

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA TROMBOELASTOMETRIA (ROTEM[®] Delta) EM CAVALOS
DE TURFE DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS COM HEMORRAGIA
PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO

MAURÍCIO ORLANDO WILMSEN

BOTUCATU, SP.

FEVEREIRO/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA TROMBOELASTOMETRIA (ROTEM® Delta) EM CAVALOS
DE TURFE DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS COM HEMORRAGIA
PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO

MAURÍCIO ORLANDO WILMSEN

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Adj. Regina Kiomi
Takahira.

BOTUCATU, SP.

FEVEREIRO/2018.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

W743a Wilmsen, Maurício Orlando, 1983-
Avaliação da tromboelastometria (Rotem®Delta) em cavalos de turfe da raça puro sangue inglês com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício / Maurício Orlando Wilmsen. - Botucatu : [s.n.], 2018
180 f.: il., color., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018
Orientador: Regina Kiomi Takahira
Inclui bibliografia

1. Cavalos de corrida. 2. Hemostasia. 3. Hemorragia pulmonar induzida por exercício. I. Takahira, Regina Kiomi. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia III. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

Nome: Maurício Orlando Wilmsen

Título: AVALIAÇÃO DA TROMBOELASTOMETRIA (ROTEM[®] Delta) EM CAVALOS DE TURFE DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS COM HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO

Autor: Maurício Orlando Wilmsen

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª Drª Regina Kiomi Takahira

Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Profª Dr. Marcos Jun Watanabe

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária.
FMVZ-UNESP-Botucatu

Profª Dr. Raimundo Souza Lopes

Membro

Departamento de Clínica Veterinária.
FMVZ-UNESP-Botucatu

Profª Dra Danieli Brolo Martins

Membro

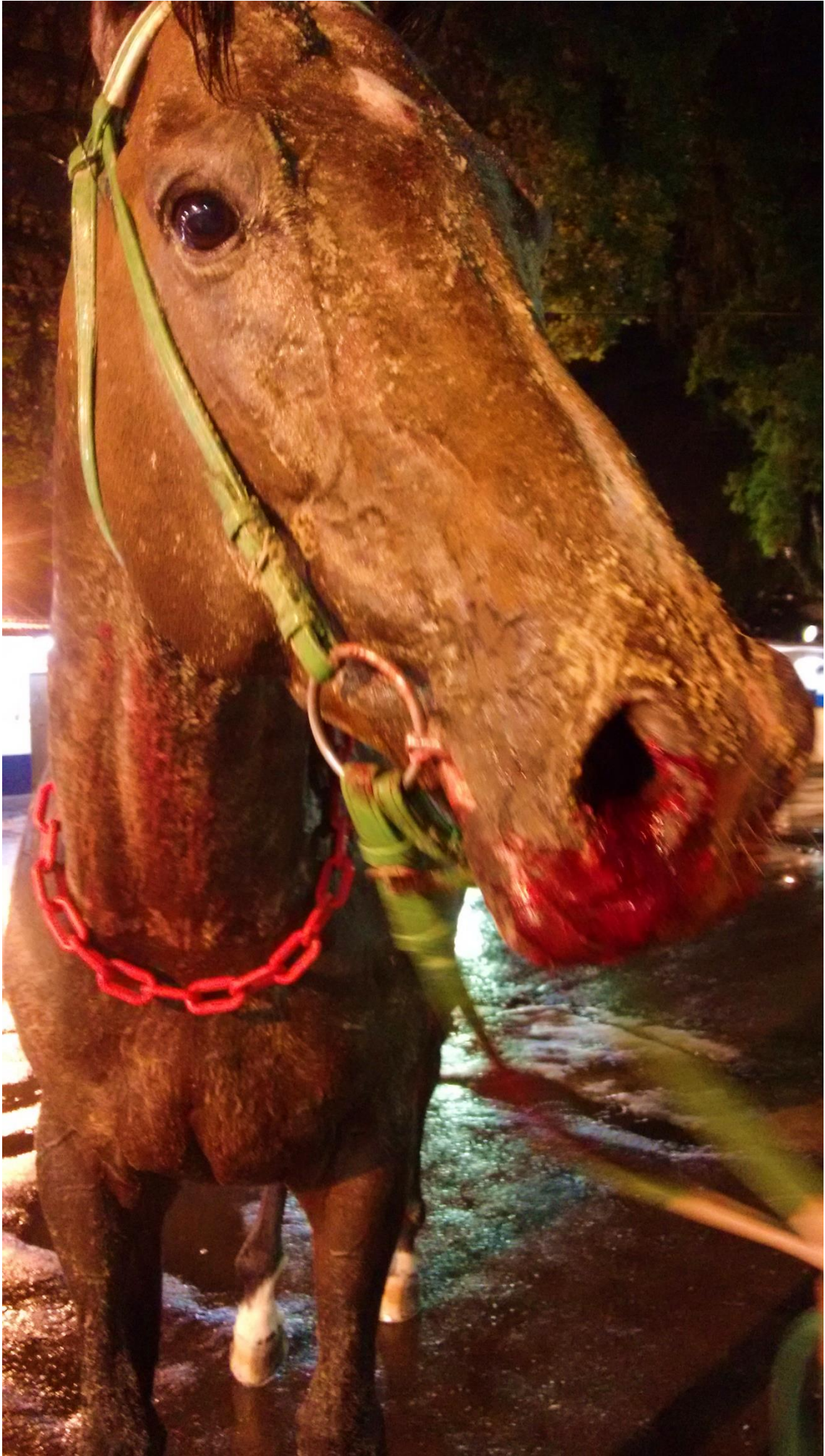
Patologia Clínica – UFG – Campus Samambaia – Goiânia – GO.

Profª Dra Alessandra Kataoka

Membro

Patologia Clínica – UFMT – Campus Sinop – Mato Grosso – MT.

Data da defesa: 27 de fevereiro de 2018.



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que fazem da sua rotina uma luta incansável em prol da vida dos animais. Aos que não ignoram a violência física ou verbal, a indiferença e aos que lutam pelo respeito, espaço e pela vida de quem não fala.

Todos os animais merecem respeito!

AGRADECIMENTOS

Que fiquem eternizados neste documento os caminhos que construíram sentidos, desespero e sorrisos. Remerceo também, a importância daqueles que me fizeram entender que, por mais difícil que tenha sido, estar sozinho também é sinônimo de possibilidade.

Aos 41 cavalos que participaram deste estudo e me permitiram mediar alternativas capazes de prolongar sua vida como atletas.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

À minha orientadora Professora Dra. Regina Takahira, por me permitir compor uma grande equipe de trabalho. Regracio os breves encontros, os momentos de fatura e confraternização, as explicações, as coletas de sangue e as aulas noturnas.

Aos Professores presentes na minha banca Professora Dra. Alessandra Kataoka, Professora Dra. Danieli Brolo Martins, Professor Dr. Raimundo Souza Lopes e Professor Dr. Marcos Jun Watanabe pela contribuição científica e pessoal.

Agradeço ao Jockey Club Brasileiro, em nome de Juliana Vieira Inglez, Tiago Rafael Miglio e toda equipe do Hospital Octávio Duponto (H.O.D) e do VETCOR, pela estrutura e auxílio oferecidos durante todo o período experimental.

Aos responsáveis pelo laboratório de Patologia clínica do Jockey Club Brasileiro pelo espaço cedido, disponibilidade de horários e principalmente pela confiança.

Aos Cavalariços, Funcionários do setor administrativo, Jóqueis, Joquetas, Médicos Veterinários, Residentes do H.O.D, porteiros, proprietários e treinadores

À minha família. Em especial a minha Mãe, Ana Wilmsen.

