIAVA et al., 2006a). Padronizou-se tanto o local de colheita da LBA, na região caudo-dorsal, como o volume infundido, para evitar variação nos achados citológicos provocados por estes fatores (ZINKL, 1992; HEWSON e VIEL, 2002).

Em vista desses fatos os hemossideróforos no LBA seriam considerados marcadores da HPIE, pois onde não houve evidência endoscópica de sangue, a observação destas células no LBA diagnosticaria a HPIE (McKANE et al., 1993; MEYER et al., 1998). Todos os cavalos que apresentaram sangramento visível à endoscopia apresentaram hemossideróforos no LBA em maior proporção que cavalos que não apresentaram sangue visível e, isto está de acordo com Mckane et al. (1993) que afirmam que todos os cavalos apresentam certa quantidade hemossideróforos no LBA. Segundo Mckane e Slocombe (1999), são observados poucos hemossideróforos nos primeiros três dias após a hemorragia pulmonar. Estes autores relatam grande quantidade de hemossideróforos e mesmo de eritrócitos, totalmente preservados, 14 dias após a hemorragia, o que por sua vez, caracteriza a dificuldade do sistema mucociliar e fagocitário em remover os vestígios da hemorragia. Referem ainda, que se observa um pequeno número de hemossideróforos no lavado broncoalveolar, realizado 21 dias após a hemorragia pulmonar. Por desaparecer de forma lenta, em 21 dias, e por acumular-se de um episódio de HPIE a outro, a contagem de hemossideróforos no LBA não permitiu a quantificação da severidade da HPIE e nem influenciou na detecção de animais HPIE positivos (FOGARTY e BUCKLEY, 1991).

A contagem de hemácias no LBA foi indicada como um método sensível para quantificar a gravidade da HPIE em cavalos, no homem e em cães de

corrida da raça Greyhound (KING et al., 1990; HOPKINS et al., 1998; MEYER et al., 1998; LESTER et al., 1999; LANGSETMO et al., 2000). A contagem de hemácias no LBA seria proporcional à severidade de HPIE, mas esta correlação direta ainda não foi comprovada (HINCHCLIFF, 2000). Sabe-se que o exercício intenso eleva a quantidade de hemácias no LBA (McKANE e ROSE, 1995). Meyer et al. (1998) demonstraram que o aumento da pressão arterial pulmonar e consequentemente HPIE eleva o número de hemácias no LBA. Neste estudo, cavalos submetidos ao exercício intenso em esteira de alta velocidade mostraram aumento na contagem de hemácias no LBA, quando apresentaram algum grau de sangue visível à endoscopia.

Pesquisas mais recentes tem sugerido que a concentração de hemoglobina é a maneira mais precisa de quantificar a HPIE (PEREZ-MORENO et al., 2009). Neste trabalho encontrou-se boa correlação com a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina no LBA destes cavalos, obtidos 90 minutos após exercício em esteira.

O principal achado do presente estudo está relacionado às concentrações ET-1 e atividade da ECA em cavalos com e sem HPIE antes do início do treinamento e após o exercício em esteira. A hipótese é que cavalos com injúria pulmonar teriam aumento da de ET-1 e da atividade de ECA no plasma, após exercício de alta intensidade em esteira. Entretanto, contrariamente a esta hipótese, a concentração de ET-1 não aumentou em cavalos com HPIE e sim, nos cavalos sadios, não sangradores. Estudos sugerem que a concentração de ET-1 se eleva em humanos e ratos com doenças, como diabetes, insuficiência renal, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e hipertensão pulmonar (STEWART, 1991). Em cavalos, a maioria dos trabalhos com ET-1 tem sido focada em doenças respiratórias como a obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) ou DPOC (BENAMOU et al., 1999; COSTA et al., 2009). Entretanto, estas observações podem não ser as mesmas para cavalos com HPIE. Alguns pesquisadores determinaram a concentração de ET-1 no sangue e no LBA em cavalos saudáveis e com DPOC, antes e depois do exercício, demonstrando aumento na concentração de ET-1 em cavalos com DPOC, quando comparada aos saudáveis (BENAMOU et al., 1999). Benamou et al. (1998) também demonstraram que a

concentração de ET-1 está aumentada no sangue e no líquido de LBA em cavalos com obstrução recorrente das vias aéreas, submetidos a exercício intenso. Em ambas as situações aceita-se que a hipertensão pulmonar possa estar envolvida na liberação de ET-1. Entretanto, nossos achados nos animais sem HPIE são consistentes com McKeever et al. (2002) que mensuraram ET-1 no plasma de cavalos saudáveis no descanso e durante exercício, mostrando elevada concentração de ET-1 após exercício intenso. Estes dados sugerem que as mudanças na concentração de ET-1 podem ocorrer pela intensidade do exercício em esteira, já que a liberação da endotelina é estimulada pelo aumento do fluxo sanguíneo, de vasopressina e, de angiotensina (ROSSI, 1993). A meia vida da ET-1 é muito curta, somente poucos minutos e, por esta razão, estes valores retornam os níveis basais após 10 minutos (McKEEVER et al., 2002), embora segundo Benamou et al. (1999) ela permaneça circulante por até 40 minutos. No presente estudo, a concentração de ET-1 permaneceu altos em cavalos controles, não sangradores, 15 minutos após fadiga em esteira. Esta aparente discrepância entre nossos achados e estes estudos em cavalos pode resultar do pouco conhecimento do papel da ET-1 no pulmão dos cavalos. Estudos sugerem que a ET-1 é um peptídeo com potente efeito vasoativo e broncoconstritor (STEWART et al., 1991; BENAMOU et al., 1999; BENAMOU et al., 2001). Demonstrou-se aumento nos níveis de endotelina em resposta à hipertensão arterial (BENAMOU et al., 2001) e, a hipertensão arterial pulmonar nos cavalos tem sido sugerida como uma das etiologias da HPIE (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1993; HINCHCLIFF e McKEEVER, 1998). Segundo Erickson e Poole (2007), a HPIE é caracterizada por hipertensão pulmonar, edema nas regiões de troca gasosa, ruptura dos capilares pulmonares e presença de sangue nas vias aéreas. Cavalos com hemorragia pulmonar induzida por exercício apresentam maior hipoxemia arterial (COUËTIL e DENICOLA, 1999) o que poderia liberar ET-1. Entretanto, contrariamente a nossa hipótese, não parece existir aumento na concentração de ET-1, após fadiga, nos cavalos positivos para a HPIE. Padilha et al. (2006), relacionando a ET-1 com a pressão pulmonar arterial (Ppa), não conseguiram comprovar o papel da ET-1 no aumento da Ppa, já que o uso de antagonistas de ET-1 não diminuíram a Ppa e não preveniram a HPIE, durante exercício intenso, em cavalos atletas. O aumento do fluxo sanguíneo pulmonar durante o

exercício pode ter resultado em aumento da taxa de depuração da endotelina no sangue (McKEEVER et al., 2002). Com o objetivo checar esta possibilidade seria interessante, no futuro, mensurar ET-1 no LBA. Assim, mais estudos são necessários para melhor elucidar os fatores que afetam a concentração de ET-1 em cavalos sob exercício e nos portadores de HPIE.

