

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CONCENTRAÇÃO DE AMILOIDE A SÉRICA EM CAVALOS
PURO SANGUE INGLÊS PORTADORES DE HEMORRAGIA
PULMONAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO**

Ana Maria Guerreiro Braga da Silva

Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CONCENTRAÇÃO DE AMILOIDE A SÉRICA EM CAVALOS
PURO SANGUE INGLÊS PORTADORES DE HEMORRAGIA
PULMONAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO**

Ana Maria Guerreiro Braga da Silva

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutora em Cirurgia Veterinária

2016

S586c Silva, Ana Maria Guerreiro Braga da
Concentração de amiloide a sérica em cavalos puro
sangue inglês portadores de hemorragia pulmonar
induzida por exercício / Ana Maria Guerreiro Braga da
Silva. -- Jaboticabal, 2016
50 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal
Orientador: Aureo Evangelista Santana

1. reação de fase aguda. 2. equino. 3. exercício. I.

Título

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

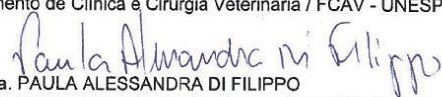
TÍTULO: CONCENTRAÇÃO DE AMILOIDE A SÉRICA EM CAVALOS PURO SANGUE INGLÊS PORTADORES DE HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO

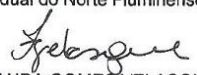
AUTORA: ANA MARIA GUERREIRO BRAGA DA SILVA

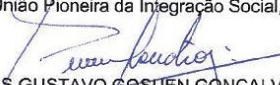
ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP


Profa. Dra. PAULA ALESSANDRA DI FILIPPO
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro / Campos dos Goytacazes/RJ


Profa. Dra. FERNANDA GOMES VELASQUE GAMA
Faculdade União Pioneira da Integração Social, Brasília/DF


Prof. Dr. LUIS GUSTAVO GOSSUEN GONÇALVES DIAS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 26 de setembro de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA MARIA GUERREIRO BRAGA DA SILVA – Nascida na cidade do Rio de Janeiro, em dezesseis de outubro de mil novecentos e oitenta e dois, filha de Maria Edéa Guerreiro Giovanini Silva e Leônidas Solon Braga da Silva. Médica veterinária, formada pela Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em julho de 2007. Em fevereiro de 2008, ingressou no curso de Pós-Graduação da Universidade de Brasília, na modalidade Especialização em Medicina Veterinária, sob orientação da Profa. Dra. Roberta Ferro de Godoy, e, em janeiro de 2010, obteve o título de especialista em Clínica e Cirurgia de Grandes Animais. Em julho de 2012, sob orientação do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto foi bolsista da FAPESP (Processo número 2010/14373-5) e conquistou o título de Mestre em Cirurgia Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal. Em seguida, em agosto de 2012, após concurso de seleção, ingressou no curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana. Em março de 2015, foi aprovada em primeiro lugar no concurso público para docente de Cirurgia em Grandes Animais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), onde iniciou suas atividades em dezembro do mesmo ano. No momento, é docente do quadro permanente da UFRB, onde leciona as disciplinas de Cirurgia de Grandes Animais e Técnica Cirúrgica Animal para discentes do curso de graduação em Medicina Veterinária; realiza atendimento clínico-cirúrgico no setor de Grandes Animais do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV) da UFRB; é líder do CABALLUS, grupo interdisciplinar de estudos dos equídeos; é a representante titular do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas no Conselho dos Direitos das Pessoas com Deficiência da UFRB (CONDIP/UFRB); é membro do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRB; e em agosto de 2016 foi agraciada com a concessão de uma bolsa de iniciação científica financiada pela FAPESB.

EPÍGRAFE

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família: minha mãe, Maria Edéa Guerreiro Giovanini Silva, meu pai, Leônidas Solon Braga da Silva, ao meu irmão, Thomáz Marciano Guerreiro Braga da Silva e sua esposa Joselaine Murta Batista Guerreiro. Sem o apoio deles não chegaria onde estou.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, por ter-me aceitado como sua orientanda nesta empreitada. Jamais esquecerei suas palavras quando entrei em sua sala a pedir-lhe orientação. Disse-me que estava apenas preocupado em abrir portas, e, se por ventura algumas se fechassem posteriormente, ele seguiria abrindo mais portas. Emociono-me até hoje ao lembrar-me daquele dia. Sou-lhe imensamente agradecida pela oportunidade que me deu para trabalhar junto a seu Laboratório. E agradeço-lhe principalmente pela amizade dedicada, pelos ensinamentos e, sobretudo, pela paciência. Deus me presenteou, quando colocou em meu caminho uma pessoa tão querida e tão preocupada com o próximo. Admiro sua pessoa, admiro seu trabalho no qual me espelho diariamente, admiro, enfim, sua seriedade, integridade, ética. Obrigada, Professor, muito obrigada por tudo. O senhor tornou-se um anjo em minha vida!

À minha Mammy, por tudo! Você é a pessoa mais batalhadora e amiga que conheço. O carinho, o amor, a paciência, a atenção e, principalmente, o incentivo que a cada dia me ofereceu, impulsionou-me a sempre olhar para frente e a lutar pelo melhor. Agradeço a Deus por ser sua filha. Mammy, eu amo você!

Ao meu pai, pela paciência, amor, carinho, atenção, paparicos e incentivos durante a vida inteira. É muito confortante ouvir você dizer: “Calma minha filha, vai ficar tudo bem!” Pai, eu amo você!

Ao meu irmão, minha “praguinha” do coração! “Praguinha”, muito obrigada por todo apoio e, principalmente, pelas consultorias tecnológicas. Penso no que seria de mim sem esse irmão superinteligente, que conhece tudo de informática. Eu o amo muito, muito mesmo!

À minha família, pelo amor e apoio incondicional. E, especialmente, obrigada por entender minhas ausências em virtude da distância e dos compromissos assumidos. Muitíssimo obrigada.

À amiga e Profa. Dra. Nilce Pereira Rangel Del Rio, pela amizade, pelo carinho, pela atenção e pela palavra amiga quando muito precisei em 2014. Você sabe o quanto suas palavras acalmaram meu coração, em um momento muito delicado de minha vida. Muito obrigada pelos ensinamentos e, principalmente, pela revisão deste trabalho.

À amiga Dra. Tanja Maria Hess, pelo apoio incondicional. Sempre me incentivou muito, ofereceu-me oportunidade de participar de diversos experimentos, além de abrir-me inúmeras portas durante essa trajetória acadêmica. Agradeço-lhe tudo que fez e continua fazendo por mim e por todo conhecimento que me ofereceu. Tanja, muito obrigada por tudo, mormente pela paciência! Tenho uma enorme admiração por você.

À Dra. Maria Fernanda de Mello Costa, por todo conhecimento compartilhado, pelo incentivo e pela colaboração estabelecida para que este projeto pudesse ser realizado. Muito obrigada, de coração!

Ao Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal – e a toda equipe do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, pelo apoio e ensinamentos que me dispensaram. Muito obrigada!

Às queridas amigas Andressa Nogueira, Cínthia Lhamas, Claire O’Hara, Helena Brito, Kalina Simplício, Letícia Anaí, Luisa Gouvêa, Maristela Lopes e Sílvia Napoleão, por todo apoio, pelas conversas, conselhos, carinho e, sobretudo, pelos ensinamentos durante minha estada em Jaboticabal. Obrigada pela amizade. Muito obrigada, amores!

Aos amigos do Rio de Janeiro, em especial Ana Júlia Mendes, Aretha Campos e Rossana Ribeiro, por todo amor, amizade e pela força que me proporcionaram para continuar seguindo sempre em frente: certamente o apoio de vocês, mesmo a distância, fez toda diferença. Muito obrigada!

Aos colegas de trabalho da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por me acolherem tão bem. Em especial, às amigas Cristiane Aguiar, Flavia Santin, Natalie

Borges, Vanessa Bastos e Veridiana da Silveira: pelo apoio e conselhos neste período final do doutorado. Muito obrigada!

Às amigas de Cruz das Almas, Lorena Ugarte, Élen Almeida, Cristianne Freirias, Jeessy HP e, em especial, a Mariana Sampaio. Mari seu apoio, atenção e auxílio com a documentação referente ao curso de doutorado foram fundamentais. Serei eternamente grata a você! Muito obrigada de coração!

E, por último, mas não menos importante, agradeço aos meus cachorros, Bruno e Tutu, adotados em Jaboticabal, e Joy, adotada em Cruz das Almas, pelo companheirismo e por serem tão carinhosos. Sou muito feliz por tê-los comigo e tenho a certeza de que também fui adotada por cada um deles.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Hemorragia pulmonar induzida por exercício	2
2.2. Proteínas de fase aguda	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Método de inclusão de animais no estudo	10
3.2. Animais e grupos	10
3.3. Endoscopia	11
3.4. Colheita das amostras de sangue	13
3.5. Amiloide A sérica	13
3.6. Análise estatística	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS	26
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

O presente experimento foi realizado em regime de colaboração/cooperação com o WAIKATO INSTITUTE OF TECHNOLOGY e fez parte de um projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de marcadores biológicos como auxílio diagnóstico de HPIE”, sob orientação da Doutora Maria Fernanda de Mello Costa, com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do WAIKATO INSTITUTE OF TECHNOLOGY (WINTEREC) – “The Animal Ethics Committee at Wintec” sob o número de aprovação 93/2012.

O Departamento Veterinário de Corrida (DVC) e a Comissão de Corrida (CC) do Jockey Club Brasileiro aprovaram e autorizaram a realização do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de marcadores biológicos como auxílio diagnóstico de HPIE” o qual foi desenvolvido no período compreendido entre os dias 01/12/2012 a 01/02/2013.