À Amarela, pelos sorrisos e abraços que me construíram. "...quando eu puxei a medicação, respiramos juntos, eu continuei chorando e ela dormiu."

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP-Botucatu, pela formação concedida.

Ao Banco de sangue canino da FMVZ-UNESP/Botucatu.

Às grandes mulheres que me ensinaram a ser um homem melhor.

Aos moradores da República Palacete Assobradado pelos grandiosos e saudosos dias.

Aos três anos de Cursinho da FMVZ.

Aos Pós graduandos, Residentes e técnicos deste laboratório.

Aos funcionários do setor técnico de Pós Graduação desta Universidade.

Ao céu, ao vento e a lua de Botucatu.

Aos grandes amores, inclusive aos que passaram rápido.

Ao respeito que eu aprendi a ter comigo mesmo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de coagulação, síntese e meia vida plásmatica..... 57

Tabela 2 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% do grau de sangramento pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE não tratados (GC) ou tratados com furosemida (n=26)..... 174

Tabela 3 - Distribuição de médias e desvio padrão das variáveis tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), Ângulo α ($A^\circ \alpha$), firmeza máxima do coágulo (MCF) e lise máxima (ML) obtidos através da avaliação da tromboelastometria (ROTEM® Delta). 175

Tabela 4 - Distribuição das Medianas e percentis 25 e 75% das variáveis tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), Ângulo α ($A^\circ \alpha$), firmeza máxima do coágulo (MCF) e lise máxima (ML) obtidos através da avaliação da tromboelastometria (ROTEM® Delta) pós exercício nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26). 176

Tabela 5 - Distribuição de média e desvio padrão de hemácias pré e pós exercício em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26)..... 177

Tabela 6 - Distribuição de média e desvio padrão do hematócrito pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26)..... 177

Tabela 7 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% de proteína total sérica (PTS) pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26)..... 177

Tabela 8 - Distribuição de média e desvio padrão para contagem de plaquetas pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26). 178

Tabela 9 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% dos testes de hemostasia obtidos através de coagulometria para TP (tempo de protrombina), TTPa (tempo de tromboplastina parcial ativada) e fibrinogênio pré exercício nos grupos controle (GC) e 178

Tabela 10 - Distribuição de média e desvio padrão das variáveis obtidas através de coagulometria para TP (tempo de protrombina), TTPa (tempo de tromboplastina parcial ativada) e fibrinogênio pós exercício nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26). 179

Tabela 11 - Distribuição de média e desvio padrão do exame bioquímico (ureia, creatinina, FA, GGT e albumina) pós exercício em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26). 179

Tabela 12 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% dos exames bioquímicos (ALT, AST e PTS) pós exercício em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26). 180

Tabela 13 - Distribuição de média e desvio padrão do lactato plasmático pré (0), imediatamente após (i) e 30 minutos pós exercício (ii), em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26). 180

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Avaliação pela tromboelastometria (ROTEM® Delta) realizado em sangue total citratado. Na figura a variáveis CT (Clotting time): tempo de coagulação; CFT (Clot formation time): tempo de formação do coágulo; $A^\circ \alpha$ (α angle): ângulo alfa e MCF(Maximum Clot firmness): firmeza máxima do coágulo. 64
- Figura 2** - Avaliação do sistema cardiorespiratório pós corrida. 166
- Figura 3** - Realização do exame traqueobrônquico, com visualização da bifurcação da traqueia (carina) pré exercício. Animal sem alterações visíveis, mucosa normocorada e sem presença de muco..... 167
- Figura 4** - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício pós corrida. Presença de traços de sangue no lúmen traqueal (seta), compatível com HPIE grau I. 168
- Figura 5** - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício pós corrida. Presença de filetes de sangue no lúmen traqueal (seta), compatível com HPIE grau II. 169
- Figura 6** - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, pós corrida. Presença de de sangue em todo lumém tranqueal (seta), compatível com HPIE grau III..... 170
- Figura 7** - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício pós corrida. Presença de quantidade abundante de sangue em todo lúmen traqueal (seta), compatível com HPIE grau IV. 171
- Figura 8** - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, com manifestação de epistaxe pós corrida. Na imagem, presença de grande

quantidade de sangue visualizada em região de glote (seta), compatível com HPIE grau V. 172

Figura 9 - Avaliação do sistema hemostático utilizando o aparelho de tromboelastometria (ROTEM® Delta). Na imagem, a formação dos gráficos obtidos através da avaliação das três principais vias da coagulação extrínseca (exTEM), intrínseca (inTEM) e fibrinolítica (fibTEM)..... 173

LISTA DE ABREVIATURAS

> - Maior

< - Menor

$\geq$ - Maior ou igual

$\leq$ - Menor ou igual

% - Por cento

μL - Microlitros

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

$\text{A}^{\circ}\alpha$ – Ângulo alfa

ADP – Adenosina difosfato

ALT – Alamina transferase

ATP – Adenosina trifosfato

BPM - Batimentos por minuto

CFT – Tempo de formação do coágulo

CID – Coagulação intravascular disseminada

CK – Creatino quinase

CNC – Cômite nacional de corridas

COX - Citocromo oxidase

CT – Tempo de coagulação

DIVA – Doença inflamatória das vias respiratórias

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético

ET – Endotelina

exTEM®: Avaliação da via estrínseca (ROTEM®Delta) – ativador tecidual

FA – Fosfatase alcalina

Fb - Fibrinogênio

FC – Frequência cardíaca

FCEV – Fator de crescimento endotelial vascular

Fcmáx – Frequência cardíaca máxima

fibTEM®: Avaliação da fibrinólise (ROTEM®Delta) – fator tecidual (exTEM®) +
Citocalasina D

FR – Frequência respiratória

FT – Fator tecidual

FvW - Fator de von Willebrand

GGT – Gama glutamil transferase

HIF – Fator indutor da hipóxia

HPIE – Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício

Ht – Hematócrito

ILC – Interleucina

inTEM®: Avaliação da via intrínseca (ROTEM®Delta) – Ativador de contato

IV – Intra vascular

JCB – Joquey Club Brasileiro

Kg – quilos

LBA – Lavado broncoalveolar

LDH – Lactato desidrogenase

LM – Lise máxima

m - Metros

MCF – Firmeza máxima do coágulo

mg/kg – Miligramas por quilo

mL – Mililitro

mmHg – Milímetros de mercúrio

m/s – Metros por segundo

NO – Óxido nítrico

ORVA – Obstrução recorrente das vias aéreas

PAP – Pressão arterial pulmonar

PAF - Fator ativador plaquetário

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

PDF's – Produtos da degradação da fibrina

PFA – Proteína de fase aguda

PGI2 - Prostaciclina

PSI – Puro sangue inglês

PT – Proteína total

SAA – Amilóide A sérico

TxA2 - Tromboxano A₂

TFPI – Fator inibidor tissular

TNF -Fator de necrose tumoral

TEG - Tromboelastografia

TEM - Tromboelastometria

TP – Tempo de protrombina

TPC – Tempo de preenchimento capilar

TR – Temperatura retal

TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TT – Tempo de trombina

U\$ - Dólares

uPA - Uroquinase

VO₂MAX – Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	23
2.JUSTIFICATIVA.....	30
3. REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1 Cavalo Puro Sangue Inglês.....	33
3.2 Fisiologia do exercício	34
3.3 Alterações laboratoriais	39
3.4 Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE).....	43
3.5 Fisiopatogenia	45
3.6 Fatores de risco.....	47
3.7 Diagnóstico.....	51
3.8 Tratamento	53
3.8.1 Uso da Furosemida.....	53
3.9 Hemostasia	56
3.9.1 Interação entre endotélio vascular e a cascata da coagulação	57
3.9.2 Hemostasia primária	59
3.9.3 Hemostasia secundária	61
3.9.4 Hemostasia terciária	62
3.10 Tromboelastometria (TEM).....	63
3.11 Hemoparasitoses: impacto no sistema hemostático	67
4. REFERÊNCIAS.....	69
5. OBJETIVOS.....	88
5.1 Objetivos gerais	88
5.2 Objetivos específicos	88
6. MATERIAL E MÉTODOS	90
6.1 Comitê de ética	90
6.2 Seleção dos animais	90