A enzima conversora de angiotensina (ECA) atua na transformação de angiotensina-I em angiotensina-II que é um potente vasoconstritor. A atividade da ECA em amostras de sangue é uma ferramenta útil na medicina humana para a detecção e monitoramento do tratamento de doenças (COSTA et al., 2011c). Em cavalos, a atividade da ECA foi associada com doença endometrial (GANJAM e EVANS, 2006), estágio gestacional (TOPOUZIS et al., 1992), laminite (TILLMAN e MOORE, 1989) e até mesmo com a aptidão para esportes de resistência (COSTA, 2009). Embora a ação vasoconstritora da Angiotensina II pareça ser mais intensa nos rins e menos intensa no cérebro, nos pulmões e no músculo esquelético, acredita-se que a atividade da ECA no sangue equino pode ser usada como um marcador de lesão pulmonar em cavalos com HPIE. A prevalência de HPIE é aproximadamente 80% a 90% em cavalos de trote (LAPOINTE et al, 1994; BIRKS et al, 2003) e, hipotiza-se, que o aumento da pressão vascular pulmonar durante o exercício intenso resulta em estresse dos capilares pulmonares e, conseqüentemente, em HPIE (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1993). O exercício influencia a atividade da ECA no plasma em cavalos devido à maior demanda por regulação da pressão arterial provocado pela adaptação fisiológica. O aumento da atividade da ECA 15 minutos após exercício intenso é consistente com outro estudo (COSTA 2011c) e a interrupção de regimes de treinamento causa diminuição na atividade da ECA plasmática (COSTA et al., 2011a). Costa et al. (2011b) demonstraram que a média da atividade da ECA no plasma de eqüinos é de 69,0 U/L mensurada com espectrofotômetro e substrato sintético de ECA Furylacryloyl-phenylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG). Nosso estudo mostra aumento no nível plasmático de ECA 15 minutos após a fadiga ($50,85 \pm 10,15$ U/L para $69,8 \pm 16,3$ U/L) na esteira de alta velocidade obtida com a mesma metodologia e substrato, quando se comparou antes e depois do exercício intenso, respectivamente. Costa et al. (2011b) demonstraram que há pouca

concordância nos resultados obtidos entre diferentes métodos de análise da atividade da ECA no plasma de cavalos, não se devendo comparar os valores resultantes dos diferentes métodos. Gorski e Campbell (1991) compararam as mudanças na atividade de ECA, mensurada por dois diferentes métodos e demonstraram estreita concordância com as alterações nos valores da atividade da ECA plasmática mensurados com substrato FAPGG, mas com substrato (HHL) não obtiveram a mesma correlação. Richard et al. (2010) mensuraram a atividade da ECA no descanso, após exercício intenso em esteira e após corrida usando como substrato FAPGG e a atividade observada foi muito maior que os valores publicados para cavalos Thoroughbreds jovens (COOMER et al., 2003). Isto pode ser explicado pelo uso de diferentes métodos de detecção, raças e idades.

Parece ser difícil, e até questionável, falar sobre HPIE, pois existem diferenças entre resultados obtidos em diferentes pesquisas. Além disso, trabalhos científicos realizados em condições de pista diferem de trabalhos realizados em esteira de alta velocidade. Estudos realizados em esteiras são feitos com aumento progressivo de velocidade até exaustão, entretanto estes protocolos não são fieis à aceleração observada nas corridas, onde a velocidade máxima desenvolvida pelo animal deve ser atingida, no máximo, em 400 ou 600 metros, num tempo total de aproximadamente 56 segundos. Assim, as alterações fisiológicas tal como, o aumento da pressão vascular, ocorreriam de maneira muito mais drástica do que na maioria dos modelos experimentais (COSTA, 2004). É importante ressaltar esta diferença, na tentativa de explicar porque na condição deste experimento nossos cavalos não apresentaram sangramento intenso e/ou porque somente três cavalos foram HPIE positivos durante todo o experimento, com duração de 7 semanas, sendo submetidos a treinamentos diários.

O fato de termos observado cavalos com HPIE, avaliada pelo escore endoscópico em diferentes tempos, 15, 30, 60, 90 minutos após se exercitaram exaustivamente e a correlação positiva com a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina no LBA pode mostrar a severidade da HPIE nestes animais, mesmo com graus classificatórios menores. A lesão pulmonar que provavelmente se seguiu pode caracterizar-se por bronquiolite, aumento

dos hemossiderófagos e talvez até de neovascularização brônquica; estes danos pulmonares crônicos podem ser responsáveis pela elevação da atividade da ECA como visto em pacientes humanos com várias doenças pulmonares (UÇAR et al, 1997; COMELLAS e BRIVA, 2009). Esta constatação preliminar requer, para validação, um grupo maior de cavalos com outras doenças pulmonares para determinar, se estes fatos em particular, estão associados com as alterações na concentração de ET-1 e/ou atividade de ECA.

7. CONCLUSÃO

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

1° - O exercício em esteira de alta velocidade não levou à hemorragia pulmonar severa nestes animais;

2° - A endoscopia foi importante instrumento na detecção de cavalos com HPIE;

3° - Com o endoscópio detectou-se maior quantidade de sangue nas vias aéreas aos 30 minutos após teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade;

4° - O grau 1 e o grau 2 foram os graus de severidade de HPIE mais comuns nos animais HPIE positivos;

5° - A endoscopia seriada confirmou a persistência da HPIE nestes animais;

6° - A citologia do LBA, contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina estavam aumentadas em cavalos sangradores contribuindo para a identificação da severidade da HPIE em cavalos de trote submetidos ao exercício intenso em esteira de alta velocidade;

7° - E por fim, o presente estudo não fornece suporte para que a determinação de ET-1 e ECA possam ser usadas como biomarcadores de lesão pulmonar, em cavalos com e sem HPIE, submetidos ao exercício em alta intensidade.

Sugere-se a condução de novos estudos para o entendimento da etiopatogenia da HPIE em cavalos atletas bem como o papel destes biomarcadores em casos de lesão pulmonar.

8. REFERÊNCIAS

1. ART, T.; BAYLY, W.; LEKEUX, P. Pulmonary function in the exercising horse. In: LEKEUX, P. (Ed.). **Equine respiratory disease**. Ithaca: International Veterinary Information Services, 07 de outubro 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/art/chapter.asp?LA=1>. Acesso em: 2010.
2. BACCARIN, R. Y. A. Diagnóstico e tratamento das pneumopatias de esforço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2., SEMANA DO CAVALO – SIMCAV, 4., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. p.12-28.
3. BARAKZAI, S. Z.; DIXON, P.M. Epistaxis in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.16, p.207-217, 2004.
4. BENAMOU, A. E.; ART, T.; MARLIN, D. J.; ROBERTS, C. A.; LEKEUX, P. Variations in systemic and pulmonary endothelin-1 in horses with recurrent airway obstruction (heaves). **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.11, p.231-235, 1998.
5. BENAMOU, A. E.; ART, T.; MARLIN, D. J.; ROBERTS, C. A.; LEKEUX, P. Effect of exercise on concentration of immunoreactive endothelin in bronchoalveolar lavage fluid of normal horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Equine Exercise Physiology**, v.30, p.92-95, 1999.
6. BENAMOU, A. E.; MARLIN, D. J.; LEKEUX, P. Equine pulmonary and systemic haemodynamic responses to endothelin-1 and selective ET(A) receptor antagonist. **Equine Veterinary Journal**, v.33, p.337-344, 2001.

7. BENAMOU, A. E.; MARLIN, D. J.; CALLINGHAM, B. C.; HILEY, R. C.; LEKEUX, P. Spasmogenic action of endothelin-1 on isolated equine pulmonary artery and bronchus. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.190-196, 2003.
8. BIAVA, J. S.; GONÇALVES, R. C.; DONRBUSCH, P. T.; MICHELOTTO JÚNIOR, P. V.; BIONDO, A. W.; CASSOU, F.; ZANOTTO, G. M. Avaliação clínica e citológica do trato respiratório de cavalos Quarto de Milha após exercício. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.60-65, 2006a.
9. BIAVA, J. S.; GONÇALVES, R. C.; DONRBUSCH, P. T.; ZANOTTO, G. M.; BIONDO, A. W. Avaliação clínica e citologia do trato respiratório de cavalos Quarto de Milha após exercício. **Seropédica**, v.26, supl., p.143, 2006b.
10. BIRKS, E. K.; COSTELLO, O. M.; FU, Z.; TYLER, W. S.; WEST, J. B. Very high pressures are required to cause stress failure of pulmonary capillaries in thoroughbred racehorses. **Journal of Applied Physiology**, v.82, p.1584-1592, 1997.
11. BIRKS, E. K.; SHULER, K. M.; SOMA, L. R.; MARTINS, B. B.; MARCONATO, L.; DEL PIERO, F.; TELEIS, D. C.; SCHAR, D.; HESSINGER, A. E.; UBOH, C. E. HPiE: postrace endoscopic evaluation of standardbreds and thoroughbreds. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.34, p.375-378, 2002.
12. BIRKS, E. K.; DURANDO, M. M.; STEVE, M. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v.19, p.87-100, 2003.