CONCENTRAÇÃO DE AMILOIDE A SÉRICA EM CAVALOS PURO SANGUE INGLÊS PORTADORES DE HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO

RESUMO – A hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) caracteriza-se pela ruptura de capilares pulmonares e extravasamento de sangue nas vias aéreas. Uma das formas mais utilizadas para diagnóstico é visibilização de sangue na traqueia por meio de exame endoscópico das vias aéreas. A HPIE ocasiona inflamação no sistema respiratório e a resposta de fase aguda leva à síntese de proteínas de fase aguda, como a amiloide A sérica (AAS). Diante disso, objetivou-se com a realização deste estudo avaliar se a HPIE causa aumento da AAS em equinos após corrida. Exame endoscópico das vias aéreas e amostras de sangue foram colhidas de equinos da raça Puro-sangue inglês (PSI), após corrida no Jockey Club Brasileiro, na Gávea, Rio de Janeiro. As amostras de soro foram utilizadas para efetuar análises de AAS, por meio de ensaio imunoenzimático pela técnica de ELISA indireto (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando *kit* comercial. Os dados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância e verificou-se diferenças ($p \leq 0,05$) em relação à variável presença ou ausência de HPIE e a concentração de AAS. Setenta e um equinos, sendo 43 machos e 28 fêmeas, da raça PSI, foram distribuídos em dois grupos: o primeiro grupo, grupo controle (GC) com 28 animais (39%); o segundo, grupo hemorragia pulmonar induzida por exercício (GH), com 43 animais (61%). Houve diferença entre os grupos ($p < 0,0001$) em relação à presença e à ausência de HPIE. A concentração de AAS no sangue dos animais dos grupos GC e GH não apresentou diferença ($p = 0,292$), sendo os valores médios e o erro padrão da média ($\bar{X} \pm \text{EPM}$) correspondente a $4,9 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$ e $7,5 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. O grupo GH foi subdividido em relação aos equinos que apresentaram (HPIE^+) ou não (HPIE^-) sangue nas vias aéreas craniais durante o exame endoscópico e/ou foram tratados (F^+) ou não com furosemida (F^-) até quatro horas antes da corrida na dose de 1 mg/Kg por via intravascular. Dentre os equinos do grupo GH houve aumento da concentração de AAS ($p = 0,020$) nos animais não medicados com furosemida quando comparados com os que foram medicados antes da corrida. Ademais, os animais do grupo que apresentou HPIE durante o exame endoscópico que não foram tratados com furosemida antes da corrida apresentaram aumento acentuado na concentração de proteína AAS ($p = 0,062$) em comparação com os equinos que apresentaram HPIE e foram medicados. Sendo assim, conclui-se que mais de 50% dos equinos PSI de corrida avaliados são acometidos pela HPIE e equinos portadores de HPIE^+ medicados com furosemida antes da corrida apresentam diminuição significativa da concentração de amiloide A sérica.

Palavras-chave: reação de fase aguda, equino, exercício

SERUM AMILOYD A CONCENTRATION OF THOROUGHBRED RACEHORSES WITH EXERCISE-INDUCED PULMONARY HEMORRHAGE

ABSTRACT – Exercise-induced pulmonar hemorrhage (EIPH) is characterized as the rupture of pulmonary capillaries and blood loss within the respiratory tract. One of the most important diagnostic means is the presence of fresh blood at the trachea during endoscopic examination of the respiratory tract. EIPH causes inflammation of the respiratory system and may cause an acute phase response leading to synthesis of acute phase proteins such as serum amiloyd A (SAA). Therefore the aim of this study was to evaluate if EIPH causes increase in SAA of horses after race. Endoscopic exam and blood samples were collected from Thoroughbred racehorses after a race at the Jockey Club Brasileiro, at Gávea, Rio de Janeiro. Serum samples were used to perform SAA analyses by immunosorbent assay with indirect ELISA technique (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), using a commercial kit. The collected data was evaluated by ANOVA ($p \leq 0.05$) for presence or absence of EIPH and to evaluate SAA data. Seventy one Thoroughbred race horses, 43 males and 28 females, were used in this study and were divided into two groups. The control group (GC) was enlisted with 28 horses (39%) and the EIPH positive (GH) with 43 horses (61%). There was a significant difference in between both groups ($p < 0.0001$) related to EIPH positive and negative horses. There was no difference on the SAA values between groups GC e GH ($p = 0.292$), and the mean values and mean standard error ($\bar{X} \pm \text{MSE}$) were $4.9 \pm 3.1 \mu\text{g/mL}$ e $7.5 \pm 3.0 \mu\text{g/mL}$, respectively. The horses who received furosemide before the race in the HPIE⁺ group had significant lower SAA concentration ($p = 0,020$) when compared to animals that did not receive that medication. Therefore, more than 50% of the Thoroughbred racehorses evaluated were diagnosed with EIPH and all the horses with HPIE⁺ medicated with furosemide before the race presented significant lower SAA concentration.

Keywords: acute phase reaction, equine, exercise

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = graus Celsius

ANOVA = “analysis of variance”

AAS = amiloide A sérica

CC = Comissão de Corrida

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

DVC = Departamento Veterinário de Corrida

ELISA = “enzyme-linked immunosorbent assay”

EPM = erro padrão da média

FCR = força centrífuga relativa

FCAV = Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

Fib = fibrinogênio

g = gauge

h = hora

Hp = haptoglobina

HPIE = hemorragia pulmonar induzida por exercício

JCB = Jockey Club Brasileiro

Km = quilômetro

Km/h = quilômetro por hora

LACVET-JCB = Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias do Jockey Club Brasileiro

mL = mililitro

µg = micrograma

n = número

nm = nanômetro

PFA = proteínas de fase aguda

PSI = Puro-sangue inglês

RFA = resposta de fase aguda

SAA = “serum amiloyd A”

SAS = “Statistical Analysis System”

TMB = tetrametilbenzidina

UFF = Universidade Federal Fluminense

UFRJ = Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNESP = Universidade Estadual Paulista

WINTEC = “Waikato Institute of Technology”

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Tabela adaptada a partir dos critérios para avaliação do grau de hemorragia pulmonar induzida por exercício, estabelecidos por Costa <i>et al.</i> (2004). Jaboticabal, 2016.....	05
Tabela 2. Número total de equinos utilizados no projeto, subdivididos quanto ao gênero e a presença ou não de hemorragia pulmonar induzida por exercício. Jaboticabal, 2016.	18
Tabela 3. Número total de equinos, valores da média e erro padrão da média das concentrações de amiloide A sérica do grupo hemorragia pulmonar induzida por exercício positivo incluídos no ensaio, subdivididos quanto ao grau de hemorragia pulmonar induzida por exercício. Jaboticabal, 2016.	19
Tabela 4. Valores médios e erro padrão da média das concentrações de amiloide A sérica de equinos com e sem hemorragia pulmonar induzida por exercício, subdivididos quanto à administração ou não de furosemida. Jaboticabal, 2016.....	19

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imagem fotográfica de exame endoscópico das vias aéreas de equino Puro-sangue inglês, na sala de endoscopia do Departamento Veterinário de Corrida nas dependências do Jockey Club Brasileiro. Jaboticabal, 2016.....	12
Figura 2. Preparação dos volumes apropriados das soluções de tampão de lavagem (líquido rosa à esquerda) e tampão de diluição (líquido azul à direita) para utilização durante o ensaio imunoenzimático. Jaboticabal, 2016.....	14
Figura 3. A – Embalagem da placa de <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> . B – Placa de <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> utilizada para o ensaio imunoenzimático. Jaboticabal, 2016.....	15
Figura 4. A – Adição de solução para encerrar a reação na placa de <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> . B – Acomodação da placa de <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> em aparelho automatizado para aferir a absorbância do ensaio imunoenzimático. Jaboticabal, 2016.....	16
Figura 5. Distribuição dos diferentes graus de hemorragia pulmonar induzida por exercício de cavalos Puro-sangue inglês, avaliados por meio de exame endoscópico no Jockey Club Brasileiro. Jaboticabal, 2016.....	20

1. INTRODUÇÃO

A anatomia e a fisiologia dos equinos permite-lhes cumprir seu papel de presa na natureza, tornando-os atletas por excelência. Sabe-se que os equinos da raça Puro-sangue inglês são capazes de atingir a velocidade de 64 Km/h, caracterizando-os como atletas de alto rendimento e exigindo o máximo de sua capacidade atlética. Durante o exercício, para manter o equilíbrio do organismo, todos os sistemas orgânicos devem operar em conjunto. No entanto, após a seleção genética, as adaptações ao exercício adquirida pelo indivíduo para preservar a harmonia do sistema orgânico levou ao surgimento de problemas associados aos cavalos atletas, como a hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, também conhecida por HPIE.

A HPIE caracteriza-se pela ruptura dos capilares pulmonares e, consequentemente, o extravasamento de sangue para o lúmen dos alvéolos pulmonares após o exercício e pode afetar até 90% dos cavalos de corrida. Tal acontecimento, a depender da severidade, estabelece diferentes graus de inflamação no sistema respiratório que pode diminuir o desempenho atlético do animal e diminuir os ganhos monetários do equino ao longo de sua carreira.

Toda e qualquer inflamação inicia-se por resposta de fase aguda e desencadeia a síntese de proteínas de fase aguda, como a amiloide A sérica (AAS). A AAS é uma das proteínas mais estudadas na medicina de equinos em virtude do seu potencial como biomarcador de inflamação, pois mediante a resposta de fase aguda sua concentração pode aumentar em proporções de até 1000 vezes em relação aos valores de normalidade para a espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hemorragia pulmonar induzida por exercício

Durante o exercício, os pulmões são considerados órgãos essenciais para o bom desempenho dos equinos, pois não sofrem hipertrofia ou hiperplasia após o animal chegar à idade adulta, e tampouco, com a realização de treinamentos (HINCHCLIFF; GEOR, 2008). Em virtude dessa condição, toda e qualquer desordem que afete a função das vias aéreas em realizar adequadamente a captação, as trocas gasosas, o transporte e a difusão tecidual do oxigênio é passível de comprometer o desempenho atlético (WEST, 2000). Aliás, várias doenças do sistema respiratório de equinos podem reduzir-lhes o desempenho, como, por exemplo, a hemiplegia laríngea, o deslocamento dorsal de palato mole e a hemorragia pulmonar induzida por exercício (VAN ERCK-WESTERGREN; FRANKLIN; BAYLY, 2013).