6.3 Delineamento experimental.....	91
6.4 Das corridas	92
6.5 Avaliação dos animais.....	92
6.6.1 Avaliação específica do trato respiratório	93
6.6 Avaliação endoscópica do trato respiratório.....	93
6.7 Colheita das amostras de sangue	94
6.8 Exames laboratoriais	95
6.8.1 Hemograma	95
6.8.2 Avaliação de bioquímica sérica	95
6.8.3 Contagem de plaquetas.....	95
6.9 Testes de hemostasia	95
6.9.1 Tromboelastometria	96
6.9.2 Coagulograma	96
6.10 Lactato plasmático	97
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	98
8. RESULTADOS.....	100
9. DISCUSSÃO	105
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
11. REFERÊNCIAS.....	116
12. ARTIGOS CIENTÍFICOS	119
13. ANEXOS	166

RESUMO

A hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) é uma das principais pneumopatias que acometem o trato respiratório de equinos atletas do turfe. Tendo em vista a média de participação desses animais em provas, e possivelmente o estabelecimento de lesões crônicas, as alterações de remodelamento em paredes brônquicas e parênquima pulmonar favorecem a fibrose e comprometem, através da ativação excessiva e persistente, o sistema hemostático. Este trabalho teve objetivo avaliar o perfil hemostático e os possíveis quadros de hipo ou hipercoagulabilidade em cavalos atletas do turfe com HPIE. Assim, foram selecionados 26 cavalos, da raça Puro Sangue Inglês em campanha no Jockey Club Brasileiro (JCB) do Rio de Janeiro, avaliados em dois momentos, pré e pós exercício extenuante e com e sem o uso de furosemida. Os animais com HPIE foram divididos em dois grupos, grupo controle (GC) e grupo furosemida (GF), os animais do GF receberam a medicação quatro horas antes do páreo (250mg/kg/IV). As amostras de sangue para realização da tromboelastometria (TEM), hemograma, análise bioquímica, lactato plásmático, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e concentração de fibrinogênio foram coletadas em dois momentos para ambos os grupos, pré e pós prova. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com a distribuição das variáveis ao nível de 5% de significância. Todos os animais deste estudo apresentaram HPIE, diagnosticados através de endoscopia óptica flexível. Os resultados inerentes ao estudo demonstraram um perfil de hipocoagulabilidade sanguínea após o páreo. As principais variações na TEM aconteceram nos três testes inTEM, exTEM e fibTEM, com alterações nas variáveis tempo de coagulação (CT), formação máxima do coágulo (MCF) e ângulo alfa ($A^\circ\alpha$) aumentados. O TTPa ($p=0,04$) foi maior no grupo controle no pré exercício enquanto TP e fibrinogênio ($p<0,001$) no pós exercício. O número de plaquetas pós corrida foi menor quando comparado ao pré exercício ($p<0,001$). A interpretação conjunta dos resultados permite concluir que cavalos com HPIE possuem uma predisposição ao risco hemorrágico devido ao quadro de hipocoagulação verificado através da TEM.

Palavras chave: Hipocoagulabilidade, Hiperfibrinólise, Hemostasia, Cavalo sangrador, Furosemida.

ABSTRACT

Exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) is one of the leading pneumopathies affecting the respiratory tract of turf equine athletes. Considering the average participation of these animals in tests, and possibly the establishment of chronic lesions, remodeling alterations in bronchial walls and pulmonary parenchyma favor fibrosis and compromise, through excessive and persistent activation, the balance of the hemostatic system. This study had the objective of evaluating the changes in the hemostatic profile and the possible hypo or hypercoagulability of horses in the turf with EIPH. Therefore, 26 Standerbread horses were selected at the Brazilian Joquey Club (JCB) in Rio de Janeiro, evaluated at two moments, pre and post strenuous exercise and with and without the use of furosemide. The animals with EIPH were divided into two groups, control group (CG) and furosemide group (GF), the animals of GF received the medication four hours before the pareo (250mg / kg / IV). Blood samples for thromboelastometry (TEM), blood count, biochemical analysis, plasma lactate, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT) and fibrinogen concentration (Fib) were collected at two times for both groups, pre and post test. The Statistical analyzes were performed according to the distribution of variables at the 5% level of significance. All the animals in this study presented HPIE, diagnosed through flexible optic endoscopy. The results inherent to the study demonstrated a profile of blood hypocoagulability after the pareo. The major alterations were observed in three inTEM, exTEM and fibTEM tests, with main alterations in the variable increased coagulation time (CT), maximum clot formation (MCF) and alfa angle ($A^\circ\alpha$). The aPTT ($p = 0.04$) was higher in the pre-exercise control group while PT and fibrinogen ($p < 0.001$). The number of platelets post race was lower when compared to pre exercise ($p < 0,001$). The interpretation of all the results allows to conclude that horses with EIPH have a predisposition to the hemorrhagic risk due to the hypocoagulation picture verified through TEM.

Key words: Hipocoagulability, Hiperfibrinolysis, Hemostasis, Bleeding horses Furosemide.

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

A equinocultura desempenha um papel significativo na atividade econômica de vários países. O Brasil ocupa a quarta posição entre os maiores criadores de cavalos do mundo, com um rebanho de aproximadamente 5,9 milhões de animais, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (10,5 milhões), China (6,7 milhões) e México (6 milhões) (FAO, 2011).

A criação desses animais gera um impacto positivo dentro da atividade, quando levados em consideração a geração direta e indireta de empregos e fonte de renda. Segundo Pereira et al., (2015), o mercado crescente de equinos no Brasil contribui significativamente com agronegócio. Além disso, tem capacidade de criar uma nova vaga de emprego há cada dois novos animais comercialmente ativos.

Um dos seguimentos considerado destaque dentro desse cenário, e que está em constante crescimento, é o esporte equestre. Dentre eles, o turfe, conhecido também como esporte que realiza corrida de cavalos e tem como objetivo, além da geração de lucro, a produção e seleção de cavalos da raça Puro Sangue Inglês (PSI). Os mesmos são considerados como animais com maior habilidade/aptidão na prática de corrida de cavalos (LOBRONICI, 2016).

Embora a seleção de animais corredores permaneça baseada majoritariamente em caracteres de morfologia, outras características que envolvem aspectos reprodutivos podem determinar através do histórico de vitórias de pais ou irmãos, o desempenho desse animal em pista. Mesmo que a seleção de cavalos corredores ainda esteja muito longe de realmente eleger animais aptos a tal exercício, é fundamental minimizar em sua totalidade os danos produzidos pela intensidade do exercício ao longo do tempo (PICCIONE et al., 2010).