13. CARMONA, A. K.; SCHWAGER, SYLVA, L.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; STURROCK, E. D. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I converting enzyme assay. **Nature Protocols**, v.1, p.1971-1972, 2006.
14. COMELLAS, A. P.; BRIVA, A. Role of endothelin-1 in acute lung injury. **Translation Research**, v.153, p.263-271, 2009.
15. COOMER, R. R.; FORHEAD, A. J.; BATHE, A. P.; HEAD, M. J. Plasma angiotensin-converting enzyme (ACE) concentration in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.96-98, 2003.
16. COSTA, L. L. R.; EADES, S. C.; VENUGOPAL, C. S.; MOOREM R. M. Plasma and pulmonary fluid endothelin in horses with seasonal recurrent airways obstruction. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.1239-1246, 2009.
17. COSTA, M. F. M. **Avaliação da influência do peso do jóquei, distância percorrida, tipo de pista e estação do ano na persistência e na severidade de hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) e sua correlação com a colocação obtida em animais de corrida da raça puro-sangue**. 2004. 121f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
18. COSTA, M. F. M. Association between resting angiotensin-converting enzyme (ACE) activities in equine plasma and racing success for sprint and endurance in thoroughbred in Australian: preliminary findings. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 11., 2009, Guarujá. **Proceedings...** Guarujá, 2009.

19. COSTA, M. F. M.; DAVIES, H. M.; ANDERSON, G. A.; SLOCOMBE, R. F. Effects of two training protocols on Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.43, p.466-470, 2011a.
20. COSTA, M. F. M.; ANDERSON, G. A.; DAVIES, H. M.; SLOCOMBE, R. F. Effects of acute exercise on angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity in horses. **Equine Veterinary Journal**, 2011b. No prelo
21. COSTA, M. F. M.; CARMONA, A. K.; ALVES, M. F. M.; RYNAN, T. M.; DAVIES, H. M.; ANDERSON, G. A.; SLOCOMBLE, R. F. Determination of angiotensin I-converting enzyme activity in equine blood: lack of agreement between methods of analysis. **Journal of Veterinary Science**, v.12, p.21-25, 2011c.
22. COUETIL, L. L.; DENICOLA, D. B. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.30, p.77-82, 1999.
23. COUETIL, L. L.; HINCHCLIFF, K. W. Non-infectious diseases of the lower respiratory tract. In: _____. **Equine sports medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2004. p.633-644.
24. COUROUCE, A. Field exercise testing for assessing fitness in French standarbred trotters. **Veterinary Journal**, v.157, p.112-122, 1999.
25. DERKSEN, F. J.; WILLIAMS, K. J.; PANNIRSELVAM, R. R.; FEIJTER-RUPP, H.; STEEL, C. M.; ROBINSON, N. E. Regional distribution of collagen and haemosiderin in lungs of horses with exercise-induced pulmonary haemorrhage. **Equine Veterinary Journal**, v.41, p.586-691, 2009.

26. DOUCET, M. Y.; VIEL, L. Alveolar macrophage graded hemosiderin score from bronchoalveolar lavage in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage and controls. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.281-286, 2002a.
27. DOUCET, M. Y.; VIEL, L. Clinical, radiographic, endoscopic, bronchoalveolar lavage and lung biopsy findings in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. **Canadian Veterinary Journal**, v.43, p.195-202, 2002b.
28. DZAU, V. J. Circulating versus local rennin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation**, v.77, suppl.1, p.4-13, 1988.
29. EATON, M. D.; HODGSON, D. R.; EVANS, D. L.; ROSE, R. J. Effects of low-and moderate-intensity training on metabolic responses to exercise in thoroughbreds. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.30, p.521-527, 1999.
30. EPPINGER, M. **Hemorragia pulmonar de esforço e o desempenho de equinos PSI {Equus caballus} em corridas de galope no jockey club do Paraná**. 1990. 167f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.
31. ERICKSON, H. H. A review of exercise-induced pulmonary hemorrhage and new concepts for prevention. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association Equine Practitioners**, v.46, p.193-196, 2000.

32. ERICKSON, H. H.; POOLE, D. C. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In: LEKEUX, P. (Ed.). **Equine respiratory disease**. Ithaca: International Veterinary Information Services, 7 de novembro de 2007. Disponível em: <[http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/erickson/chapter.asp? LA=1](http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/erickson/chapter.asp?LA=1)>. Acesso em: 2010.
33. FAGAN, K. A.; McMurtry, I. F.; RODMAN, D. M. Role of endothelin-1 in lung disease. **Respiratory Research**, v.2, p.90-101, 2001.
34. FORGARTY, U.; BUCKLEY, T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. **Equine Veterinary Journal**, v.6, p.434-437, 1991.
35. GANJAM, V. K.; EVANS, T. J. Equine endometrial fibrosis correlates with 11 beta-HSD2, TGF-beta1 and ACE activities. Molecular and cellular. **Endocrinology**, v.27, p.104-108, 2006.
36. GERBER, V.; STRAUB, R.; MARTI, E.; HAUPTMAN, J.; HERHOLZ, C.; KING, M.; IMHOF, A.; TAHON, L.; ROBINSON, N. E. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horses variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.576-582, 2004.
37. GOETZ, T. E.; MANOHAR, M.; GRIFFIN, R.; SULLIVAN, E. Changes in plasma electrolyte concentration of strenuously exercising thoroughbred horses untreated and treated with furosemide. In: **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, 43., 1997, Arizona. **Anais Eletrônico...** Arizona: AAEP, 1997. Disponível em: <[http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/1997/ Goetz.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/1997/Goetz.pdf)>. Acesso em: 7 dez. 1997.

38. GORSKI, T. P.; CAMPBELL, D. J. Angiotensin-converting enzyme determination in plasma during therapy with converting enzyme inhibitor: two methods compared. **Clinical Chemistry**, v.37, p.1390-1393, 1991.
39. HEWSON, J.; VIEL, L. Sampling, microbiology and cytology of respiratory. In: LEKEUX, P. (Ed.). **Equine respiratory disease**. Ithaca: International Veterinary Information Services, 24 de junho de 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/viel/chapter_frm.asp?LA=>>. Acesso em: 2010.
40. HINCHCLIFF, K. W. Counting red cells – is it an answer to HPIE? **Equine Veterinary Journal**, v.32, p.362-363, 2000.
41. HINCHCLIFF, K. W.; JACKSON, M. A.; BROWN, J. A.; DREDGE, A. F.; O' CALLAGHAN, P. A.; McCAFFREY, J. P.; SLOCOMBE, R.E.; CLARKE, A.F. Tracheobronchoscopic assessment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.596-598, 2005a.
42. HINCHCLIFF, K. W.; JACKSON, M. A.; MORLEY, P. S.; BROWN, J. A.; DREDGE, A. F.; O' CALLAGHAN, P. A.; McCAFFREY, J. P.; SLOCOMBE, R.E.; CLARKE, A. F. Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage and performance in Thoroughbred racehorses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.5, p.768-774, 2005b.
43. HINCHCLIFF, K. W.; McKEEVER, K. H. Fluid administration attenuates the haemodynamic effect of frusemide in running horses. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.246-250, 1998.

-
44. HOPKINS, S. R.; BAYLY, W. M.; SLOCOMBE, R. F.; WAGNER H.; WAGNER, P. D. Effect of prolonged heavy exercise on pulmonary gas exchange in horses. **Journal of Applied Physiology**, v.84, p.1723-1730, 1998.
45. KING, R. R.; RASKIN, R. E.; ROSBOLT, J. P. Exercise induced pulmonary hemorrhage in the racing Greyhound. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.4, p.130, 1990.
46. LANGSETMO, I.; MEYER, M. R.; ERICKSON, H. H. Relationship of pulmonary arterial pressure to pulmonary haemorrhage in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.32, p.379-384, 2000.
47. LAPOINTE, J. M.; VRINS, A.; McCARVILL. E. A survey of exercise-induced pulmonary haemorrhage in Quebec Standardbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v.26, p.482-485, 1994.
48. LESTER, G.; CLARK, C.; RICE, B.; STEIBLE-HARTLESS, C.; VETRO-WIDENHOUSE, T. Effect of timing and route of administration of furosemide on pulmonary hemorrhage and Pulmonary arterial pressure in exercising thoroughbred racehorses. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.1, p.22-28, 1999.
49. LOEFFLER, B. M.; MAIRE, J.P. Levels of immunoreactive endothelin-1 measured in plasma are dependent upon assay conditions of the radioimmunoassay. **Journal of Vascular Research**, v.29, p.160, 1992.
50. MANOHAR, M.; GOETZ, T. E.; SULLIVAN, E.; GRIFFIN, R. Pulmonary vascular pressures of HPIE-positive thoroughbred horses during exercise performed at maximal heart rate after administration of various doses of furosemide. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997, Arizona. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/1997/Manohar.pdf>>. Acesso em: 7 dez. 1997.
-