Dentre as afecções do sistema respiratório que acometem os equinos, a hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) destaca-se dentre aquelas que estão incluídas na esfera das corridas, pela possibilidade de acometer de 40% a 90% desses animais (PASCOE et al., 1981; HINCHCLIFF et al., 2015). Caracterizada pela presença de sangue nas vias aéreas, após a realização de exercícios, o diagnóstico da HPIE se dá, geralmente, por meio de exame endoscópico, presença de epistaxe e/ou aparecimento de eritrócitos no lavado broncoalveolar (HINCHCLIFF et al., 2015). Outras espécies e outras raças também apresentam tal desordem, porém, na maioria das vezes, ela ocorre mais frequentemente em cavalos da raça Puro-sangue inglês, em virtude do tipo de exercício intenso e da velocidade a que esses animais são submetidos (HINCHCLIFF; GEOR, 2008; HINCHCLIFF et al., 2015).

Diversos estudos sobre HPIE foram realizados visando estabelecer suas causas, bem como elucidar a fisiopatogenia de sua ocorrência. A esse respeito, os principais mecanismos citados são: diferenças nas pressões alveolares, hipertensão pulmonar,

relação mecânica e sincrônica entre a respiração e a locomoção do equino durante o exercício, obstruções diversas do trato respiratório cranial (superior) e aumento na viscosidade sanguínea no decorrer do exercício em virtude da contração esplênica, disponibilizando cerca de 1/3 do total de hemácias na circulação sanguínea central (HINCHCLIFF et al., 2015).

Acredita-se que todos esses fatores somados contribuem para a hipertensão arterial, venosa e capilar pulmonar, além do aumento excessivo da força transmural do endotélio pulmonar durante exercício de alta intensidade, de modo a ocasionar o rompimento das membranas dos capilares alveolares (WEST et al., 1993; MANOHAR; GOETZ, 1996). A diferença entre as pressões do lúmen capilar e do lúmen alveolar determinam a pressão ou força transmural. Durante o exercício, a pressão da artéria pulmonar só tende a aumentar, elevando, muitas vezes, abruptamente a pressão dos capilares alveolares, enquanto a pressão pleural, que já é naturalmente negativa, torna-se cada vez mais negativa em virtude da sincronia que ocorre da inspiração com a passada do galope dos equinos, de modo a elevar excessivamente a pressão transmural e determinando o rompimento da barreira hemato-gasosa (WEST et al., 1993; WEST, 2000; MICHELOTTO JR et al., 2011; SULLIVAN; HINCHCLIFF, 2015; BOVE, 2016). O rompimento desta barreira determinando a hemorragia pulmonar ficou conhecido como falência funcional dos capilares pulmonares em virtude do estresse excessivo (WEST et al., 1993).

Ainda dentro deste contexto, WEST (2000) demonstrou que tal somatório de eventos, quando não há rompimento da barreira hemato-gasosa, resulta em aumento da pressão hidrostática com consequente extravasamento de líquido para o interstício ocasionando edema pulmonar em exercícios extremos. Caso haja a ruptura do endotélio capilar pulmonar, haverá extravasamento de sangue para o trato respiratório e resposta inflamatória local. Como resultado dessa inflamação advirá a formação de tecido conjuntivo fibroso, o qual interferirá diretamente na função tecidual local (GEOR, 2001; SULLIVAN; HINCHCLIFF, 2015). Na transição entre a área normal e a área afetada, toda vez que o animal for submetido ao exercício de alta intensidade, haverá

elevada possibilidade dessa região sofrer nova injúria e perpetuar o quadro anterior, elevando ainda mais a queda do desempenho do animal (HINCHCLIFF et al., 2015).

A HPIE se revela como afecção de grande importância clínica e econômica, pois as lesões no parênquima pulmonar impõe diminuição da capacidade de difusão de oxigênio, e consequente diminuição da capacidade aeróbia máxima, resultando em menor desempenho atlético do animal (VAN ERCK-WESTERGREN; FRANKLIN; BAYLY, 2013). Desse modo, boa parte das afecções que possam intervir na captação, transporte e difusão do oxigênio resultará na diminuição no desempenho nas atividades predominantemente aeróbias de qualquer espécie animal (HINCHCLIFF; GEOR, 2008).

Os sinais clínicos associados à HPIE incluem diminuição do desempenho nas corridas, presença de tosse, aumento no número de deglutições e, inclusive, epistaxe (VAN ERCK-WESTERGREN; FRANKLIN; BAYLY, 2013). Quando não ocorre epistaxe, a maneira mais segura de se diagnosticar a HPIE é buscar o auxílio de exame endoscópico das vias aéreas superiores, até 90 minutos após o exercício, a fim de detectar a presença de sangue no trato respiratório, ou, então, realizar o lavado broncoalveolar, com vistas a detectar a presença de eritrócitos e hemossiderófagos (COSTA et al., 2004; HINCHCLIFF et al., 2015).

Considera-se o exame endoscópico das vias aéreas de equinos, após exercício, o método-ouro para o diagnóstico de HPIE, por permitir a visualização do sangue no trato respiratório (HINCHCLIFF et al., 2015). Uma escala de graduação em relação à quantidade de sangue presente pode e deve ser instituída, de modo a avaliar o animal em relação à severidade de HPIE. Pascoe et al. (1981) foi o primeiro a utilizar tal escala e, na ocasião, atribuiu números para essa graduação, a começar pelo número 0, cuja representação é a ausência de hemorragia; e na sequência gradua a presença de sangue nas vias aéreas craniais até o número 3, o qual se refere a uma área superior a cinco milímetros de sangue visibilizado nas vias aéreas. Essa escala determinada por Pascoe foi modificada por Costa et al. (2004), que a ela adicionaram mais dois graus, fazendo com que a mesma tenha amplitude na escala de 0 a 5 (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela adaptada a partir dos critérios para avaliação do grau de hemorragia pulmonar induzida por exercício, estabelecidos por Costa et al. (2004). Jaboticabal, 2016.

GRAU 0	Ausência de sangue visível
GRAU 1	Traços de sangue na traqueia
GRAU 2	Presença de filete de sangue na traqueia
GRAU 3	Presença de sangue na traqueia, em quantidade superior ao grau anterior
GRAU 4	Presença abundante, com acúmulo de sangue na traqueia
GRAU 5	Hemorragia nasal e/ou presença de sangue abundante e acumulado na traqueia até a orofaringe

Muitos tratamentos para a HPIE já foram propostos; porém, quando se trata de animais atletas que, inevitavelmente voltarão a se exercitar, poucos tratamentos são de fato eficazes e, na literatura médico-veterinária, há bastante controvérsia acerca de tais práticas (PASCOE et al., 1985; COSTA et al., 2004; HINCHCLIFF; MORLEY; GUTHRIE, 2009; SULLIVAN; HINCHCLIFF, 2015). A controvérsia se dá em relação aos tratamentos relatados não apresentarem significância efetiva em prevenir a ocorrência de novo episódio de HPIE (HINCHCLIFF et al., 2015). Atualmente, os “tratamentos” preconizados para HPIE são considerados apenas medidas profiláticas, com vistas a prevenir ocorrência da HPIE ou diminuir sua severidade, caso venha a ocorrer (HINCHCLIFF et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015).

Os objetivos gerais para tal tratamento devem incluir a diminuição da injúria e da inflamação do último episódio de HPIE, além da tentativa de evitar ou diminuir a severidade de novo episódio hemorrágico (HINCHCLIFF et al., 2015). Dessa maneira, inicialmente, o animal deve ser mantido em repouso para alcançar o primeiro objetivo do tratamento e, ocasionalmente, antibióticos podem ser administrados em razão do sangue acumulado se tornar excelente meio de cultura para bactérias no trato respiratório do equino (VAN ERCK-WESTERGREN; FRANKLIN; BAYLY, 2013).

O segundo objetivo seria evitar ocorrência de novo episódio ou, pelo menos, reduzir a severidade dos episódios subsequentes (SULLIVAN et al., 2015). Nesse contexto, o uso de furosemida é o tratamento mais recomendado e mais preconizado

na literatura atualmente (HINCHCLIFF et al., 2015; SULLIVAN; HINCHCLIFF, 2015; SULLIVAN et al., 2015).

A furosemida é um fármaco que possui potente efeito diurético e seu uso é indicado em dose de 0,5 a 1,0 miligrama para cada quilo de peso vivo do animal, administrado pela via intravascular quatro horas antes de exercício intenso (PASCOE et al., 1985; SULLIVAN et al., 2015). Tal prática é justificada com base na teoria da ocorrência da HPIE, em virtude do aumento da pressão transmural dos capilares alveolares. Nesse contexto, o animal que receber a furosemida irá reduzir temporariamente a própria volemia, em virtude do aumento da excreção urinária ocasionada pelo fármaco, havendo, conseqüentemente, redução do volume de sangue circulante durante o exercício. No entanto, há de se observar que tal medida apenas diminui a severidade da ocorrência e da incidência da HPIE (MANOHAR; GOETZ, 1996; HINCHCLIFF; MORLEY; GUTHRIE, 2009; SULLIVAN et al., 2015).

2.2. Proteínas de fase aguda

No caso de o organismo vir a sofrer algum tipo de estímulo, como trauma, inflamação, infecção, estresse ou neoplasias, pode ocorrer resposta inflamatória inespecífica, rápida, de fase aguda (KRISTENSEN et al., 2014). Com esse tipo de resposta de fase aguda (RFA), advém a produção e liberação de diversas moléculas do tecido sede da injúria, incluindo citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas, que estimulam em particular os hepatócitos a sintetizarem as proteínas de fase aguda (PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004).

As PFA, ou proteínas de fase aguda, compreendem grupo de macromoléculas produzidas no fígado, que variam suas concentrações no plasma, de acordo com o estímulo inflamatório a que o organismo é submetido (ECKERSALL et al., 1999). Existem diversas PFA, como albumina, amiloide A sérica, α_1 -glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinogênio, proteína C-reativa e transferrina, dentre outras.