Desta forma, mesmo que o fenótipo seja favorável, e que algumas características tenham sido melhoradas ao longo do tempo, submeter esses animais às corridas, não quer dizer que os mesmos irão reproduzir fisiologicamente as vitórias esperadas. A inserção desses animais no turfe, pode acarretar em danos à saúde e ao bem estar, além de comprometer bilhões de reais que são injetados na atividade em busca de resultados positivos (HINCHCLIFF, 2000).

O melhoramento genético pode contribuir na resolução de alguns problemas genéticos. Durante quatro séculos a raça foi impulsionada para a massante seleção artificial, induzindo alterações fenotípicas estruturais e funcionais que contribuem atualmente no desempenho atlético desses animais. Como resultado da seleção, a raça se adequou a uma gama de características fisiológicas extremas que permitem que tanto a atividade aeróbica quanto a anaeróbica sejam exploradas intensamente (NAGAHISA et al., 2017).

A capacidade de absorção máxima de oxigênio (VO_{2max}), nesta raça é superior a 0,200 mL de oxigênio/kg/minuto e está relacionada às adaptações de volume comportadas pelos pulmões. Além disso, uma acentuada capacidade cardiovascular permite a realização de atividade física de alta intensidade, sem que maiores danos sejam causados. (GU et al., 2009).

As doenças do trato respiratório, comumente associadas à cavalos atletas, são capazes de gerar grandes impactos na carreira e na saúde desses animais. Tais patologias afetam a performance durante toda a carreira atlética e a extensão das lesões tendem a cronificar com o passar do tempo. Fica evidente nesse contexto, que futuros estudos envolvendo sequenciamento genético podem reduzir a exposição a determinadas limitações. Segundo Derksen & Robson (2002), as principais doenças que acometem trato respiratório dos equinos são a obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA), doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) e a hemorragia pulmonar induzida pelo exercício.

A HPIE é comumente visualizada através de quadros clássicos de sangramento com origem pulmonar. Sabe-se que a gravidade da condição está relacionada ao grau de sangramento manifestado, que pode variar desde o mais brando (grau 1) até o mais severo (grau 5), com manifestação de epistaxe durante/após corrida. O quadro é depreciativo para a carreira do animal e pode interferir diretamente no desempenho atlético durante cada prova (CRISPE et al., 2017; HINCHCLIFF et al., 2015).

São escassos os estudos que avaliam distúrbios hemorrágicos envolvendo plaquetas, coagulação e fibrinólise em cavalos atletas. Alguns autores indicam que o sistema hemostático pode ser facilmente abalado nessa patologia durante e após a prova (PICCIONE et al., 2005, LIPPI e MAFFULLI, 2009, PICCIONE et al., 2010, GIORDANO et al., 2010).

É necessário entender que estudos baseados na hemostasia podem alavancar ou fornecer dados importantes para que novas condutas clínicas sejam assumidas, pensando na manutenção da higidez desses animais. A hemostasia compreende uma sequência de eventos fisiológicos complexos capazes de auxiliar na manutenção do estado de fluidez do sangue, seja através da remoção do coágulo no interior do vaso ou ainda pela interrupção do sangramento. Esses eventos se estabelecem frente a uma lesão vascular. Assim, a interação simultânea entre os elementos que participam da coagulação, plaquetas, vasos sanguíneos, proteínas e outros tipos celulares, atuam de forma conjunta para a fim de cessar a hemorragia e eliminar o coágulo do espaço intravascular (ASSENZA et al., 2013; VERSTEEG et al., 2013).

Qualquer falha intrínseca ao sistema hemostático pode acarretar em quadros severos de hemorragia e/ou trombose, o que evidencia a importância de identificar e limitar o consumo de fatores de coagulação, plaquetas ou ainda identificar possíveis agentes responsáveis pela lesão endotelial, para que se possa agir rapidamente afim de evitar a propagação de trombos para áreas saudáveis (EPSTEIN, 2014).

A modelagem diagnóstica clássica para testes de hemostasia, usa o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), tempo de trombina (TT) e o fibrinogênio como base para testes diagnósticos. Porém, os mesmos não avaliam maneira completa a função plaquetária, tendo em vista que as mesmas são inativadas em amostras congeladas e também os testes são realizados a temperatura de 37°C, o que nem sempre é uma verdade sobre o estado clínico do paciente (MCMICHAEL e SMITH, 2011, ASSENZA et al., 2013).

A fim de somar frente às questões diagnósticas, a tromboelastometria (TEM) assume um novo formato analítico capaz de integrar a ação de componentes do processo hemostático entre si e obter assim uma avaliação global de todo processo de coagulação, através da técnica realizada *in vitro*. Essa tecnologia fornece resultados acurados sobre o perfil hemostático de pacientes, e tanto para humanos quanto para animais, auxilia na compreensão dessas disfunções (LUDDINGTON, 2005).

As investigação de tais alterações em Medicina Veterinária vem ganhando mais espaço a cada dia. A tecnologia avalia o conjunto de componentes celulares

e de proteínas que estão envolvidas na cascata de coagulação com propósito de exibir um panorama geral da função hemostática. A mesma pode subsidiar a identificação de coagulopatias como coagulação intravascular disseminada (CID) e estados de hipo e/ou hipercoaguabilidade, na ausência de manifestações clínicas (PETERSEN et al., 2004; KOL e BORJESSON, 2010).

O princípio da técnica da TEM é detectar alterações hemostáticas através de alterações ópticas que são monitoradas através de pino submerso em sangue total citratado. As informações observadas após o período de formação de fibrina, em que a oscilação do copo pino reduz, é convertida através da impedância de rotação para alterações da coagulação e posteriormente transformada em gráficos. As variáveis fornecidas pelo gráfico se referem a viscoelasticidade do sangue, tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), ângulo alfa ($A^\circ\alpha$), firmeza máxima do coágulo (MCF) e elise máxima (LM) (KOL e BORJESSON, 2010, (MCMICHAEL e SMITH, 2011). A técnica foi validada para monitoração hemostática em caninos (SMITH et al., 2010, BRUNO et al., 2015), equinos (KOL e BORJESSON, 2010, JUNGE et al., 2016) e felinos (MARSCHNER et al., 2010, MARLY-VOQUER et al., 2017).

Segundo Stokol et al., (2005) e Paltrinieri et al., (2008) é importante avaliar através da TEM o desempenho analítico de equinos tendo em vista que quando comparados à outras espécies, apresentam TP diminuído, TTPa aumentado e concentração de fibrinogênio aumentada. Além disso, sabe-se do aumento da atividade de factores I, II, V, e X. Os intervalos de referência para cada modalidade desportiva praticada por esses animais, inclusive de outras raças, variam conforme sua aptidão. Assim cavalos atletas do turfe, principalmente após o exercício, apresentam uma padrão diferente daqueles vistos em cavalos de sela por exemplo, e isso se deve provavelmente a intensidade requerida durante a prova, que no caso, cavalos de corrida apresentam hemoconcentração, por contração esplênica.

Muito além da preocupação apenas com os prejuízos econômicos gerados aos proprietários devido ao insucesso dos animais em pista, outros fatores importantes relacionados aos animais devem ser levados em consideração. A alta prevalência de HPIE em cavalos PSI e o impacto fisiológico que os mesmos sofrem além interferência no bem estar, devem ser discutidos amplamente para que novas medidas preventivas e/ou profiláticas sejam

readequadas em prol da sua carreira no turfe (MORLEY et al., 2015). Aproximadamente 80% desses animais, durante sua vida como atleta, apresentam episódios repetidos e muitas vezes acumulativos de HPIE (BIRKS et al., 2002).