51. MARKEWITZ, B. A.; KOHAN, D. E.; MICHAEL, J. R. Endothelin-1 synthesis receptors and signal transduction in alveolar epithelium: evidence for an autocrine role. **The American Journal of Physiology**, v.268, p.192-200, 1995.
52. McKANE, S. A.; CANFIELD, P. J.; ROSE, R. J. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of throughbred racehorses in training. **Australian Veterinary Journal**, v.70, p.401-404, 1993.
53. McKANE, S. A.; ROSE, R. J. Effects of training intensity and training on bronchoalveolar lavage cytology. In: ROBINSON, N. E. (Ed.). **Equine exercise physiology 4**. Newmarket: EVJ, 1995. p.58-62.
54. McKANE, S. A.; SLOCOMBE, R. F. Sequential changes in bronchoalveolar cytology after autologous blood inoculation. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.30, p.126-130, 1999.
55. McKEEVER, K. H.; ANTAS, L. A.; KEARNS, C. F. Endothelin Response during and after exercise in horses. **The Veterinary Journal**, v.164, p.38-46, 2002.
56. MEYER, T. S.; FEDDE, M. R.; GAUGHAN, E. M.; LANGSETMO, I.; ERICKSON, H. H. Quantification of exercise-induced pulmonary haemorrhage with bronchoalveolar lavage. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.284-288, 1998.
57. MOORE, B. R. Lower respiratory tract disease. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v.12, p.457-473, 1996.
58. NEWTON, J. R.; ROGERS, K.; MARLIN, D. J.; WOOD, J. L.; WILLIAMS, R. B. Risk factors for epistaxis on British racecourses: evidence for locomotory impact-induced trauma contributing to the aetiology of exercise-induced pulmonary haemorrhage. **Equine Veterinary Journal**, v.37, p.402-411, 2005.

59. ORFANOS, S. E.; ARMAGANIDIS, A.; GLYNOS, C.; PSEVDI, E.; KALTSAS, P.; SARAFIDOU, P.; CATRAVAS, J. D.; DAFNI, U. G.; LANGLEBEN, D.; ROUSSOS, C. Pulmonary capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in acute lung injury. **Circulation**, v.102, p.2011-2018, 2000.
60. ORFANOS, S. E.; LANGLEBEN, D.; KHOURY, J.; SCHLESINGER, R. D.; DRAGATAKIS, L.; ROUSSOS, C.; RYAN, J. W.; CATRAVAS, J. D. Pulmonary capillary endothelin-bound angiotensin-converting enzyme activity in humans. **Circulation**, v.99, p.1593-1599, 1999.
61. OIKAWA, M. Exercise-induced haemorrhagic lesions in the dorsocaudal extremities of the caudal lobes of the lungs of young thoroughbred horses. **Journal of Comparative Pathology**, v.121, p.339-347, 1999.
62. OLIVER, O.; STAMPFLI, H.; TEJERO, E. A. Enfermedades respiratorias de interes em el caballo de deporte. Republica Argentina. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE CABALLOS DE DEPORTE - CICADE, 2003, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires, 2003.
63. PADILLA, D. J.; EPP, T. S.; MCDONOUGH, P.; MARLIN, D. J.; ERICKSON, H. H.; POOLE, D. C. Effects of a specific endothelin-1A antagonist on exercise-induced pulmonary haemorrhage (HPIE) in thoroughbred horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.36, p.198-203, 2006.
64. PASCOE, J. R.; FERRARO, G. L.; CANNON, J. H.; ARTHUR, R. M.; WHEAT, J. D. Exercise-Induced Pulmonary hemorrhage in racing Thoroughbreds: a preliminary study. **American Journal Veterinary Research**, v.42, p.703-707, 1981.

-
65. PEREZ-MORENO, C. L.; COUETIL, L. L.; PRATT, S. M.; OCHOA-ACUNA, H. G.; RASKIN, R. E.; RUSSELL, M. A. Effect of furosemide and furosemide-arbazochrome combination on exercise-induced pulmonary hemorrhage in Standardbred racehorses. **The Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.821-827, 2009.
66. RAINS, J. R.; COLLIER, M. A.; MACALLISTER, C. G. Epistaxis/exercised induced pulmonary hemorrhage in horses. In: Equestrian Library Studies and Research. Disponível em: <www.mrhorse.com>. Acesso em: 2007.
67. RICHARD, E. A.; FORTIER, G. D.; PITEL, P. H.; DUPUIS, M.C.; VALETTE, J. P.; ART, T.; DENOIX, J. M.; LEKEUX, P. M.; ERCK, E. V. Sub-clinical diseases affecting performance in Standardbred trotters: diagnostic methods and predictive parameters. **Veterinary Journal**, v.184, p.282-289, 2010.
68. ROY, M. F.; LAVOIE, J. P. Tool for the diagnosis of equine respiratory disorders. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v.19, p.1-7, 2003.
69. ROSSI, N. F. Effect of endothelin-3 on vasopressin release in vivo and water excretion in vivo in Long-Evans rats. **Journal of Physiology**, v.461, p.501-511, 1993.
70. SCHROTER, R. C.; MARLIN, D.J.; DENNY, E. Exercise-induced pulmonary haemorrhage (HPIE) in horses results from locomotory impact induced trauma – a novel, unifying concept. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.186-192, 1998.
71. SCOTT, M. L. Bleeding in race horses: a new way to control it. **Veterinary Medicine**, v.48, p.95-97, 1953.
-

72. SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Biochemistry of angiotensin I-converting enzyme. In: ROBERTSON, J. I. S.; NICHOLLS, M. G. (Eds.). **The renin-angiotensin system**. London: Gower Medical Publishing, 1993. v.1, p.10.1-10.10.
73. STEWART, D. J. **Endothelin in human disease II**: shock, pulmonary hypertension, and congestive heart failure. New York: Oxford University Press, 1991. p.221-237.
74. TAKAHASHI, T.; HIRAGA, A.; OHMURA, H.; KAI, M.; JONES, J. H. Frequency of and risk factors for epistaxis associated with exercise-induced pulmonary haemorrhage in horse: 251, 606 race starts (1992 - 1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.128, p.215-218, 2001.
75. TEJERO, A. E. Hemorragia pulmonar Inducida por El Ejercicio. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE CABALLOS DE DEPORTE - CICADE, 2001, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires, 2001.
76. TARQUINI, R.; PERFETTO, F., TARQUINI, B. Endothelin-1 and Paget's bone disease: is there a link? **Calcified Tissue International**, v.63, p.118-120, 1998.
77. TILLMAN, L. G.; MOORE, J. N. Serum angiotensin converting enzyme activity and response to angiotensin I in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.21, p.80-83, 1989.
78. TOPOUZIS, S.; CATRAVAS, J. D.; RYAN, J. W.; ROSENQUIST, T. H. Influence of vascular smooth muscle heterogeneity on angiotensin converting enzyme activity in chicken embryonic aorta and in endothelial cells in culture. **Circulation Research**, v.71, p.923-931, 1992.