A classificação das PFA se dá de acordo com sua resposta frente ao processo inflamatório estabelecido, sendo positiva quando há aumento de sua concentração, e negativa quando ocorre diminuição de sua concentração plasmática durante a RFA (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008). A albumina e transferrina são consideradas PFA negativas, ao passo que amiloide A sérica, α_1 -glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina e fibrinogênio são classificados como PFA positivas (BELGRAVE et al., 2013).

Em equinos, as proteínas de fase aguda de maior importância clínica são a amiloide A sérica (AAS), o fibrinogênio (Fib) e a haptoglobina (Hp) (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008; VALLE et al.; 2015). Frente a estímulo inflamatório, tanto o Fib como a Hp podem aumentar cerca de 10 vezes a concentração plasmática normal, enquanto a AAS pode elevar de 100 a 1000 vezes, daí a AAS ser uma das PFA mais estudadas em cavalos (JACOBSEN; ANDERSEN, 2007; BELGRAVE et al., 2013). Destarte, a amiloide A sérica é considerada confiável marcador biológico, sinalizador de inflamação e infecção (BELGRAVE et al., 2013).

Em cavalos hígidos, sua concentração é baixa, porém aumenta drasticamente no soro e/ou plasma logo nas primeiras 6 a 24 horas do início da inflamação/infecção. Dada a curta meia vida dessa proteína, sua concentração diminui na mesma proporção e velocidade, mediante recuperação ou resposta positiva ao tratamento instituído, ou mesmo diante da cura do animal (JACOBSEN; ANDERSEN, 2007; HILLSTROM; TVEDTEN; LILLIEHOOK, 2010).

Além de todas essas condições citadas, os exercícios físicos intensos também provocam RFA, em decorrência do estresse causado pela atividade física dos cavalos. Animais em treinamento ou no decorrer de um exercício podem apresentar RFA e, conseqüentemente, alterações nas concentrações das PFA (CYWINSKA et al., 2012).

Em que pese tal fato, estudos realizados em cavalos de raça Árabe, em treinamento, não evidenciaram tal variação na concentração de AAS, sugerindo, possivelmente, que a adaptação desses animais a corridas de longa distância pode ter

ocasionado redução na RFA (CYWINSKA et al., 2013). Ademais, outro estudo realizado mais recentemente também não identificou RFA em 58 equinos trotadores submetidos ao exercício intenso de corrida de até dois mil metros de distância, em que as concentrações de AAS e Fib permaneceram inalteradas em resposta ao exercício (KRISTENSEN et al., 2014).

Contudo, foi evidenciado que cavalos cujas concentrações séricas de AAS mostraram-se superiores a 1000 nanogramas por mililitro não foram capazes de completar prova de enduro equestre, ratificando, de tal forma, que essa PFA é passível de ser utilizada como indicador de baixo desempenho do cavalo durante a corrida, podendo, inclusive, o animal ser eliminado da competição (CYWINSKA et al., 2010).

Em contrapartida, um trabalho realizado com cavalos da raça Puro-sangue inglês (PSI) com algum tipo de trauma ortopédico ocorrido durante a corrida revelou ter havido aumento na concentração de AAS entre o terceiro e o quarto dia após a corrida/trauma. Nessa ocasião, a hipótese levantada pelos autores para tal acontecimento é que as estruturas envolvidas no tipo de trauma sofrido pelos animais possuíam pouca vascularização e menor quantidade de tecido (TURLO et al., 2015a).

Em Concurso Completo de Equitação, realizado na Itália, com duração de dois dias, no primeiro dia da competição, os cavalos realizaram provas de adestramento equestre e de salto e, no segundo, de “cross-country”. Após a realização da última prova, esses animais apresentaram aumento significativo de AAS, comprovando a ocorrência de RFA em tal modalidade de exercício em equinos (VALLE et al., 2015).

A esse respeito, vale lembrar que diversos trabalhos já investigaram a concentração da AAS com doenças inflamatórias diversas (BELGRAVE et al., 2013; HOOIJBERG et al., 2014; TURLO et al., 2015b; WESTERMAN et al., 2015), assim como do sistema respiratório (LAVOIE-LAMOUREUX et al., 2012; BACK et al., 2015; BULLONE et al., 2015; LECLERE; LAVOIE-LAMOUREUX; LAVOIE, 2015). Porém, até o presente momento, não há registro de nenhum estudo sobre a relação de concentração de AAS e HPIE em equinos consagrados à atividade desportiva.

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar se há relação entre a concentração de amiloide A sérica em equinos da raça Puro-sangue inglês portadores ou não de hemorragia pulmonar induzida por exercício e medicados ou não com furosemida.

Perante o exposto, a hipótese levantada é que equinos portadores de HPIE apresentam algum grau de inflamação e, portanto, devem apresentar concentração maior de amiloide A sérica que animais hígidos (não portadores de HPIE). Entre os animais portadores de HPIE, a depender da classificação do grau da hemorragia, o esperado é que equinos com grau 5 de HPIE apresentem maiores concentrações de AAS que os demais graus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Método de inclusão de animais no estudo

Nesta investigação, incluíram-se todos os equinos, partícipes de corrida, encaminhados ao Serviço de Endoscopia do Departamento Veterinário de Corrida cujo treinador e/ou tutor do animal forneceram consentimento verbal para a realização de exame endoscópico das vias aéreas craniais e colheita de sangue venoso da veia jugular externa no período compreendido entre os dias 17/12/2012 à 07/01/2013, no Jockey Club Brasileiro da Gávea, no município do Rio de Janeiro, RJ.

3.2. Animais e grupos

Foram utilizados 71 equinos adultos, sendo 43 machos (39 garanhões e 4 machos castrados) e 28 fêmeas, da raça Puro-sangue inglês (PSI), com $4 \pm 1,05$ anos de idade.

Os animais foram inicialmente alocados em dois grupos, os equinos portadores de HPIE (GH) e os equinos sem HPIE (GC). O grupo GH foi constituído pelos animais que foram medicados com furosemida antes da corrida e/ou apresentaram algum grau de HPIE durante o exame endoscópico após a corrida (realizado apenas em um momento). O grupo GC foi constituído pelos demais indivíduos desta pesquisa representando o grupo controle de animais sadios não medicados com furosemida e sem HPIE. Desta forma, dos 71 equinos incluídos no estudo, 43 animais compuseram o grupo GH e 28 animais o grupo GC.

Os animais alocados no grupo GH foram subdivididos em três grupos de acordo com detecção de sangue (HPIE^+) ou não (HPIE^-) nas vias aéreas craniais durante o exame endoscópico e o tratamento (F^+) ou não com furosemida (F^-), a saber:

1- HPIE^-F^+ = grupo sem HPIE ao exame endoscópico e com tratamento com furosemida até quatro horas antes da corrida na dose de 1 mg/Kg por via intravascular;

2- HPIE^+F^+ = grupo com HPIE ao exame endoscópico e com tratamento com furosemida até quatro horas antes da corrida na dose de 1 mg/Kg por via intravascular;

3- HPIE^+F^- = grupo com HPIE ao exame endoscópico e sem tratamento com furosemida.

3.3. Endoscopia

O Departamento Veterinário de Corrida (DVC), localizado nas dependências do JCB, possui um setor especializado onde é realizado exames de endoscopia das vias aéreas craniais de equinos, em geral, 15 minutos após as corridas. Sendo assim, o trabalho deste setor está diretamente ligado às corridas do JCB que ocorrem todas as sextas-feiras, sábados, domingos e segundas-feiras ao longo do ano. A CC, rotineiramente, indica alguns equinos para realizar o exame endoscópico, em especial os animais que competem medicados com furosemida. Essa medicação, assim como outras, é considerada “doping”, gerando penalidades ao treinador quando detectada no exame “antidoping”. Entretanto, animais previamente acometidos pela HPIE podem ser medicados com tal fármaco até quatro horas antes da corrida na dose de 1 mg/Kg, desde que o DVC e a CC sejam previamente comunicados. E, para fins de monitoramento desses animais, a CC seleciona alguns equinos após a corrida para investigar por meio do exame endoscópico se ocorreu HPIE mesmo com o uso da furosemida.

Nada obstante, os equinos não indicados também podem fazer uso do serviço de endoscopia, a critério de seus treinadores e veterinários, quando há queda de desempenho do animal durante a corrida, com o intuito de se estabelecer um provável motivo para tal acontecimento.

O exame endoscópico das vias aéreas dos animais deste estudo foi realizado na sala de endoscopia do DVC com colonofibroscópio¹ acoplado a uma microcâmera²,

¹ Colonofibroscópio modelo CF 10L - Olympus®, São Paulo, SP.

² Microcâmera Karl Storz modelo Endovision XL 2028 0130 NTSC – Karl Storz®, Tuttlingen, Alemanha.

interligado a televisor³, para possibilitar a visualização das vias aéreas craniais (Figura 1). Dois avaliadores ficaram responsáveis em diagnosticar e preencher o laudo do exame realizado quanto à presença ou ausência de HPIE e a sua graduação de acordo com Costa et al. (2004), conforme a Tabela 1.