Na tentativa de reduzir o sangramento, e mesmo sabendo que os fatores envolvidos em quadros de hemorragia pulmonar não estão elucidados, a furosemida é a droga mais utilizada para a prevenção ou no retardo da progressão das lesões pulmonares. Os resultados de pesquisas sobre os efeitos adversos e uso abusivo deste medicamento, indicam intensa desidratação e a ototoxicidade (WATSON, 2011).

Tendo em vista o impacto e a importância dos quadros hemorrágicos manifestados em cavalos com HPIE e também pela falta de informação a despeito dessa condição, o emprego de novas técnicas de diagnóstico poderiam favorecer o monitoramento do sangramento para além dos métodos já utilizados como técnicas endoscópicas, lavado broncoalveolar (LBA) ou até mesmo os laboratoriais (BIRKS et al., 2003).

Poucos estudos envolvendo hemostasia são verificados na espécie equina e, entre outros problemas que envolvem os métodos diagnósticos, a introdução de ferramentas como a TEM poderia oferecer novos horizontes aos estudos clínicos e laboratoriais. Em medicina humana, vários estudos já são guiados por esse tipo de tecnologia e contribuem na avaliação das possíveis alterações clínicas, não somente para pacientes transplantados, a monitoração de atletas maratonistas também já demonstrou o impacto sofrido pelo sistema hemostático em humanos praticantes de exercício extenuante (PENG & RHIND, 2016; SUCKER et al., 2010).

Como ainda se trata de uma nova área de estudos, Hanel et al., (2014) publicaram uma avaliação sistemática concluindo que todos os estudos envolvendo a TEM devem ser intensificados para que estados de hiper e hipocoaguabilidade, ou até mesmo para estabelecer valores de referências em diferentes espécies, sejam relatados. Também foi recomendado que os trabalhos devem ser acompanhados de valores de hematócrito, contagem de plaquetas e concentração de fibrinogênio para agregar informações aos dados da tromboelastometria.

A TEM se traduz em uma nova área diagnóstica no Brasil. Estudos envolvendo hemostasia em cavalos atletas com HPIE, devem ser explorados a fim de tentar evidenciar possíveis mecanismos a cerca dessa condição além do impacto do exercício no sistema hemostático de cavalos atletas. Sendo assim, evidencia-se a importância de um estudo envolvendo a avaliação da hemostasia através da TEM em equinos atletas do turfe com HPIE.

2.JUSTIFICATIVA

2.JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o baixo número de trabalhos científicos realizados na área de hemostasia, mais especificamente com o uso da tromboelastometria (TEM) em cavalos atletas no Brasil, o estudo foi baseado na tentativa de evidenciar possíveis mecanismos hemostáticos a cerca dessa enfermidade no Brasil. A HPIE é, na ordem das doenças respiratórias, a segunda causa capaz de reduzir significativamente o desempenho atlético desses animais. A doença é altamente prevalente e de alto impacto orgânico e econômico entre esses animais. É necessário, além de tentar evidenciar possíveis falhas no sistema hemostático, apresentar ao meio acadêmico-científico o comportamento da HPIE nesses animais, tendo em vista que poucos aparelhos estão disponíveis para avaliações em medicina veterinária no país.

A tromboelastometria se apresenta como uma ferramenta promissora para avaliação das possíveis complicações hemostáticas causadas pela HPIE, por meio da sua capacidade de avaliação do estado de hipo ou hipercoaguabilidade, além de poder ser empregada quando necessário ao monitoramento de animais em terapia. A aplicação desta técnica em associação aos demais testes de hemostasia torna-se uma importante contribuição ao estudo dos distúrbios hemostáticos em equinos no mundo.

As alterações hemostáticas têm sido reportadas em humanos que praticam exercício físico extenuante. O impacto agudo gerado no sistema hemostático desencadeia a ativação da coagulação, ativação da fibrinólise e um aumento no número e na atividade das plaquetas. Um estudo realizado por Sucker et al., (2009), no qual 33 atletas saudáveis foram avaliados no momento pré e pós maratona, apresentaram alterações hemostáticas significativas, o que demonstra a significância da sensibilidade que o ROTEM oferece em relação aos distúrbios hemostáticos induzidos pelo exercício.

Em contrapartida, as informações sobre a tromboelastometria rotacional em Medicina Veterinária começam a ganhar espaço a partir da expansão dessa tecnologia. As informações oferecidas através do emprego do ROTEM para cavalos atletas inferem que o exercício agudo induz uma hemoconcentração, que pode variar de discreta a moderada, e um quadro de hipocoagulabilidade em animais saudáveis. Cavalos atletas que apresentam sangramento por HPIE

podem apresentar quadros de hipercoagulabilidade em momentos pré e pós exercício . Esse evento não auxilia na elucidação da patogênese da doença tendo em vista que outros fatores podem estar envolvidos, como episódios hemorrágicos recentes antes das coletas ou hemorragias crônicas (recorrentes) dependendo da frequência de participação em provas, o que pode agravar as lesões nas paredes dos vasos. Portanto, as informações sobre quadros de hipo e hipercoagulabilidade ainda são conflitantes.

Uma avaliação sistemática de evidências publicada recentemente (Hanel et al., 2014) concluiu que todos os estudos que envolvem tromboelastometria devem ser relatados universalmente, pois há poucos trabalhos veterinários que auxiliam na caracterização de hipercoaguabilidade, bem como, hipocoaguabilidade, ou até mesmo estabelecer valores de referências para as diferentes espécies. Também foi recomendado que os trabalhos devem ser acompanhados dos valores de hematócrito, contagem de plaquetas e concentração de fibrinogênio para agregar informações aos dados da tromboelastometria.

Com isso, evidencia-se a importância deste estudo para auxiliar na elucidação das alterações hemostáticas em pacientes com HPIE, a fim de contribuir com a base de dados em pesquisas com tromboelastometria e ainda verificar as possíveis aplicações clínicas nesta enfermidade.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cavalo Puro Sangue Inglês

De origem Britânica, o turfe foi iniciado por volta do século XVII e até hoje é o esporte responsável em promover as corridas de cavalos. Em grande parte da história os equinos estão presentes junto à atividade humana desempenhando atividades importantes em batalhas, transporte, produção de alimento entre outras (DUREN, 2000). No entanto, com o advento das modalidades esportivas, os mesmos passaram a realizar exercício físico segundo suas aptidões e características raciais. No Brasil, o órgão responsável pelo fomento e regulamentação da atividade, é conhecido como Código Nacional de Corrida (CNC).

Os critérios de seleção para animais atletas não dependem apenas de suas características fenotípicas. A aptidão que o animal adquire para realizar tal exercício se relaciona também ao tipo de condicionamento/treinamento físico que recebe desde o início da carreira. O cavalo PSI possui competência para a execução de exercício físico como o turfe, sendo ele uma junção de aspectos morfométricos e fisiológicos, que quando submetidos à bons programas de treinamento, são capazes de executar provas com bom impulso, velocidade e plasticidade nos movimento (REZENDE et al., 2014).

A constituição muscular de um cavalo atleta pode atingir cerca de 55% de sua massa corporal, sendo a capacidade muscular um grande agente facilitador para realização de exercícios físicos de alta intensidade. A baixa porcentagem de gordura distribuída pelo corpo favorece processos bioquímicos e também desempenho em provas velocidade (MARTIN&NANKERVIS, 2002; KEARNS et al., 2002).

Outra característica importante para animais desta raça é o perímetro torácico, capaz de representar a capacidade respiratória do cavalo durante a prova. Assim, são considerados atletas de elite, tendo em vista que seu consumo máximo de oxigênio específico por quilo ($\dot{V}O_{2max}$) é duas vezes maior que a de um atletas humano, por exemplo (OHMURA et al., 2017).