79. TRAPP, S. M.; VAILATI, M. C. F.; MATSUBARA, B. B.; SCHWARTZ, D. S. Efeitos da Angiotensina II no sistema cardiovascular. **Archives of Veterinary Science**, v.14, p.233-243, 2009.
80. UÇAR, G.; YILDIRIM, Z.; ATAOL, E.; ERDOGAN, Y.; BIBER, C. Serum angiotensin converting enzyme activity in pulmonary diseases: correlation with lung function parameters. **Life Science**, v.61, p.1075-1082, 1997.
81. WEISS, D. J.; SMITH, C. M. Haemorrheological alterations associated with competitive racing activity in horses: implications for exercise-induced pulmonary haemorrhage (HPIE). **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.7-12, 1998.
82. WEST, J. B.; MATHIEU-COSTELLO, O.; JONES, J. H.; BIRKS, E. K.; LOGEMANN, R. B.; PASCOE, J. R.; TYLER, W. S. Stress failure of pulmonary capillaries in racehorses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. **Journal of Applied Physiology**, v.75, p.1097-1109, 1993.
83. WEST, J. B.; TYLER, W. S.; BIRKS, E. K.; MATHIEU-COSTELLO, O. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In: RANTANEN, N. W.; HAUSER, M. L. **Dubai Internacional Equine Symposium: the diagnosis and treatment of respiratory Disease**. USA: Neyenesch Printers Inc., 1997. p.353-368.
84. ZINKL, J. G. The lower respiratory tract. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Cytology end hematology of horse**. Goleta: American Veterinary Publications, 1992. p.77-87.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo: Biomarkers of lung injury in Standardbred horses with Exercise – Induced Pulmonary Hemorrhage

A ser encaminhado para o periódico The Veterinary Journal

ISSN: 1090-0233

Normas para publicação disponível em:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623077/authorinstructions

Biomarkers of lung injury in Standardbred horses with Exercise – Induced Pulmonary Hemorrhage

*Janaina S. Biava a, Roberto C. Gonçalves b, Stacy H. Tinkler c, Kathleen Ivester c, Peter D. Constable c, Laurent L. Couëttil c**
a PhD student, Graduate College of Veterinary Medicine, Sao Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo 18.618-000, Brazil.
b Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Sao Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo 18.618-000, Brazil.
c Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907-2026, USA.

* Correspondence author. Tel: +1 765 49-46808
 Email address: couetill@purdue.edu (L. L. Couëttil).

Abstract

The objective of the present study was to measure potential markers of lung injury, ET-1 and ACE, before the beginning of training, at rest and 15 minutes after fatigue on the high speed treadmill in Standardbred horses with or without HPIE. Eight Standardbred horses (4 fillies and 4 geldings) aged 3 to 5 years old (mean 4 years old) were included in this study. The severity of HPIE was scored on scale from 0 to 4 after 15 and 30 minutes after fatigue by tracheobronchoscopy. All horses performed the standardized exercise test (SET) which simulate the exercise and blood samples were collected before the exercise and 15 minutes after fatigue.

Three horses were HPIE positive upon endoscopic exam and it helped to determine the severity based upon the volume and distribution of blood in airways. ET-1 concentration in plasma in HPIE negative was equal to 0.73 ± 0.36 in at rest and 1.30 ± 0.93 in 15 minutes after fatigue and HPIE positive to 1.08 ± 0.86 in at rest and 0.95 ± 0.85 in 15 minutes after fatigue. It is noticed that ET-1 concentration in plasma measured at rest did not increase in HPIE positive, while it increased in HPIE negative.

37 ACE activity in plasma in HPIE negative horse were igual to 50.60 ± 8.69 at rest and
38 70.46 ± 15.08 in 15 minutes after fatigue and for HPIE positive 59.00 ± 15.02 at rest and
39 68.55 ± 18.96 in 15 minutes after fatigue. ACE activity in plasma was higher 15 min
40 after fatigue for HPIE positive and HPIE negative alike. Statistical diferrence can be
41 showed when compared between after training but at rest and 15 min after fatigue
42 ($p=0,0019$).

43

44 According to the results, ET-1 and ACE might not be used as specific biomakers
45 for pulmonary injury in Standardbred horses with or without HPIE.

46

47 *Keywords:* Horses, Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage, ET-1 and ACE.

48

49 **Introduction**

50 The term exercise-induced pulmonary hemorrhage (HPIE) has been used to describe
51 the bleeding of pulmonary origin associated with high intensity physical activities
52 (Erickson, 2000; Birks et al., 2003). HPIE is an important problem in athletic horses due
53 to the high economic impact caused by the drop in performance, loss of training days,
54 need for medication before physical activity, increased recovery time after intensive
55 exercise, veterinary cost and animal wastage (Smith, 1992; Kindig et al., 2001;
56 Hinchcliff et al., 2005b). Different mechanisms have been proposed to explain HPIE
57 including stress failure of pulmonary capillaries, remodeling of pulmonary veins, upper
58 airway obstruction, small airway disease, altered blood viscosity, impaired coagulation
59 and trauma following locomotory impact. Today the most accepted theory is that HPIE
60 is caused by increased pressure of the pulmonary vasculature during strenuous exercise,
61 resulting in breakage of the pulmonary capillaries and leakage of blood into the alveolar

62 space (Birks et al., 1997; Couetil and Hinchcliff, 2004).

63

64 Endothelins are 21-amino acid vasoactive peptides, of which 3 distinct isoforms
65 exist (ET-1, ET-2, and ET-3). ET-1, the most abundant isoform, may induce the
66 formation of pulmonary edema during acute lung injury through an increase in capillary
67 hydrostatic pressure, recruitment of inflammatory cells that disrupt the
68 endothelial/epithelial barrier, and upregulation of mediators that increase vascular
69 permeability (Comellas and Briva, 2009). Several studies in horses suggest that ET-1
70 contributes to modulate pressures within the pulmonary circulation (Benamou et al.,
71 1998; Benamou et al., 1999; Benamou et al., 2001; Benamou et al., 2003). Benamou et
72 al. (2001) demonstrated that, in resting horses, administration of exogenous ET-1
73 induces a significant increase in pulmonary artery pressure (Ppa) therefore, ET-1 would
74 contribute to increased Ppa during high intensity exercise and consequently HPIE.
75 Padilla et al. (2006) showed no effect of ET-1 in the increased Ppa and therefore HPIE,
76 during maximal exercise in horses.

77

78 Angiotensin-converting enzyme (ACE) activity is an important peptide of the renin-
79 angiotensin-aldosterone system. This peptide influences arterial blood pressure
80 regulation and body fluids homeostasis through conversion of angiotensin I to the
81 potent vasopressor angiotensin II (Orfanos et al., 1999; Costa et al., 2011b). ACE
82 activity alteration is an early, sensitive, and quantifiable lung injury index in animal
83 models, and may be used as a quantifiable marker of underlying pulmonary capillary
84 endothelial dysfunction (Orfanos et al., 2000).

85

86 The objective of this study was to determine if blood ET-1 and ACE would be

87 indicators of lung injury in horses with HPIE. We hypothesized that blood ET-1
88 concentration and ACE activity would be elevated in horses with HPIE and that the
89 magnitude of the increase in blood levels would be related to the severity of HPIE.

90

91 **Materials and Methods**

92 *Animals*

93 This study was approved by The Purdue Animal Care and Use Committee. Eight
94 Standardbred horses (4 fillies and 4 geldings) aged 3 to 5 years old (mean 4 years old)
95 were included in this study. Criteria for selection were normal physical examination and
96 hematology, no lameness and no abnormalities upon dynamic endoscopy on a high-
97 speed treadmill prior to the start of the study. Horses were housed in box stalls, fed a
98 diet consisting of a commercial pelleted concentrate (Omolene 200, Purina Mills) with
99 ad libitum access to alfalfa hay, mineral block supplement and water. Horses were
100 divided into two groups based on endoscopy of the tracheobronchial tree 1 hour post-
101 treadmill exercise to fatigue with control horses (Group 1) showing no evidence of
102 blood in the trachea and HPIE horses (Group 2) had blood visible in the trachea. Horses
103 had not been trained or exercised strenuously for at least 1 month prior the start of the
104 study.

105

106 *Experimental design*

107 After an 8-week training period, horses completed a crossover study examining
108 the effect of bicarbonate administration on performance. Each horse performed a
109 simulated race protocol test after receiving by nasogastric intubation one of 3 treatments
110 in randomized order: 3 l of water = Control; 0,5 g/kg of body weight sodium

111 bicarbonate in 3 l of water = medium dose; 1 g/ kg of body weight sodium bicarbonate
112 in 3 l of water = high dose. Each race simulation was performed 1 week apart.