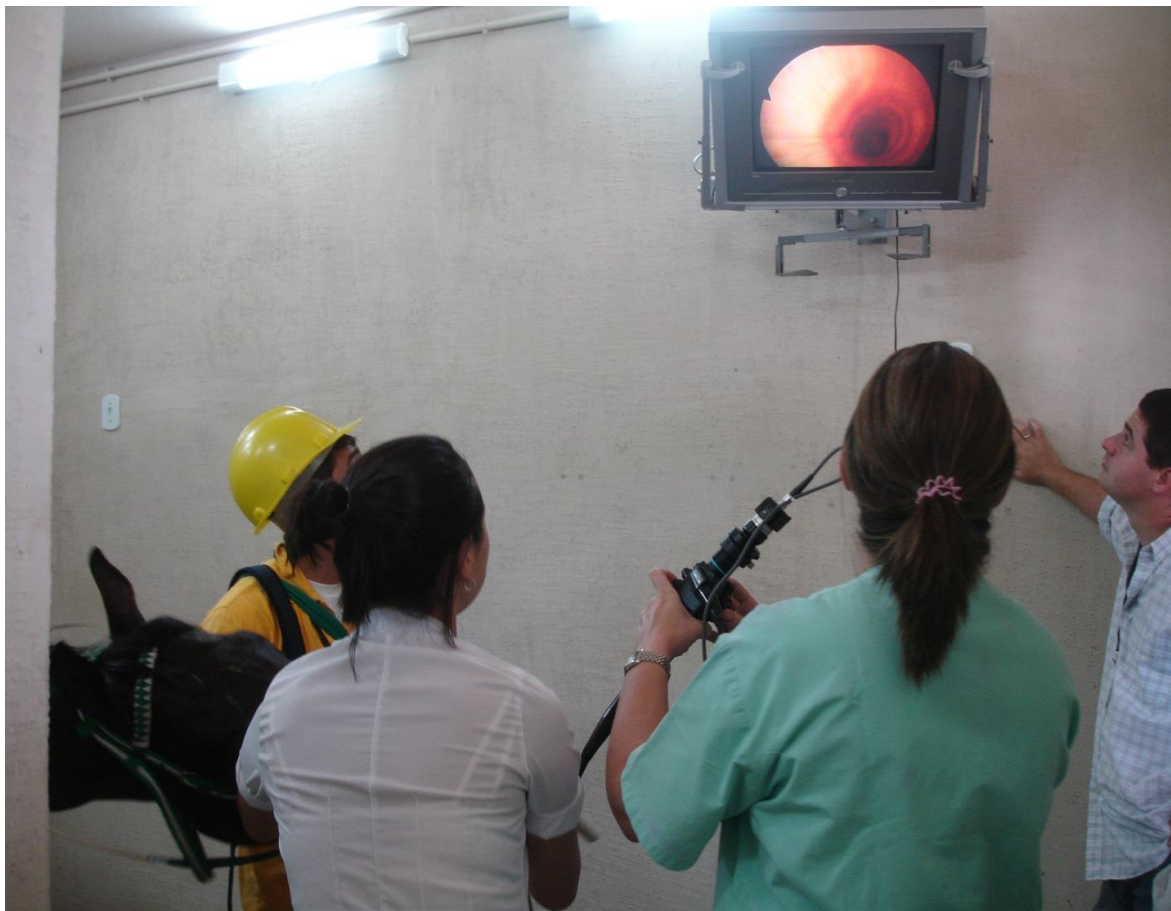


Figura 1. Imagem fotográfica de exame endoscópico das vias aéreas de equino Puro-sangue inglês, na sala de endoscopia do Departamento Veterinário de Corrida nas dependências do Jockey Club Brasileiro. Jaboticabal, 2016.

³ Televisor Philco de tubo com 14 polegadas - Philco ®, São Paulo, SP.

3.4. Colheita das amostras de sangue

Realizado o exame endoscópico das vias aéreas, amostras de sangue de uma das veias jugulares externas foram colhidas com uso de agulha⁴ e de tubos sem anticoagulante⁵ após antissepsia local com álcool 70%.

O sangue foi colhido em tubos a vácuo de dez mililitros sem anticoagulante⁵, acondicionados em caixa térmica com gelo até o transporte para o Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias do JCB (LACVET-JCB), centrifugados⁶ por 5 minutos por 1.509 x g. O soro obtido foi armazenado em microtubos⁷ e congeladas em gelo seco. Ao término da colheita de todas as amostras, os soros obtidos foram transportados até o laboratório de apoio à pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia – FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal, onde foram armazenados e mantidos em *freezer*⁸ a -80°C, até o momento da análise.

3.5. Amiloide A sérica

A análise de amiloide A sérica foi determinada por ensaio imunoenzimático pela técnica de ELISA indireto (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando-se um *kit* comercial⁹, no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica “Carlos Chagas Filho” da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sob responsabilidade do Professor Doutor Pedro Leme Silva.

O ensaio para realizar as análises se iniciou com o preparo do volume apropriado dos reagentes (Figura 2) contidos no *kit* comercial (preparo da solução tampão de diluição, solução tampão de lavagem e da solução de calibração). Em seguida, as amostras de soro dos equinos foram diluídas 2000 vezes em solução tampão de diluição, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Ato contínuo, a

⁴ BD Vacutainer® Passive Shielding Blood Collection Needle 21g x 1" - BD Vacutainer®, São Paulo, SP.

⁵ Serum Tube 10 mL, No Additive, Silicone-Coated Interior - BD Vacutainer®, São Paulo, SP.

⁶ Centrífuga BABY®I Mod. 206 BL - FANEM®, São Paulo, SP.

⁷ Microtubo 2,0 mL tipo Eppendorf de polipropileno transparente - AZLON®, Ribeirão Preto, SP.

⁸ Ultra Freezer AL374, 80V, AmericanLab, Charqueada, SP.

⁹ PHASE™ RANGE – Multispecies SAA ELISA KIT (TP-802), Tridelta Development Ltd.®, Irlanda.

curva de calibração foi preparada utilizando-se seis poços da placa de ELISA conforme as instruções. A placa (Figura 3) foi montada adicionando-se 50 μ L do conjugado anti-AAS (amarelo) em cada poço e, em seguida, 50 μ L de cada amostra, solução controle ou solução de calibração, sendo incubada por uma hora a 37°C de temperatura. Após o período de incubação, a placa foi lavada quatro vezes em aparelho automatizado¹⁰ com a solução tampão de lavagem. Na sequência, adicionou-se 100 μ L do substrato tetrametilbenzidina (TMB) e a placa foi incubada novamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Subsequentemente, 100 μ L de solução para encerrar a reação foram adicionados a cada poço da placa de ELISA e a absorbância foi aferida em aparelho automatizado para leitura de placas de ELISA¹¹ com comprimento de onda de excitação de 450 nm (Figura 4).



Figura 2. Preparação dos volumes apropriados das soluções de tampão de lavagem (líquido rosa à esquerda) e tampão de diluição (líquido azul à direita) para utilização durante o ensaio imunoenzimático. Jaboticabal, 2016.

¹⁰ Microplate Washer LT 3500®, Labtech International Ltd®, Uckfield, East Sussex, Reino Unido.

¹¹ SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, EUA.

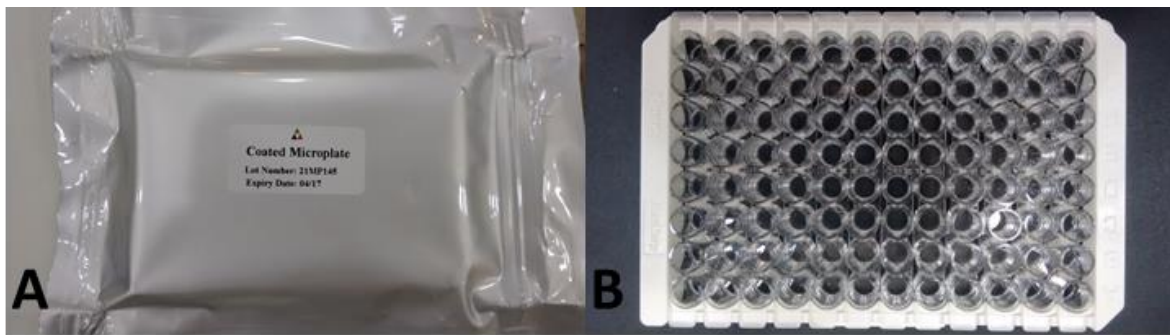


Figura 3. **A** – Embalagem da placa de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*. **B**– Placa de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* utilizada para o ensaio imunoenzimático. Jaboticabal, 2016.

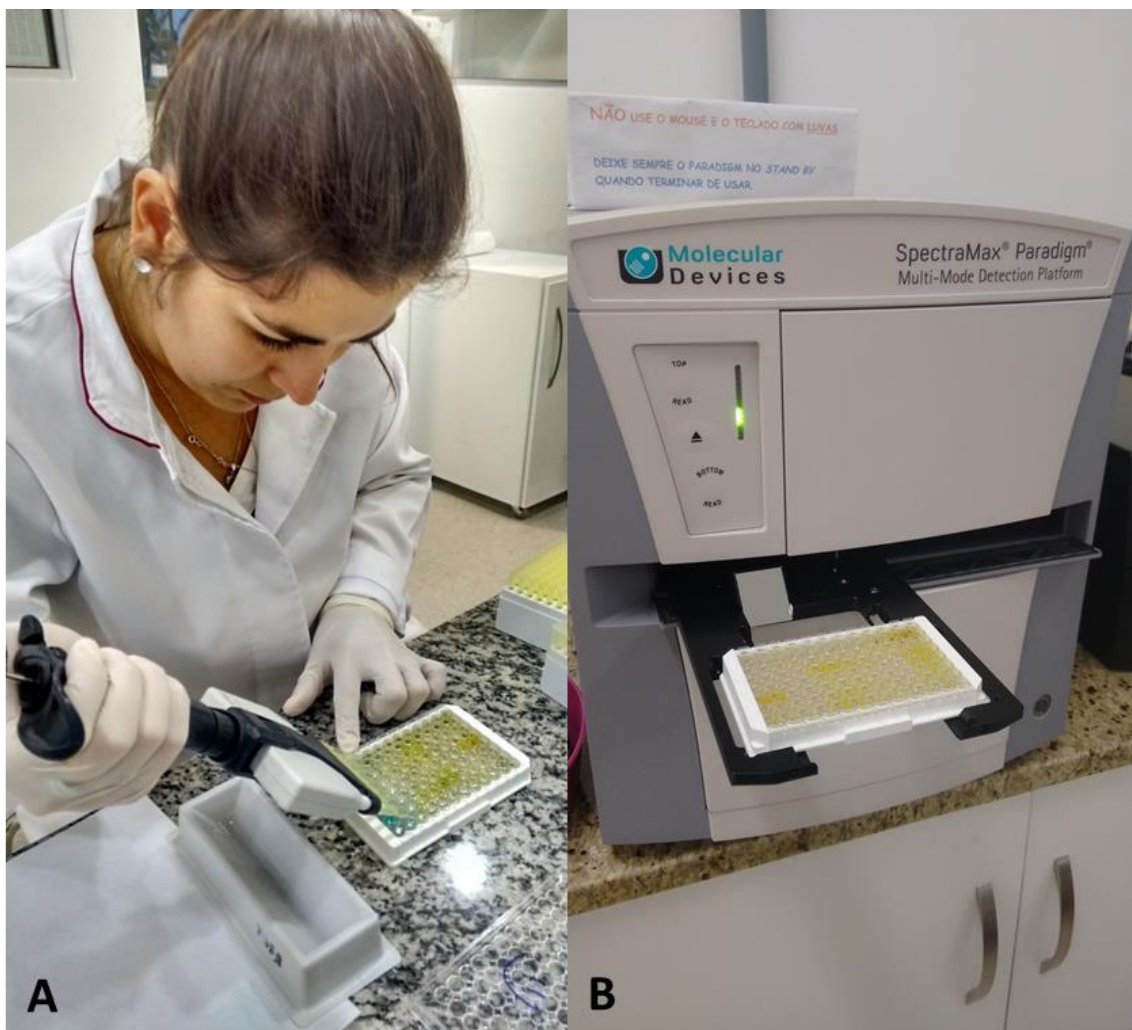


Figura 4. **A** – Adição de solução para encerrar a reação na placa de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*. **B** – Acomodação da placa de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* em aparelho automatizado para aferir a absorbância do ensaio imunoenzimático. Jaboticabal, 2016.