Segundo Petry, et al., (2012), para cavalos esportistas, outros dois fatores importantes devem ser levados em consideração, peso e índice de carga. O peso

corporal pode ser categorizado de três maneiras, hipermétrico, quando superior à 550kg, eumétricos quando variam de 350 a 550kg (cavalos PSI), e hipométricos quando inferior a 350kg. O índice de carga determina o peso que o animal suporta sobre seu dorso durante a atividade física, a fim de minimizar os riscos de traumas por sobrepeso.

Segundo Valie et al., (2016), a resposta individual de cada animal frente ao exercício, respeitando seus limites, é capaz de fornecer informações importantes para a compreensão da fisiologia do exercício. As variações individuais de treinamento, perfis de atividade enzimática que podem caracterizar a atividade celular, estresse metabólico e lesão muscular, fornecem diferentes informações para cada raça, protocolo de treinamento e também para as diferentes modalidades de exercício.

3.2 Fisiologia do exercício

Estudos sobre a fisiologia do exercício tem sido decisivos no entendimento das respostas orgânicas de cavalos atletas. Muitos eventos fisiológicos passam a ocorrer a partir do rompimento da homeostase. Desta maneira, cavalos PSI atletas, que praticam atividade física extenuante de alta intensidade em curto espaço de tempo ($\geq 14m/s$), sofrem processos orgânicos adaptativos frente ao tipo exercício que executam (ARFUSO et al., 2016).

Os resultados positivos obtidos por esses animais apontam que aspectos como a eficiência na fosforilação oxidativa, capacidade pulmonar, resistência e manutenção da capacidade cardiovascular, modulação no processo de lesão muscular pela hipóxia e adaptação nos níveis de fibrinogênio durante as fases iniciais de treinamento. Todos esses componentes quando visualizados em conjunto demonstram o sucesso da raça frente ao seu desempenho em pista (NAGAHISA et al., 2017, FAZIO et al., 2015).

O músculo esquelético executa um papel muito importante na fisiologia do exercício, uma vez que naturalmente atua como um estoque de energia prontamente disponível para ser utilizada durante a prova (McGIVENEY et al., 2010). Segundo Ghosh et al., (2016), a contração e relaxamento do músculo durante a atividade física ocorrem através hidrólise do ATP, que é capaz de converter energia química em energia mecânica. As concentrações máximas de

glicogênio que encontram-se armazenadas na musculatura, ficam mais evidentes através da alta densidade mitocondrial e rigorosa atividade enzimática oxidativa (WILKIN et al., 2017). Os autores citam ainda que outros eventos estão envolvidos e co-participam da atividade de contração muscular, como regulação da pressão arterial, lesões induzidas pela prática do exercício e também adaptações envolvidas durante a fase de treinamento.

As principais características da musculatura consistem em uma notável plasticidade em responder a diferentes desafios ambientais, físicos e metabólicos durante o treino e o exercício (KIM et al., 2013). Baseado em estudos de genômica, as respostas coordenadas de estresse surgem através da base genética de cada animal.

As doenças subclínicas que envolvem músculo esquelético estão intimamente relacionadas ao desempenho de cavalos atletas (RICHARD et al., 2010; FRAIPOINT et al., 2011). Lesões em sistema muscular envolvem mediadores da inflamação como o amiloide A sérico (SAA), que frente a uma injúria aguda, podem aumentar de 10 a 1000 vezes em um curto período de tempo, caracterizando a intensidade do estresse fisiológico causado pelo exercício físico desenvolvido (PEPYS et al., 1989).

Segundo Castejón et al., (2007), a creatina quinase (CK), utilizada durante a respiração anaeróbica, é capaz de fornecer informações importantes para a avaliação de lesões musculares em equinos atletas. A CK desempenha um papel crucial no músculo, uma vez que torna o ATP disponível para realização da contração muscular através da fosforilação do ADP. Após o exercício físico, as dosagens podem exceder os valores de referência entre 4 a 6 vezes quando comparadas a um animal em repouso.

A concentração de lactato sérico é uma importante ferramenta utilizada para obter informações sobre os parâmetros clínicos, além de auxiliar nas informações necessárias para avaliar o condicionamento físico do cavalo atleta frente ao seu treinamento (LINDNER, 2000). A atividade de alta intensidade pode exigir de um animal atleta um gasto energético de até 50 vezes quando comparado a um animal em repouso. A energia obtida durante o exercício é proveniente de diferentes vias metabólicas através do consumo de moléculas de ATP pela via aeróbica a anaeróbica.

A glicólise aeróbica, ocorre na presença de oxigênio de modo que o piruvato entra no ciclo de Krebs e o mesmo é metabolizado até a formação de dióxido de carbono e água, capazes de gerar 38 ATPs para cada mol de glicose (LACOMBE et al., 2003).

A via anaeróbica, disponibiliza como principal fonte de energia durante o exercício glicogênio muscular. Essa via consegue manter animais em exercício intenso por pelo menos três minutos sem exceder a capacidade de redução e metabolização do lactato intracelular (LACOMBE et al., 2001). A biotransformação da enzima lactato desidrogenase (LDH) durante a fase de hipoxemia tecidual resulta na produção do ácido láctico, com um saldo final de 4 moléculas de ATP para cada mol de glicose utilizado. Para a formação do lactato é necessário que o ácido láctico sofra um tamponamento principalmente através do sistema bicarbonato para evitar quadros de acidose muscular, que acontecem quando a metabolização do lactato é excedida e há bioacumulação intracelular capaz de reverter inclusive no desempenho da performance atlética do animal (EATON, 1994; COUROUCÉ, 1998; MUNOZ et al., 1999; GOMIDE et al., 2006).

Outra fonte de obtenção de energia ocorre através da via anaeróbica alática. Essa via conta com a presença do sistema ATPfosfocreatina, que metabolicamente é a maneira mais rápida de obtenção de energia. Esse sistema se limita ao fornecimento rápido de energia que acontece somente no início do exercício, durando aproximadamente 5 segundos. O ATP utilizado aqui é o produto que deriva da catálise da enzima creatina cinase, que através do rompimento de uma ligação química entre o fósforo e a molécula de creatina, torna o fósforo livre para se ligar ao ADP, obtendo a partir dessa ligação o ATP (EATON et al., 1999; FONSECA et al., 2012). A concentração de lactato está relacionada à intensidade do exercício, e dessa maneira possibilita avaliar o sistema de produção energética mais utilizado durante a prova (DESMECHT et al., 1996).

A atividade física de alta intensidade e curta duração realizadas por cavalos atletas é uma prática comum e o aumento na performance é adquirido através de programas de treinamento. Estudos realizados por Davie et al., (2017) e Nagahisa et al., (2016), sugerem que a busca por novos métodos de treinamento com maior efetividade se tornou um campo apropriado de pesquisas tanto para humanos quanto equinos. De acordo com os autores, esses

treinamentos exigem que atletas atinjam de performance através de um treinamento que preconiza o exercício a partir do estresse metabólico unido à condição de hipóxia, que acontece concomitantemente. Em um estudo no qual humanos foram submetidos a esse tipo de treinamento, as respostas aconteceram de maneira adaptativa, sendo que a menor disponibilização de oxigênio para as células demonstrou que o músculo esquelético responde aos processos de adaptação de forma positiva quando expostos à desafios como altitude, por exemplo (HOPPELER et al., 2008).