113

114 *Standardised exercise test (SET)*

115 All treadmill tests were performed in a climate-controlled building and two fans
116 were positioned in front of the treadmill during exercise to cool horses down.
117 Throughout the training period, horses were weighed once per week and a standardized
118 exercise test (SET) was performed on weeks 2, 4 and 6 to determine treadmill speed for
119 a heart rate of 150 and 200 beats per minute (V_{150} and V_{200}) and for a plasma lactate of
120 4 mmol/l (V_{La4}). The SETs consisted of a warm-up period (1.7 m/s for 4 minutes and
121 then 5 m/s for 15 minutes) followed by incremental 90-second speed steps at 9.0, 11.0
122 m/s, 12 and 13 m/s conducted with the treadmill slope set at +5 %. The exercise test
123 was stopped when the horse exhibited signs of fatigue and was unable to maintain its
124 position at the front of the treadmill despite humane encouragement or after 1 ½
125 minutes at 13 m/s.

126

127 *Blood Sample collection*

128 Pre-training baseline blood samples were collected by jugular venipuncture using a
129 20 gauge 1 inch Vacutainer needle and vacutainer tube holder into 4 mL plastic green
130 top vacutainers containing 144 USP lyophilized lithium heparin and 6 mL plastic
131 lavender top vacutainers containing EDTA. Before the SET each horse's jugular vein
132 was clipped followed by aseptic preparation, injection of local anesthetic (2 mL of 2%
133 lidocaine) subcutaneously and placement of a 16 gauge 3.5 inch catheter (Angiocath).
134 The catheter was glued to the skin, connected to an extension set and then flushed with
135 heparinized 0.9 NaCl solution. Protocol for sample collection consisted first of

136 aspiration of flush solution and blood into a 12 mL sterile plastic syringe totaling more
137 than twice the IV line volume followed by aspiration of 12 mL of blood in another
138 sterile plastic syringe. The second blood sample was immediately transferred to
139 vacutainer tubes using a 20 gauge 1.5 inch needle and tubes were gently inverted 8 to
140 10 times. Blood samples were collected using this protocol at rest prior to SET and
141 post-SET 15 minutes after fatigue. All the blood samples were centrifuged at 1,040 x g
142 for 10 minutes and all plasma samples were immediately stored at - 20° C freezer until
143 analysis.

144

145 *Endoscopy evaluation:*

146 Following the SET, a nose twitch was applied to the horse and a flexible video-
147 endoscope (200 cm long, 9 mm diameter) was advanced in the animals' proximal
148 airways until the carina was visualized. The procedure was videotaped for later scoring
149 of the amount of blood and mucus visible in the tracheobronchial tree.
150 Tracheobronchoscopic examinations were performed 15, 30, 60 and 90 min post-
151 fatigue. Animals were considered HPIE positive if any amount of blood was present in
152 the trachea at any time point. Severity of HPIE was graded according to Hinchcliff et
153 al., 2005a.

154

155 *Measurement of ET-1 in Plasma*

156 The plasma ET-1 concentrations were measured by a quantitative sandwich
157 enzyme immunoassay technique (Quanti Glo, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN.)
158 that had been previously validated (Menzies-Gow et al. 2005). Plasma samples were
159 thawed and all reagents were prepared before use at room temperature. Standard curves
160 for the immunoassay were prepared according to the manufacturer's instructions. 100

161 μ L of Assay Diluent RD1-19 were added to all wells. Standard (control), blank (saline
162 solution) and plasma samples (100 μ L) were then assayed in duplicate following the
163 manufacturer's protocol. A microplate luminometer (specify type and manufacturer)
164 was used to measure the intensity of the light emitted. ET-1 concentration in plasma
165 was expressed as pg/mL.

166
167 *Measurement of ACE in Plasma:*

168 ACE activity was determined with a commercial kit (ACE Infinity, Thermo-
169 Fisher, Middletown, VA) that uses furylacryloyl-L-phenylalanyl-glycyl-glycine
170 (FAPGG) as a substrate. This assay had been previously validated in the horse (Costa et
171 al., 2011b). Measurement of ACE activity was made according to the manufacturer's
172 instructions and results were expressed as U/L in plasma with linearity of the assay
173 between 1 and 120 U/L.

174
175 *Statistical analysis:*

176 Data distribution was checked for normality using the Shapiro-Wilk test. The
177 effects of treatment (bicarbonate), group (HPIE), time and various interaction terms
178 were assessed using analysis of variance for repeated measures (Statistica 10, Statsoft
179 Inc., OK). Post-hoc analysis was conducted when appropriate. Association between ET-
180 1 or ACE levels and HPIE severity (endoscopy score) were evaluated using Pearson
181 correlation coefficient.

182 Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significance level was placed at
183 $P \leq 0,05$.

186 **Results**

187 *Endoscopy*

188 Three horses had blood detected upon endoscopic examination following at least
189 one of the 3 SETs while the other 5 horses never had gross evidence of blood during all
190 3 SETs. Two of the horses with HPIE had small amount of blood in the trachea (grade 1
191 or 2) and they bled during only two of the three SETs. One horse bled during all three
192 runs and had maximum HPIE scores consistently grade 2 or 3. That particular horse
193 exhibited mild epistaxis from one nostril after 2nd SET. Post hoc analysis indicated that
194 HPIE score peaked on average 30 minutes after fatigue.

195 All of horses had mucus (grade 1 and above) detected in the trachea during at
196 least one time point after all 3 SETs. Peak mucus score occurred 60 minutes post-SET on
197 average.

198

199 *Endothelin concentration in plasma:*

200 Resting ET-1 concentration before training (0.92 ± 0.63 pg/mL) and after 8
201 weeks of training (0.67 ± 0.23 pg/mL) were not significantly different from each other.
202 Plasma ET-1 concentration 15 minutes post-fatigue (0.84 ± 0.49 pg/mL) was not
203 significantly different than pre-exercise values. Bicarbonate treatment did not have an
204 effect on ET-1 concentration. However, the change in ET-1 concentration as a result of
205 exercise was significantly different in HPIE horses compared to controls ($P = 0,012$).
206 We observed that ET-1 concentration increased 15 min post-SET in control horses ($P =$
207 $0,004$) but not in HPIE horses and as a result ET-1 concentration 15 min post-SET was
208 significantly higher in controls than HPIE horses ($P = 0,03$). There was a weak positive
209 correlation between HPIE score 30 min post-SET and ET-1 concentration prior to SET
210 ($r = 0.46$, $P = 0,034$) but not with ET-1 concentration 15 min post-SET.

ACE activity in plasma:

Pre-training (baseline value) mean ACE activity in plasma (46.4 ± 18.9 U/L) was not significantly different from post-training resting values (50.9 ± 10.2 U/L). ACE activity 15 min post-SET (69.8 ± 16.3 U/L) was significantly higher than pre-SET activity (53.8 ± 11.9 ; $P=0.0019$). Not significant effect of bicarbonate treatment or HPIE status on ACE activity was detected. There was a weak positive correlation between HPIE score 30 min post-SET and ACE activity prior to SET ($r = 0.54$, $P = 0.011$) but not with ACE activity 15 min post-SET.

Discussion

The main finding of this study was contrary to our hypothesis, ET-1 concentration did not increase post-exercise in horses with HPIE but increased in non-bleeders. Studies suggest that ET-1 concentrations are elevated in humans and rats with diseases, such as diabetes, renal failure, heart failure, COPD and pulmonary hypertension (Stewart, 1991). In horses, the majority of ET-1 research has been focused on respiratory diseases (Stewart et al. 1991; Benamou et al., 1999) including recurrent airway obstruction (Benamou et al., 1997; Benamou et al., 1999), summer pasture-associated recurrent airway obstruction (Costa et al., 2009) and HPIE (Padilha et al., 2006).

Some investigators have determined the concentration of ET-1 in blood and BALF in resting horses and after exercise in COPD horses and in healthy horses, in this study, Benamou et al. (1999) demonstrated release increased amounts concentration of ET-1 in COPD horses compared in healthy horses. Benamou et al. (1998) also shows that ET-1 is increased in plasma and BALF by intense exercise and in horses with recurrent airway obstruction. In both these situations, it is conceivable that pulmonary

hypertension may be involved. However our finding in control horses is consistent with McKeever et al (2002) that measured plasma ET-1 at rest and during exercise in healthy horses, surprisingly showed elevated plasma ET-1, post-exercise on the treadmill. These data suggest that ET-1 concentration changes occur through in intensity exercise on the treadmill and that the half-life of ET-1 is very short, only few minutes, because this ET-1 concentration returned to baseline by 10 minutes post-exercise. In This study ET-1 concentration still high about 15 minutes post-exercise in non-bleeders horses.