Para cada amostra de soro equino adicionou-se todos os componentes do ensaio descrito e a curva de calibração foi elaborada para cada placa de ELISA utilizada com a finalidade de estabelecer os parâmetros das amostras controle e padrão fornecidos pelo fabricante em cada *kit*.

A análise de cada amostra foi efetuada em triplicata e por este motivo, para cada amostra, foi calculada a média das leituras e, em seguida, o valor obtido foi multiplicado pelo valor da diluição das amostras para encontrar a concentração de AAS. A unidade de concentração sérica dos resultados de AAS apresentados neste estudo foi expressa em micrograma (μg) para cada mililitro (mL) de soro.

3.6. Análise estatística

Efetuuou-se análise de variância (ANOVA) para avaliar os resultados das endoscopias (presença ou ausência de HPIE) e o tratamento ou não com furosemda utilizando-se do programa SAS¹². Em todos os testes estatísticos foi aplicado o nível de significância de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Quando as ANOVAS apresentaram diferença estatística entre a presença ou a ausência de HPIE, os dados foram analisados pelo teste t. A variável dependente analisada foi a presença ou ausência de HPIE. Nessa análise, o fator fixo foi o momento do exame endoscópico, quando os cavalos foram considerados fator aleatório.

Para as análises de amiloide A sérica, a variável analisada como fator fixo foi a presença de HPIE; o momento de colheita de sangue constituiu a variável dependente, e os cavalos foram considerados como fatores aleatórios.

Os resultados das variáveis analisadas foram apresentados sob a forma de valores médios e erro padrão da média, discutidos e interpretados em tabelas e figuras.

¹² Statistical Analysis System - SAS 9.2, Cary, NC, EUA.

4. RESULTADOS

Com base nos critérios adotados e descritos anteriormente para a divisão dos grupos e subgrupos, dos 71 equinos avaliados, 28 equinos (39%) compuseram o grupo controle (GC) e 43 equinos (61%) o grupo hemorragia pulmonar induzida por exercício (GH). Dos 28 animais do GC, 17 equinos eram machos e 11 eram fêmeas. Dentre os animais do GH, 26 equinos eram machos e 17 eram fêmeas (Tabela 2).

Ao analisar a concentração de AAS no sangue dos animais dos grupos GC e GH, não houve diferença ($p=0,292$), sendo os valores médios e o erro padrão da média ($\bar{X} \pm \text{EPM}$) correspondente a $4,9 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$ e $7,5 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabela 2. Número total de equinos portadores ou não de HPIE subdivididos quanto ao gênero, os valores médios e o erro padrão da média ($\bar{X} \pm \text{EPM}$) da concentração de AAS. Jaboticabal, 2016.

	TOTAL DE ANIMAIS	TOTAL	MACHOS		FÊMEAS	[AAS]
	n (%)	n (%)	GARANHÕES n (%)	CASTRADOS n (%)	n (%)	$\mu\text{g/mL}$
TOTAL DE ANIMAIS	71 (100)	43 (61)	39 (55)	4 (5)	28 (39)	-
GC	28 (39)	17 (24)	14 (20)	3 (4)	11 (15)	$7,5 \pm 3,0$
GH	43 (61)	26 (37)	25 (35)	1 (1)	17 (24)	$4,9 \pm 3,1$

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença encontrada entre os grupos ($p \leq 0,05$) pelo teste t. HPIE = hemorragia pulmonar induzida por exercício; AAS = amiloide A sérica; GC = grupo controle; GH = grupo de equinos portadores de HPIE

O grupo GH foi subdividido em relação aos equinos que apresentaram (HPIE^+) ou não (HPIE^-) sangue nas vias aéreas craniais durante o exame endoscópico e/ou foram tratados (F^+) ou não com furosemida (F^-) até quatro horas antes da corrida na dose de 1 mg/Kg por via intravascular. Dentre os equinos do grupo GH houve aumento da concentração de AAS ($p=0,020$) nos animais não medicados com furosemida quando comparados com os que foram medicados antes da corrida. Ademais, os animais do grupo que apresentou HPIE durante o exame endoscópico que não foram tratados com furosemida antes da corrida apresentaram aumento acentuado na concentração de proteína AAS ($p=0,062$) em comparação com os equinos que apresentaram HPIE e foram medicados, como demonstrado na Tabela 3 e Figura 5.

Tabela 3. Número de equinos portadores de HPIE tratados ou não com furosemida e apresentando ou não hemorragia nas vias aéreas durante o exame endoscópico com os valores médios e o erro padrão da média ($X \pm EPM$) da concentração de AAS. Jaboticabal, 2016.

	TOTAL DE ANIMAIS	[AAS] $\mu\text{g/mL}$
GH	43 (100)	—
HPIE ⁻ F ⁺	6()	1,2 ^{A,B} $\pm 0,5$
HPIE ⁺ F ⁺	20()	1,8 ^A $\pm 0,9$
HPIE ⁺ F ⁻	17 ()	16,5 ^B $\pm 7,1$

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença encontrada entre os grupos ($p \leq 0,05$) pelo teste t. HPIE = hemorragia pulmonar induzida por exercício; AAS = amiloide A sérica; GH = grupo de equinos portadores de HPIE

E para cada um desses subgrupos os equinos ainda receberam mais uma subdivisão quanto aos graus de HPIE (Tabela 4) de acordo com a classificação estabelecida por Costa et al. (2004).

Tabela 4. Número total de equinos utilizados no projeto, portadores de HPIE (HPIE⁺) tratados com furosemida (F⁺) ou não (F⁻) subdivididos quanto ao gênero, com os valores médios e o erro padrão da média ($X \pm EPM$) da concentração de AAS. Jaboticabal, 2016.

	TOTAL DE ANIMAIS	MACHOS		FÊMEAS	[AAS]
	n (%)	GARANHÕES n (%)	CASTRADOS n (%)	n (%)	$\mu\text{g/mL}$
GH	43 (61)	25 (35)	1 (1)	17 (24)	
HPIE⁻F⁺	6	3	0	3	1,2^{A,B} $\pm 0,5$
HPIE⁺F⁻	17	11	0	6	16,5^B $\pm 7,1$
HPIE ⁺ F ⁻ G1	8	6	0	2	
HPIE ⁺ F ⁻ G2	7	5	0	2	
HPIE ⁺ F ⁻ G3	0	0	0	0	
HPIE ⁺ F ⁻ G4	1	0	0	1	
HPIE ⁺ F ⁻ G5	1	0	0	1	
HPIE⁺F⁺	26	10	1	9	16,5^B $\pm 7,1$
HPIE ⁺ F ⁺ G1	8	3	1	4	
HPIE ⁺ F ⁺ G2	3	2	0	1	
HPIE ⁺ F ⁺ G3	5	2	0	3	
HPIE ⁺ F ⁺ G4	1	1	0	0	
HPIE ⁺ F ⁺ G5	3	2	0	1	

HPIE = hemorragia pulmonar induzida por exercício; [AAS] = concentração de amiloide A sérica; F⁺ = tratados com furosemida; F⁻ = não tratados com furosemida; G0 = sem hemorragia pulmonar no exame endoscópico; G1 = HPIE grau 1; G2 = HPIE grau 2; G3 = HPIE grau 3; G4 = HPIE grau 4; G5 = HPIE grau 5