Além de ser viável para atletas que praticam exercício de resistência, esse treinamento também amplifica o desempenho de atletas em provas de curta duração (FAISS et al., 2013). A hipóxia é um importante evento regulador de vários estímulos fisiológicos que participam de alterações funcionais no músculo esquelético tanto de homens quanto de cavalos (AMELN et al., 2005).

A nível celular, estudos apontam que o principal receptor sensibilizado durante a fase hipoxêmica é conhecido como fator indutor da hipóxia alfa 1 (HIF-1 α) que possui um papel importante frente a adaptação estrutural e metabólica. Assim, a estimulação da angiogênese ocorre através da sensibilização do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), e através de células satélites, que também atenuam grandes danos na musculatura e ainda reparam o comprometimento de capilares (CHRISTOV et al., 2007; FAVIER et al., 2015). Quando sensibilizado, o fator HIF α -1 α , atua sobre a regulação de enzimas oxidativas, como por exemplo a COX4 (citocromo oxidase, subunidade 4), que possui duas isoformas, COX4-1 (COX4I1) e COX4-2 (COX4I2). As trocas de subunidades COX4, podem desta forma garantir a máxima eficiência da respiração sob diferentes condições de oxigenação (FUKUDA et al. 2007). Os autores inferem ainda que cavalos PSI atingem a hipoxemia grave quando se exercitam em VO₂max com tensão arterial de oxigênio inferior a 75 mmHg.

O sistema cardiovascular representa um dos principais parâmetros fisiológicos mensurados em equinos atletas (HARRIS et al., 2007). O tipo de exercício realizado por cada animal poderá ser caracterizado como leve ou moderado quando a frequência cardíaca é inferior a 150 bpm, submáximo (150-200 bpm) ou ainda como máximo ou extenuante (superior a 200 bpm). A FC cardíaca pode ser alterada por inúmeros fatores. Segundo McKeever&Hinchcliff (1995), para animais da raça PSI atletas do turfe, qualquer evento capaz de

sugerir o início de uma atividade física é capaz de alterar a FC em repouso (20-40 bpm) em até 100%, quando aferida imediatamente antes do início do exercício (EVANS, 2004; FERRAZ et al., 2009). Outro fator relevante para esta variável, é que o mesmo pode atingir 200 bpm em 30 segundos frente a um exercício alta intensidade. Segundo Evans, (2007), a FC orienta o grau de condicionamento físico de um animal através da frequência cardíaca máxima (FC_{máx}), que por sua vez é considerada também como uma característica individual ou genética de cada animal, sem ser induzida pelo treinamento. Enquanto, a velocidade que o animal pode atingir durante o exercício pode ser influenciada através do condicionamento ou treinamento (EVANS, 2004).

O aumento no débito cardíaco influencia também a contracção esplênica. Esse evento pode elevar em aproximadamente 10 vezes o nível de hemácias circulantes e serve como uma via fisiológica capaz de suprir a demanda de oxigênio durante a prova (HINCHCLIFF, 2000). Considerando avaliações cardiovasculares, Hiraga & Suzano (2010), realizaram um experimento que aferiu a pressão arterial em cavalos pré e pós exercício. A pressão arterial média aferida nos dois momentos do estudo foram de 156 mmHg e 238 mmHg, respectivamente. Após 1 e 3 horas do término do exercício 176 mmHg e 158 mmHg. Para Langstemo et al. (1999), a elevação da pressão arterial média, direita e esquerda, apresentam-se marcadamente superiores durante o exercício máximo, onde os valores verificados foram de aproximadamente 70 mmHg e 45 mmHg. Contudo, deve ser levada em consideração a sobrecarga da pressão no átrio direito, que influencia diretamente o aumento na pressão arterial pulmonar (PAP) e a pressão nos capilares pulmonares.

Parks & Manohar (1983), realizaram a primeira demonstração científica de que a PAP em equinos atletas durante o exercício aumenta em relação a valores de repouso. Fisiologicamente essas alterações ocorrem na tentativa de otimizar o influxo de sangue para os pulmões que por sua vez tentam suprir a elevada demanda de oxigênio durante a atividade física, que é substancialmente maior em equinos do que em outras espécies, devido ao grande volume de massa muscular recrutado para a realização do exercício (ERICKSON et al., 1990). Os primeiros estudos realizados a fim de demonstrar os valores de PAP para equinos em repouso, apontaram que a PAP sistólica e diastólica média, para atletas que correm ao nível do mar, são de 42 mmHg, 18 mmHg e 26 mmHg,

respectivamente (MILNE et al., 1975).

Magid et al., (2000) e Dias et al., (2013) ressaltam a importância na pesquisa da PAP em equinos atletas durante os três momentos, pré, durante e pós exercício, e que a utilização de técnicas seguras de aferição, como a implantação de catéter através da canulação do artéria pulmonar, podem servir como uma importante ferramenta contribuição de respostas fisiológicas que envolvem o exercício extenuante.

3.3 Alterações laboratoriais

Fisiologicamente a intensidade do exercício é a base para as principais alterações nos valores hematológicos obtidos após prova (KOWAL et al., 2006). A contração esplênica, que ocorre através da ação das catecolaminas, é responsável pela reinserção de hemácias na corrente sanguínea, e assume um papel importante na biodisponibilização de oxigênio para para os tecidos em hipoxemia (MANOHAR et al., 2001). A intensidade do exercício, interfere especificamente na demanda de oxigênio, o que faz com que o baço, órgão responsável por armazenar até 50% dos eritrócitos nesta espécie, passe a disponibilizar prontamente na circulação mais hemácias na tentativa de suprir a demanda de oxigênio (SANTIAGO et al., 2013). A partir do aumento da intensidade do exercício, a biodisponibilização de hemácias pela contração esplênica, é capaz de dobrar o hematócrito (Ht) com o consumo máximo de oxigênio, sendo que cavalos PSI em repouso possuem Ht entre 32 e 48%, e durante o exercício pode atingir aproximadamente 61% ou mais (LATIMER&MAHAFFEY, 1999; EVANS, 2000).

Um dos fatores mais importantes para que a capacidade aeróbica de cavalos durante a prova seja mantida ocorre através do aumento da capacidade de transporte de oxigênio, associado ao aumento no número de eritrócitos disponíveis na circulação e pelo aumento na concentração de hemoglobina. Por isso, é necessário entender que em determinado momento da atividade física, o cavalo começa ser prejudicado a nível de transporte de oxigênio pelo aumento da viscosidade do sangue, o que pode ser conhecido como redução da performance (EVANS et al., 1993).

A hemoglobina, uma proteína encontrada nas hemácias, tem duas funções principais: transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos que necessitam e transportar dióxido de carbono dos tecidos periféricos aos pulmões, para excreção. A quantidade de oxigênio que pode ser carreado pelo sangue está relacionado com o volume total de eritrócitos e concentração total de hemoglobina (ROSE&HODGSOND, 1994). Frente à exercícios de grande intensidade, uma maior quantidade de oxigênio deve ser liberado através da hemoglobina para atingir tecidos hipoperfundidos (GUYTON&HALL, 1996).

As principais alterações visualizadas no leucograma, assim como outras variáveis, também estão relacionadas à intensidade do exercício e podem sofrer aumento de 10 a 30% nos perfis celulares no pós exercício, e também pode servir como indicador de estresse de treinamento em cavalos de corridas (TYLER-McGOWAN, 1999). O exercício máximo provoca liberação de leucócitos sequestrados pelo baço e provenientes do pool marginal. Ocorre uma linfocitose transitória, que se estabiliza após algumas horas da realização do exercício, e também a diminuição da relação neutrófilos/linfócitos (KOWAL et al., 2006).