The apparent discrepancies between these studies and our findings in horses may result from the fact that the role of ET-1 in the equine lung has not been fully elucidated however, a number of studies indicate that ET-1 is a potent bronchoconstrictive as well as an important modulator of vascular tone (Stewart et al., 1991; Benamou et al., 1999; Benamou et al., 2001; Benamou et al., 2003). Study has shown an increase in endothelin levels in response to hypertension (Benamou et al., 2001), hypertension in the horses has been suggested as one of aetiology of HPIE (West and Mathieu-Costello, 1993). Padilla e al. (2006) do not support a deterministic role for ET-1 in the increased Ppa and therefore HPIE, during maximal exercise in the equine athlete. In this study, ET-1 concentrations in plasma have been determined at rest and after exercise in HPIE and healthy horses, these concentration could not be the same for horses with pathological abnormalities such as chronic obstructive airways. In order to elaborate on this possibility, it would have been interesting to assay ET-1 in bronchoalveolar lavage fluid.

Further studies including larger number of horses are warranted to better elucidate factors affecting ET-1 concentration in horses with HPIE.

In horses, ACE activity have been found to be associated with endometrial disease (Ganjam and Evans, 2006), gestational stage (Topouzis et al., 1992), laminitis

(Tillman and Moore, 1989). We hypothesized that ACE activity in equine blood would increase further in horses with HPIE due to the pulmonary injury however, we did not observe such a change. Prevalence of HPIE can be as high as 80% to 90% in Standardbred racehorses (Lapointe et al., 1994; Birks et al., 2003) and the predominant hypothesis is that very high pulmonary vascular pressure during intense exercise result in stress-failure of pulmonary capillaries (West and Mathieu-Costello, 1993). The increase in ACE activity detected 15 min post-SET is consistent with other reports (Costa 2011c) and likely associated with increased release of the enzyme by cleavage of the membrane bound ACE from vascular beds (Woods et al., 2004).

Costa et al. (2011b) reported mean ACE activity in equine plasma of 69.0 U/L measured spectrophotometrically with FAPGG substrate (ACEIn), it was close for ACE activity in this study with FAPGG substrate. The present study shows an increase in ACE plasma level 15 minutes after fatigue (69.8 ± 16.3 U/L) on the high speed treadmill obtained from equine plasma with ACEIn method. Costa et al. (2011b) demonstrated that there is poor agreement between different methods of analysis of equine ACE activity in plasma and then comparison between results for ACE activity obtained from different methods should not be attempted. Gorski and Campbell (1991) compared the changes in plasma ACE activity, measured by two different methods and showed a close agreement with changes in plasma ACE activity measured with FAPGG as substrate, but not with HHL as substrate.

Richard et al. (2009) measured in plasma ACE activity at rest, post treadmill and post racetrack using FAPGG as substrate, the concentrations observed were much higher than values previously published for young Thoroughbreds (Coomer et al., 2003). This

may be explained by the use of different assays for measuring ACE concentration as well as differences race and age between the two study.

An interesting finding was the positive correlation between pulmonary bleeding severity as assessed by HPIE score and ET-1 and ACE levels pre-exercise. Horses with HPIE exhibit pulmonary hemorrhage each time they exercise strenuously and the ensuing lung injury is characterized by bronchiolitis, increased tissue hemosiderophages and bronchial neovascularization (O’Callaghan et al. (1987). Chronic lung damage may be responsible for elevated basal ET-1 or ACE levels as seen in human patients with a variety of pulmonary disorders (Uçar et al., 1997; Comellas and Briva 2009).

This preliminary finding would require validation in a larger group of horses with a variety of pulmonary pathology to determine is particular phenotypes are associated with changes in circulating ET-1 or ACE.

Conclusions

The present investigation provides support for the notion that ET-1 and ACE might be not used as specific biomarkers for pulmonary injury such HPIE in race horses.

Acknowledgments

This research project was conducted at the School of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, Indiana, and supported by Funding Horses Racing Commission, Purdue University and CAPES.

311 The authors thank Anisa D. Dunham for her valuable assistance performing the ET-1
312 and ACE assays, Katie Smith, Donna Griffey, Casey Cromer, Lexi Mechem for their
313 assistance in caring for the animals.

References

- Benamou, A. E., Art, T., Lekeux, P., 1997. Plasma Endothelin levels during intense exercise in the healthy horse. In: Proceeding of 15th Veterinary Respiratory Symposium pp. 3/1.
- Benamou, A. E., Art, T., Marlin, D. J., Roberts, C. A., Lekeux, P., 1998. Variations in systemic and pulmonary endothelin-1 in horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 11, 231-235.
- Benamou, A. E., Art, T., Marlin, D. J., Roberts, C. A., Lekeux, P., 1999. Effect of exercise on concentration of immunoreactive endothelin in bronchoalveolar lavage fluid of normal horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Exercise Physiology* 30, 92-95.
- Benamou, A. E., Art, T., Marlin, D. J., Lekeux, P., 2001. Equine pulmonary and systemic haemodynamic responses to endothelin-1 and selective ET(A) receptor antagonist. *Equine Veterinary Journal* 33, 337-344.
- Costa, M. F., Davies, H. M., Anderson, G.A., Slocombe, R.F., 2011a. Effects of two training protocols on Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity in horses. *Equine Veterinary Journal* 43, 466-470.
- Costa, M. F., Carmona, A. K., Alves, M. F. M., Rynan, T. M., Davies, H. M., Anderson, G. A., Slocombe, R. F., 2011b. Determination of angiotensin I-converting enzyme activity in equine blood: lack of agreement between methods of analysis. *Journal Veterinary Science* 12, 21-25.
- Costa, M. F. M., Anderson, G. A., Davies, H. M., Slocombe, R. F., 2011c. Effects of acute exercise on angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity in horses. *Equine Veterinary Journal* 5. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00461.x.
- Couetil, L. L., Hinchcliff, K. W., 2004. Non-infectious diseases of the lower respiratory tract. In: *Equine Sports Medicine and Surgery*, 1th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA, pp. 633-644.
- Erickson, H. H., 2000. A review of exercise-induced pulmonary hemorrhage and new concepts for prevention. In: *Proceedings of the Ann Conv Am Assoc Equine Pract.*, San Antonio, Texas, pp. 193-196.
- Ganjam, V. K., Evans, T. J., 2006. Equine endometrial fibrosis correlates with 11-hsd2, TGF-1 and ACE activities. *Molecular and cellular. Endocrinology* 248, 104-108.
- Gorski, T. P., Campbell, D. J., 1991. Angiotensin-converting enzyme determination in plasma during therapy with converting enzyme inhibitor: two methods compared. *Clinical chemistry* 37, 1390-1393.