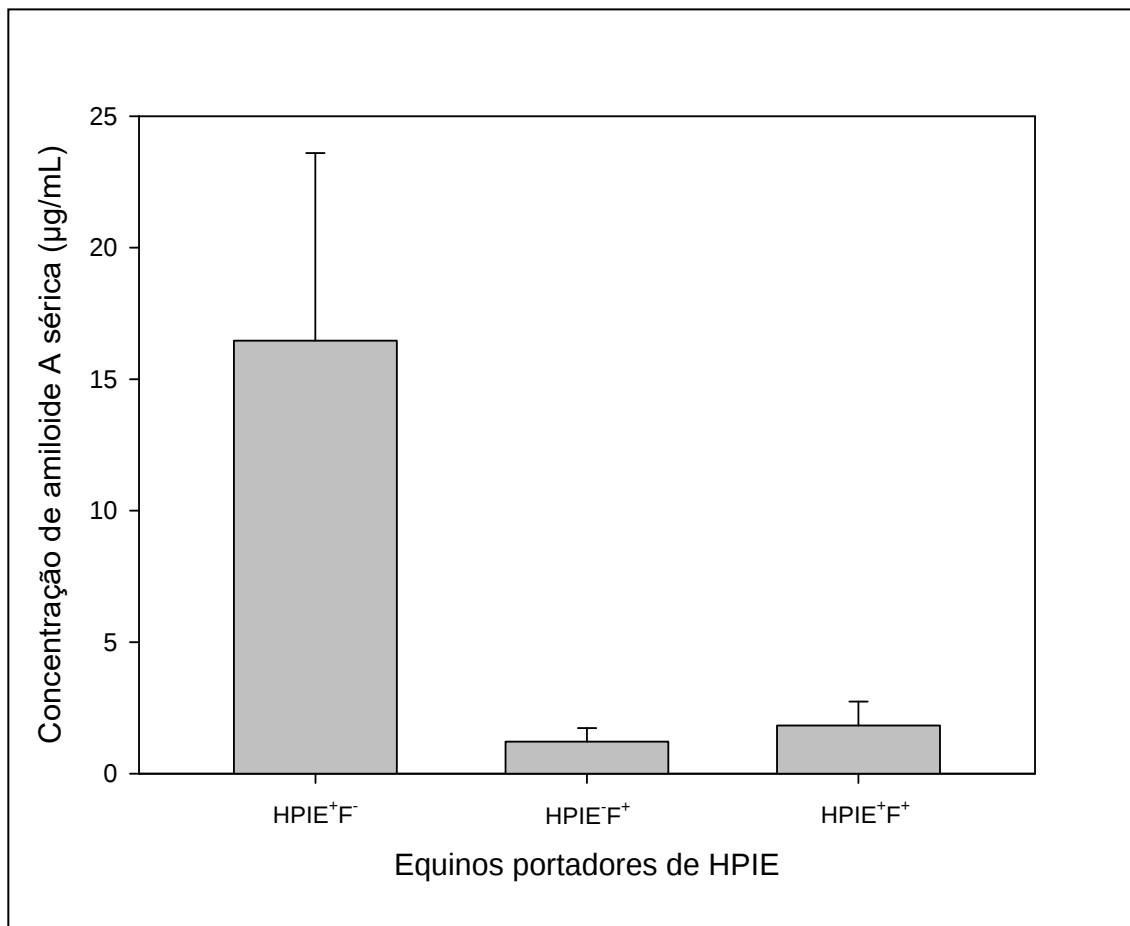


Figura 5. Concentração de amiloide A sérica de cavalos Puro-sangue inglês dos grupos hemorragia pulmonar induzida por exercício positivo e negativo. Jaboticabal, 2016.

5. DISCUSSÃO

A hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) constitui uma afecção importante que acomete animais de alto rendimento atlético e, no presente estudo, dos 71 equinos avaliados por meio de exame endoscópico, 37 apresentaram sangue na traqueia sendo diagnosticados positivos para HPIE (52%) corroborando com estudos anteriores que detectaram até 90% de incidência HPIE nos animais estudados (PASCOE et al., 1981; HINCHCLIFF et al., 2015).

Diversos modelos de estudos foram elaborados para determinar a ocorrência e a prevalência de HPIE, porém a frequência das avaliações e os métodos de diagnóstico empregados pra detectar tal doença é bastante variável. A frequência de avaliação pode ser realizada em uma ou em mais de uma ocasião, ao passo que o método de diagnóstico pode ser realizado por meio de exame endoscópico ou por citologia do lavado broncoalveolar. Ao longo dos anos, ao se fazer levantamento sobre tais aspectos, os diferentes métodos de estudo fizeram com que a casuística de HPIE se tornasse bastante variável, entre 35% e 90% (COSTA et al., 2004; HINCHCLIFF et al., 2015).

Nos trabalhos em que o mesmo animal foi avaliado mais de uma vez a ocorrência de HPIE chega a 85% entre os animais estudados, sinalizando a severidade e a alta prevalência que esta afecção possui (SWEENEY et al., 1990; HINCHCLIFF; MORLEY; GUTHRIE, 2009). Da mesma maneira, o método de diagnóstico utilizando a citologia do lavado broncoalveolar também estabelece maiores percentuais de diagnóstico da doença quando comparado ao método de diagnóstico por imagem, em virtude de sua sensibilidade em detectar pequenos sangramentos pulmonares (SULLIVAN; HINCHCLIFF, 2015).

No presente estudo, os equinos foram avaliados por meio de exame endoscópico das vias aéreas em apenas um momento. Desta forma dos 71 equinos avaliados, 43%

dos animais apresentaram grau 1 e 27% dos animais apresentaram grau 2 de HPIE corroborando com estudo de Costa et al. (2004), o qual também encontrou nestes dois graus o maior número de animais afetados (36% com grau 1 e 24% com grau 2).

O exato mecanismo de ação pelo qual a furosemida previne ou reduz a gravidade da HPIE ainda não foi totalmente elucidado, sendo sugeridas algumas hipóteses porém sem comprovação científica (SULLIVAN; HINCHCLIFF, 2015). Até o presente momento, este é o primeiro trabalho realizado correlacionando HPIE e concentração de AAS, onde o uso ou não de furosemida determinou diferenças entre os animais do grupo HPIE positivo. Tais dados tornaram-se bastante difícil de discutir em virtude de não haver na literatura informações concretas sobre real mecanismo de ação desse fármaco em animais com HPIE.

Sabe-se, no entanto, que a HPIE ocorre quando há falência funcional dos capilares pulmonares em virtude do estresse ocasionado pela excessiva pressão transmural gerada durante exercício de alta intensidade e/ou quando há alguma fragilidade capilar (WEST, 2000; HINCHCLIFF et al., 2015). A pressão transmural é determinada pela diferença entre as pressões do espaço intracapilar (com alta pressão sanguínea) e do espaço intraalveolar (com baixa pressão gerada pelo binômio pressão negativa intrapleurar x inspiração sincrônica com o galope). Durante o exercício, a pressão da artéria pulmonar só tende a aumentar enquanto a pressão pleural se torna cada vez mais negativa de modo a romper a barreira entre alvéolos e capilares (MANOHAR; GOETZ, 1996; MICHELOTTO JR et al., 2011; SULLIVAN; HINCHCLIFF, 2015; BOVE, 2016). Neste contexto, WEST (2000) demonstrou que tal somatório de eventos resulta em extravasamento de líquido para o interstício ocasionando edema pulmonar em exercícios extremos, sendo sugerido que os animais com HPIE apresentarão resposta de fase aguda nos pulmões que irá variar de acordo com a severidade da lesão endotelial causada em cada episódio.

A resposta de fase aguda irá determinar o aumento da proteína sérica amiloide A, sabidamente um importante biomarcador de inflamação em equinos, sendo

largamente estudada por diversos grupos de pesquisa. É importante ressaltar que boa parte dos estudos a utilizam, porém é uma proteína de fase aguda positiva e inespecífica, ou seja, aumenta na resposta de fase aguda para os mais diferentes tipos de eventos (JACOBSEN; ANDERSEN, 2007; LAVOIE-LAMOUREX et al., 2012; BELGRAVE et al., 2013; BACK et al., 2015; BULLONE et al., 2015; LECLERE; LAVOIE-LAMOUREX; LAVOIE, 2015). Anteriormente Kristensen et al. (2014) relataram que em corridas de cavalos da raça “Standardbred” submetidos aos exercícios de alta intensidade não houve quaisquer alterações nas concentrações de AAS em resposta a atividade esportiva praticada pelos animais. Esse estudo corrobora com os dados aqui apresentados, onde os animais mantiveram as concentrações de AAS dentro dos valores de normalidade da espécie, entre 0 - 20 µg/mL (JACOBSEN et al., 2006), mesmo quando separados nos grupos HPIE^+ e HPIE^- , não havendo diferença entre os grupos ($p=0,327$).

No presente estudo, apenas cinco equinos apresentaram aumento da concentração de AAS acima dos padrões de normalidade para a espécie equina supracitado, com valores médios de 68,5 µg/mL (intervalo de valores 27,1 – 86,3 µg/mL). Dentre estes animais, um não apresentou HPIE e era estreante na carreira, ou seja, nunca havia corrido em provas oficiais, enquanto quatro apresentaram HPIE, sendo três com grau 2 e um com grau 5. Um dos animais com HPIE^+ grau 2 apresentou, ao final da corrida, claudicação do membro torácico direito e foi o animal com a maior concentração de AAS. Turlo et al. (2015) foram os primeiros a relatar o aumento de AAS em cavalos PSI com lesões ortopédicas após corridas corroborando o resultado obtido com a realização da presente pesquisa.

Uma condição comum a esses cinco equinos é que nenhum deles foi medicado com furosemida antes da corrida, fato interessante principalmente ao analisar os dados referentes à presença ou ausência de HPIE e os valores de AAS entre os animais medicados ou não com furosemida. Em todas as situações os animais que receberam a medicação previamente a corrida apresentaram redução da concentração de AAS, sendo significativa apenas para o grupo HPIE^+ .

Com base nestas informações, é provável que os equinos que receberam o fármaco furosemida antes das competições e, portanto, sofreram diurese intensa, permaneceram transitoriamente “hipovolêmicos”, e não desenvolveram essa excessiva pressão transmural e edema pulmonar como os animais que não receberam o fármaco. E, possivelmente, os dados aqui relatados referentes à diminuição da concentração de AAS em animais tratados com a furosemida se relacionaram diretamente com esses fenômenos, pois ambos são capazes de produzir resposta de fase aguda e determinar o aumento da AAS.

Neste contexto fica claro que mais estudos necessitam ser realizados para determinar o exato mecanismo de ação pelo qual a furosemida atua na profilaxia e/ou na redução da gravidade dos episódios de HPIE, bem como elucidar o mecanismo de ação pelo qual o uso da furosemida determina a diminuição da concentração de AAS em equinos da raça PSI.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com a realização desta pesquisa, é lícito concluir que:

- 1- Há uma tendência dos cavalos portadores de HPIE apresentar aumento da concentração sérica da proteína AAS;
- 2- Os equinos portadores de HPIE medicados com furosemida apresentam diminuição significativa da concentração de amiloide A sérica.

7. REFERÊNCIAS*

BACK, H.; PENELL, J.; PRINGLE, J.; ISAKSSON, M.; RONÉUS, N.; BERNDTSSON, L. T.; STAHL, K. A longitudinal study of poor performance and subclinical respiratory viral activity in Standardbred trotters. **Veterinary Record Open**, London, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/vetreco-2014-000107>>.