- 363 Hinchcliff, K. W., Jackson, M. a., Brown, J. A., Dredge, A. F., O'Callaghan, P. A.,
364 McCaffrey, J. P., Morley, P. S., Slocombe, R. E., Clarke, A. F., 2005a.
365 Tracheobronchoscopic assessment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in
366 horses. *American Journal of Veterinary Reseseach* 66, 596-598.
367
- 368 Hinchcliff, K. W., Jackson, M. A., Morley, P. S., Brown, J. A., Dredge, A. E., O'
369 Callaghan, P. A., McCaffrey, J. P., Slocombe, R.E., Clarke, A. E., 2005b.
370 Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage and performance in
371 Thoroughbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical*
372 *Association* 5, 768-774.
373
- 374 Kindig, C. A., McDonough, P., Fenton, G., Poole, D. C., Erickson, H. H., 2001.
375 Efficacy of nasal strip and furosemide in mitigating HPIE in Thoroughbred
376 horses. *Journal of Applied Physiology* 91, 1396-1400.
377
- 378 Lapointe, J. M., Vrins, A., McCarvill, E., 1994. A survey of exercise-induced
379 pulmonary haemorrhage in Quebec standardbred racehorses. *Equine Veterinary*
380 *Journal* 26, 482-485.
381
- 382 McKeever, K. H., Antas, L. A., Kearns, C. F., 2002. Endothelin Response during and
383 after exercise in horses. *The Veterinary Journal* 164, 38 – 46.
384
- 385 Menzies-Gow, N. J., Bailey, S. R., Stevens, K., Katz, L., Elliott, J., Marr, C. M., 2005.
386 Digital blood flow and plasma endothelin concentration in clinically endotoxemic
387 horses. *American Journal of Veterinary Research* 66, 630-636.
388
- 389 O'Callaghan, M. W., Pascoe, J. R., Tyler, W. S., Mason, D. K., 1987. Exercise-induced
390 pulmonary haemorrhage in the horse: results of a detailed clinical, post-mortem
391 and imaging study. VII. Conclusions and implications. *Equine Veterinary Journal*
392 19, 428-434.
393
- 394 Orfanos, S. E., Langleben, D., Khoury, J., Schlesinger, R. D., Dragatakis, L., Roussos,
395 C., Ryan, J. W., Catravas, J. D., 1999. Pulmonary capillary endothelium-bound
396 angiotensin-converting enzyme activity in humans. *Circulation* 99, 1593-1599.
397
- 398 Orfanos, S. E., Armaganidis, A., Glynos, C., Psevdi, E., Kaltsas, P., Sarafidou, P.,
399 Catravas, J. D., Dafni, U. G., Langleben, D., Roussos, C., 2000. Pulmonary
400 capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in acute lung
401 injury. *Circulation* 102, 2011-2018.
402
- 403 Padilla, D. J., Epp, T. S., McDonough, P., Marlin, D. J., Erickson, H. H., Poole, D. C.,
404 2006. Effects of a specific endothelin-1A antagonist on exercise-induced
405 pulmonary haemorrhage (HPIE) in thoroughbred horses. *Equine Veterinary*
406 *Journal Supplement* 36, 198-203.
407
- 408 Richard, E. A., Fortier, G. D., Pitel, P. H., Dupuis, M.C., Valette, J. P., Art, T., Denoix,
409 J. M., Lekeux, P. M., Erck, E. V., 2010. Sub-clinical diseases affecting
410 performance in Standardbred trotters: diagnostic methods and predictive
411 parameters. *Veterinary Journal* 184, 282-289.
412

- 413 Smith, J. D., 1992. Exercise induced pulmonary haemorrhage findings, part 1. *Equine*
 414 *Pract.* 14, 19-25.
 415
- 416 Stewart, D. J. , 1991. Endothelin in human disease II: shock, pulmonary hypertension,
 417 and congestive heart failure. In: *Endothelin*. Eds. Oxford University Press, New
 418 York, USA, pp 221-237.
 419
- 420 Tillman, L., Moore, J., 1989. Serum angiotensin converting enzyme activity and
 421 response to angiotensin I in horses. *Equine Veterinary Journal Suppl.* 7, 80-83.
 422
- 423 Topouzis, S., Catravas, J. D., Ryan, J. W., Rosenquist, T. H., 1992. Influence of
 424 vascular smooth muscle heterogeneity on angiotensin converting enzyme activity
 425 in chicken embryonic aorta and in endothelial cells in culture. *Circulation*
 426 *Research* 71, 923-931.
 427
- 428 Uçar, G., Yildirim, Z., Ataol, E., Erdogan, Y., Biber, C., 1997. Serum angiotensin
 429 converting enzyme activity in pulmonary diseases: correlation with lung function
 430 parameters. *Life Sciences* 61, 1075-1082.
 431
- 432 West, J.B., Mathieu-Costello, O., Jones, J.H., Birks, E.K., Logemann, R.B., Pascoe,
 433 J.R., Tyler, W.S., 1993. Stress failure of pulmonary capillaries in racehorses with
 434 exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Journal of Applied Physiology* 75,
 435 1097-1109.
 436
- 437 Woods, D., sanders, J., Jones, A., Hawe, E., Gohlke, P., Humphries, S. E., Payne, J.,
 438 Montgomery, H., 2004. The Serum angiotensin converting enzyme angiotensin II
 439 response to altered posture and acute exercise, and the influence of ACE
 440 genotype. *European Journal of Applied Physiology* 91, 342- 348.

APÊNDICE

Quadro 1: Protocolo de treinamento padrão usado para o condicionamento físico dos cavalos de trote, West Lafayette/IN – 2011.

	Dia de treinamento	Duração (min.)	Tipo de exercício	Velocidade (m/s)	Inclinação (%)	Alimentação Omole 200 + Alfafa
1ª Semana	2ª - 3ª - feira	4	Walk	2	0	1
FC (2-feira)		15	Jog	5	3	
	4ª - 6ª - feira	4	Walk	2	0	2
		20	Jog	5	3	
	Sábado - domingo	Off	Paddock			1
2ª Semana	2ª - 3ª - feira	4	Walk	2	0	2,5
FC (2-feira)		20	Jog	5	3	
Lactato	4ª - 6ª - feira	4	Walk	2	0	2
		25	Jog	5	3	
	Sábado - domingo	Off	Paddock			2
3ª Semana	2ª - 5ª - feira	4	Walk	2	0	3,5
		30	Jog	5	3	
FC - 2ª/sexta-feira	sexta-feira	4	Walk	2	0	4
		4	Jog	5	5	
		2	Fast trot	9	5	
		2	Fast Jog	10	5	
	Sábado - domingo	Off	Paddock			2
4ª Semana	2ª - 6ª - feira	4	Walk	2	0	4
FC - 2ª-feira		30	Jog	5	3	
	4ª - feira	Off	Off			
	3ª - feira	4	Walk	2	0	4
		3	Jog	9	3	
		2	Fast trot	9	3	
		3	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	3	
Lactato	5ª - feira	4	Walk	2		
		15	Jog	5	3	
		1	Trot	8	3	
		1	Fast trot	10	3	
	Sábado - domingo	Off	Paddock			2
5ª Semana	2ª e 4ª -feira	4	Walk	2	0	5
		30	Jog	5	3	
	3ª, 5ª, 6ª - feira	4	walk	2	0	5
		4	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	5	
		3	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	5	
		3	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	5	
	Sábado - domingo	Off	Paddock			2
6ª Semana	2ª e 4ª -feira	4	Walk	2	0	6
		30	Jog	5	3	
FC quinta-feira	3ª, 5ª - feira	4	walk	2	0	6
		4	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	5	
		3	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	5	6
		3	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	5	
Lactato	6ª - feira	4	walk	2	0	6
		4	Jog	5	3	
		2	Fast trot	9	5	
		1	Fast trot	10	5	
		1	Fast trot	11	5	
		1	Fast trot	12	5	
	Sábado - domingo	Off	Paddock			2

Off= descanso; Paddock= 2 horas solto a pasto; Walk= caminhada; Jog:trote lento; fast trot:trote rápido.

Tabela 9: Médias e desvios-padrão da contagem de hemácias no LBA antes do condicionamento físico e depois da 13ª semana onde os cavalos realizaram o teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, comparando-se os 8 animais independentemente de apresentarem HPIE, West Lafayette/IN – 2011.

Animais	<i>Hemácias (M0)</i> <i>Cel/mL</i>	<i>Hemácias-Depois 13ª semana</i> <i>Cel/mL</i>
1	449.375	555.000
2	94.375	197.500
3	81.563	125.313
4	89.375	175.313
5	65.938	169.063
6	103.125	564.688
7	182.812	13.368.750
8	115.938	231.875
$\bar{x}$	147.812,62	1.923.437,75
s	126.796,12	4.627.885,42

Não houve diferença entre contagem de hemácias antes ou após teste de esforço máximo em esteira (p=0,521).

Tabela 10: Médias e desvios-padrão da concentração de hemoglobina antes do condicionamento físico e depois da 13ª semana onde os cavalos realizaram o teste de esforço máximo em esteira de alta velocidade, comparando-se os 8 animais independentemente de apresentarem HPIE.

Animais	<i>[Hb]- (M0)</i> <i>nº/µL</i>	<i>[Hb]-Depois da 13ª semana</i> <i>nº/µL</i>
1	0,04712	0,04590
2	0,00810	0,00770
3	0,00721	0,00530
4	0,00795	0,00865
5	0,00283	0,00680
6	0,00775	0,01620
7	0,01080	0,63693
8	0,00502	0,00920
$\bar{x}$	0,01209	0,09208
s	0,01341	0,20630

Não diferença nos valores antes ou após teste de esforço máximo em esteira (p=0,420).