BELGRAVE, R. L.; DICKEY, M. M.; ARHEART, K. L.; CRAY, C. Assessment of serum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 243, n. 1, p. 113-119, 2013.

BOVE, A. A. Pulmonary aspects of exercise and sports. **Methodist Debakey Cardiovascular Journal**, Houston, v. 12, n. 2, p. 93-97, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14797/mdcj-12-2-93>>.

BULLONE, M.; de LAGARDE, M.; VARGAS, A.; LAVOIE, J. P. Serum surfactante protein D and Haptoglobin as potential biomarkers for inflammatory airway disease in horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 29, n. 6, p. 1707-1711, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jvim.13602>>.

CAMPBELL, E. H. Lactate-driven equine conditioning programmes. **The Veterinary Journal**, London, n. 190, p. 199-207, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.11.012>>.

COSTA, M. F. M.; THOMASSIAN, A.; GOMES, T. S.; MAIA, E. Estudo da hemorragia pulmonar induzida por esforço (HPIE) em cavalos de corrida PSI através da análise de 1889 endoscopias respiratórias após corrida. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 11, n. 3, p. 89-91, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.310>>.

CRISMAN, M. V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood proteins and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 24, n. 2, p. 285-297, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2008.03.004>>.

CYWINSKA, A.; GORECKA, R.; SZARSKA, E.; WITKOWSKI, L.; DZIEKAN, P.; SCHOLLENBERGER, A. Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. **Equine Veterinary Journal**, Malden, v. 38, p. 23-27, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00280.x>>.

* Redigidas conforme as normas ABNT – NBR 6023/2002.

CYWINSKA, A.; SZARSKA, E.; GORECKA, R.; WITKOWSKI, L.; HECOLD, M.; BEREZNOWSKI, A.; SCHOLLENBERGER, A.; WINNICKA, A. Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. **Research in Veterinary Science**, Philadelphia, v. 93, n. 3, p. 1402-1406, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.02.008>>.

CYWINSKA, A.; WITKOWSKI, L.; SZARSKA, E.; SCHOLLENBERGER, A.; WINNICKA, A. Serum amyloid A (SAA) concentration after training sessions in Arabian race and endurance horses. **BMC Veterinary Research**, London, v. 1, p. 91-97, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-9-91>>.

ECKERSALL, P. D.; DUTHIE, S.; TOUSSAINT, M. J. M.; GRUYS, E.; HEEGAARD, P.; ALAVA, M.; LIPPERHEIDE, C.; MADEC, F. Standardization of diagnostic assay for animal acute phase proteins. **Advances in Veterinary Medicine**, Oxford, v. 41, p. 643-655, 1999.

GEOR, R. EIPH: Exercise-induced pulmonary hemorrhage. **The Horse**, Lexington, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.thehorse.com/articles/12529/eiph-exercise-induced-pulmonary-hemorrhage>>. Acesso em: 20 março 2016.

GEOR, R. J.; OMMUNDSON, L.; FENTON, G.; PAGAN, J. D. Effects of an external nasal strip and furosemide on pulmonary haemorrhage in Thoroughbreds following high-intensity exercise. **Equine Veterinary Journal**, Malden, v. 6, n. 33, p. 577-584, 2001.

HILLSTROM, A.; TVEDTEN, H.; LILLIEHOOK, I. Evaluation of an in-clinic Serum Amyloid A (SAA) assay and assessment of the effects of storage on SAA samples. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 52, n. 8, p. 1-6, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-52-8>>.

HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J. The horse as an athlete: a physiological overview. In: HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J.; KANEPS, A. J. **Equine Exercise Physiology**. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008. cap. 1, p. 1- 11.

HINCHCLIFF, K. W.; MORLEY, P. S.; GUTHRIE, A. J. Efficacy of furosemide for prevention of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred racehorses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 235, n. 1, p. 76-82, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2460/javma235.1.76>>.

HINCHCLIFF, K. W. Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. In: **Advances in Equine Nutrition**, Kentucky, v. IV, p. 367-377, 2009. Disponível em: <<http://ker.com/wp-content/uploads/2015/04/EXERCISE-INDUCED-PULMONAR-Y-HEMORRHAGE-435.pdf>>. Acesso em: 15 abril 2016.

HINCHCLIFF, K. W.; COUETIL, L. L.; KNIGHT, P. K.; MORLEY, P. S.; ROBINSON, N. E.; SWEENEY, C. R.; VAN ERK, E. Exercise induced pulmonary hemorrhage in horses: American College of Veterinary Internal Medicine Consensus Statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 29, p. 743-758, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jvim.12593>>.

HOOIJBERG, E. H.; VAN DEN HOVEN, R.; TICHY, A.; SCHWENDENWEIN, I. Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 28, n. 5, p. 1587-1593, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jvim.12404>>.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. **Equine Veterinary Education**, Malden, v. 38, p. 38-46, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-3292.2007.tb00550.x>>.

JACOBSEN, S.; KJELGAARD-HANSEN, M.; PETERSEN, H. H.; JENSEN, A. L. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. **The Veterinary Journal**, London, n. 172, p. 315-319, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.04.021>>.

KRISTENSEN, L.; BUHL, R.; NOSTELL, K.; BAK, L.; PETERSEN, E.; LINDHOLM, M.; JACOBSEN, S. Acute exercise does not induce an acute phase response (APR) in Standardbred trotters. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 78, n. 2, p. 97-102, 2014.

LAVOIE-LAMOUREUX, A.; LECLERE, M.; LEMOS, K.; WAGNER, B.; LAVOIE, J. P. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 26, n. 6, p. 1419-1426, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00993.x>>.

LECLERE, M.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; LAVOIE, J. P. Acute phase proteins in Racehorses with inflammatory airway disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 29, p. 940-945, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jvim.12587>>.

MANOHAR, M.; GOETZ, T. E. Pulmonary vascular pressures of exercising Thoroughbred horses with and without endoscopic evidence of EIPH. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 81, p. 1589-1593, 1996.

MICHELOTTO JR, P. V.; MUEHLMANN, L. A.; ZANATTA, A. L.; BIEBERBACH, E. W. R.; KRYCZYK, M.; FERNANDES, L. C.; NISHIYAMA, A. Pulmonary inflammation due to exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred colts during race training. **The Veterinary Journal**, London, n. 190, p. e3-e6, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.08.009>>.

PASCOE, J. R.; FERRARO, G. L.; CANNON, J. H.; ARTHUR, R. M.; WHEAT, J. D. Exercise-induced hemorrhage in racing Thoroughbreds: A preliminary study. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, p. 703-707, 1981.

PASCOE, J. R.; MCCABE, A. E.; FRANTI, C. E.; ARTUR, R. M. Efficacy of furosemide in the treatment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred racehorses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 9, p. 2000-2003, 1985.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. N.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, London, n. 35, p. 163-187, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2004002>>.

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

SULLIVAN, S. L.; HINCHCLIFF, K. W. Update on Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, London, v. 31, n. 1, p. 187-198, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.011>>.

SULLIVAN, S. L.; WHITTEM, T.; MORLEY, P. S.; HINCHCLIFF, K. W. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of furosemide for exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred and Standardbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, Malden, v. 47, n. 3, p. 341-349, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/evj.12373>>.

TURLO, A.; CYWINSKA, A.; CZOPOWICZ, M.; WITKOWSKI, L.; SZARSKA, E.; WINNICKA, A. Post-exercise dynamics of serum amyloid A blood concentration in thoroughbred horses classified as injured and non-injured after the race. **Research in Veterinary Science**, London, v. 100, p. 223-225, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.04.008>>.

TURLO, A.; CYWINSKA, A.; CZOPOWICZ, M.; WITKOWSKI, L.; NIEDZWIEDZ, A.; STOWIKOWSKA, M.; BOROWICZ, H.; JASKIEWICZ, A.; WINNICKA, A. The effect of different types of musculoskeletal injuries on blood concentration of serum amyloid A in Thoroughbred Racehorses. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-10, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140673>>.

VALLE, E.; ZANATTA, R.; ODETTI, P.; TRAVERSO, N.; FURFARO, A.; BERGERO, D.; BADINO, P.; GIRARDI, C.; MINISCALCO, B.; BERGAGNS, S.; TARANTOLA, M.; INTORRE, L.; ODORE, R. Effects of competition on acute phase proteins and lymphocyte subpopulations – oxidative stress markers in eventing horses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, New Jersey, v. 99, p. 856-863, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12289>>.

VAN ERCK-WESTERGREN, E.; FRANKLIN, S. H.; BAYLY, W. M. Respiratory diseases and their effects on respiratory function and exercise capacity. **Equine Veterinary Journal**, Malden, v. 45, n. 3, p. 376-387, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/evj.12028>>.

WEST, J. B. Pulmonary capillary stress failure. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 89, n. 6, p. 2483-2489, 2000.

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

WESTERMAN, T. L.; TORNQUIST, S. J.; FOSTER, C. M.; POULSEN, K. P. Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 76, n. 10, p. 882-888, 2015.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises da proteína amiloide A sérica realizadas pelo ensaio imunoenzimático pela técnica de ELISA indireto (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando-se um kit comercial demonstrou ser um método rápido, preciso, seguro e de fácil exequibilidade, porém de custo bastante elevado.

Diante do exposto, este trabalho deve ser analisado com bastante cautela e ser considerado como um estudo inicial em virtude da possibilidade de outros fatores interferirem com os resultados das análises da proteína sérica amiloide A e não somente a hemorragia pulmonar induzida por exercício como se acreditava anteriormente.

É de suma importância averiguar o real potencial dessa doença em determinar uma resposta de fase aguda com consequente resposta de diversas proteínas de fase aguda e não somente da amiloide A sérica.

Embora a furosemida em equinos seja vastamente estudada desde 1976 e a sua primeira avaliação de uso como tratamento para HPIE tenha sido relatada em 1981, o exato mecanismo pelo qual este fármaco atua de forma a reduzir a gravidade da hemorragia pulmonar induzida por exercício ainda não foi devidamente elucidado, sendo necessários mais estudos para o correto esclarecimento dessas questões.