As proteínas plasmáticas totais (PPT) demonstram aumento na concentração durante o exercício de alta intensidade. Essa elevação reflete a compensação de fluídos dos vasos até os tecidos tornando o plasma ainda mais viscoso (TYLER-McGOWAN, 1999). A fase que compreende o deslocamento ou perda de fluídos pode estar relacionada com a duração e intensidade do exercício, por isso essa fase é reestabelecida em até 30 minutos depois da prova. O dimensionamento da perda de fluídos através da sudorese em equinos é reduzida e capaz de representar, em quilos, uma perda de aproximadamente 5 a 10 kg de peso corporal depois de uma corrida (KOWAL et al., 2006). Outras alterações bioquímicas que podem ocorrer após a prova estão relacionadas principalmente à perda de eletrólitos através do suor (MARLIN et al.,1995; WILLIAMSON et al.,1996).

O fibrinogênio (Fb) é considerado um marcador de inflamação na espécie equina. Contudo, uma vez estimulado, a resposta inflamatória dependente do Fb pode ser verificada por meses (CRISMAN et al.,2008). Além disso, o mesmo é sintetizado exclusivamente pelos hepatócitos e é uma glicoproteína que encontra-se solúvel no plasma. É um biomarcador positivo da inflamação e pode ser considerado uma proteína de fase aguda (PFA). Sua atividade é considerada

moderada, uma vez que as concentrações séricas podem dobrar em 24 horas e/ou aumentar em 10 vezes após 72 horas do início das lesões (CRISMAN et al.,2008). Várias PFA's estão envolvidas no processo inflamatório, tanto em animais quanto humanos (FALASCHINI&TROMBETTA,2001; FALLON et al.,2001). Sua estimulação ocorre através de mediadores conhecidos como citocinas, que atuam como sinalizadores para o recrutamento das PFA. A reação de fase aguda consiste em uma série de alterações fisiometabólicas imediatas que ocorrem contra uma injúria e o aumento da concentração plasmática pode servir como um importante biomarcador de lesão tecidual em equinos atletas (ECKERSAL&CONNER, 1988; MURATA et al.,2004).

Segundo Fazio et al.,(2015), em cavalos puro sangue, a resposta das concentrações de Fb foram significativamente maiores após 60 dias de treinamento quando comparados aos animais submetidos ao exercício físico por 40 dias. Os mesmos apresentavam os seus valores dentro dos intervalos de referência para cavalos saudáveis. Os autores referem ainda que o condicionamento físico para cavalos atletas é fundamental, tendo em vista que a resposta adaptativa ao treinamento é modulada após 80 dias do início do treinamento.

Desta forma, o comportamento do Fb, em cavalos atletas, está intimamente relacionado à intensidade de carga que o exercício demanda, tipo de pista, duração e percurso da prova (BHATTI &SHAIKH, 2007; FAZIO et al., 2015). Suas concentrações aumentam moderadamente frente ao estímulo inflamatório (MILLS et al.,1998; HULTÉN et al.,2002). Assim, animais em treinamento, necessitam de um tempo de adaptação para que a modulação da resposta inflamatória seja regulada.

O Fb desempenha também um importante papel na cascata da coagulação. A interação entre plaquetas, trombina e fibrinogênio caracterizam a formação da fibrina. Logo, qualquer problema relacionado à ligação do Fb às plaquetas, pode representar um potencial risco de sangramento na espécie. Embora os dados da literatura sejam inconclusivos, algumas pesquisas de longa data evidenciam que os níveis de degradação do fibrinogênio aumentam durante o exercício (MARSH&GAFFNEY,1980). O mesmo é evidenciado em humanos, onde as taxas de fibrinólise também estão relacionadas a intensidade do exercício (FERGUSON et al., 1987).

Segundo Piccione et al., (2014), o impacto no sistema hemostático está relacionado principalmente a atividade fibrinolítica quando comparado aos tempos de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Segundos os autores, a atividade fibrinolítica é amplificada pelos programas de treinamento em cavalos que praticam provas em distâncias de 1.600 à 2.000 metros.

Poucos estudos são realizados com base na fisiologia e a influência do exercício agudo no perfil hemostático de cavalos atletas. Muitos resultados apresentados na literatura são confusos e estão relacionados principalmente a erros cometidos durante o delineamento experimental. Dessa forma, os quadros de hipo e hipercoagulabilidade mencionados na literatura ainda são inconclusivos, tendo em vista que falhas no delineamento experimental também são rotineiramente cometidas. Sabe-se, por exemplo, que quadros de hipercoagulabilidade, acontecem principalmente devido ao aumento da trombina e da hiperatividade do sistema plaquetário, somado a um aumento nos fatores de coagulação VIII e o fator de von Willebrand (FvW) (LIPPI&MAFFULLI, 2009).

Em medicina humana, Alguns estudos relatam a capacidade do exercício gerar alterações no perfil de coagulação de atletas no pós exercício (RIBEIRO&OLIVEIRA, 2005). Os autores citam ainda que pessoas que praticam atividade física, diminuem a atividade trombogênica, através da redução da atividade coagulante e aumento da atividade fibrinolítica. Um estudo realizado por Sucker et al., (2009), no qual 33 atletas saudáveis foram avaliados no momento pré e pós maratona, apresentaram alterações hemostáticas significativas com quadros de hipercoagulabilidade, afirmando mais uma vez que a cascata de coagulação é afetada em atletas humanos que praticam exercício extenuante, resultando na ativação da coagulação, ativação da fibrinólise e um aumento no número e na atividade das plaquetas.

Segundo Thomassian et al., (2005), frente a imensa gama de respostas fisiológicas que são intrínsecas ao exercício, é necessário que os estudos realizados sejam avaliados através de processos rigorosos de padronização e controle, a fim de evitar que erros sejam inclusos ou atrelados às respostas geradas pelo exercício.

3.4 Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE)

A ocorrência de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício é uma importante causa clínica de sangramento em cavalos que realizam atividade física extenuante, durante e após o exercício em todo mundo (COOK, 1974; BIRKS et al., 2003; HINCHCLIFF et al., 2005; LANGFORD et al., 2013, SULLIVAN & HINCHCLIFF, 2015).

Até meados de 1950, acreditava-se que a HPIE poderia ser o resultado de uma série indevida e abusiva de medicações utilizadas com finalidade de melhorar a performance do animal. Essas drogas priorizavam alterações capazes de gerar um aumento da função cardiovascular e uma hiperestimulação endócrina. Ainda em 1970, animais atletas do turfe, considerado um esporte promissor e com alto potencial econômico, não contavam com métodos diagnósticos seguros e capazes de identificar animais com HPIE.

Segundo Cook (1974), a avaliação dos animais era realizada a partir de sinais clínicos pobres e nem sempre aparentes como tosse, excessivas deglutições após a prova, alteração na auscultação broncotraqueal e manifestação de epistaxe nos casos mais severos. Contudo, nem todos esses sinais são observados imediatamente após o exercício, e fora desse período, grande parte dos animais retornavam as baias sem qualquer tipo de acompanhamento tardio.

O aparelho respiratório é fundamental para a saúde e desempenho adequado de equinos ao longo de sua carreira esportiva. Portanto, patologias que acometem o sistema respiratório de cavalos atletas podem ser responsáveis por relevantes prejuízos orgânicos e econômicos (DONALDSON, 1991; MORLEY et al., 2015).

A HPIE ocupa uma posição de destaque dentro das enfermidades mais importantes do trato respiratório de equinos, sendo considerada a segunda maior causa de redução da performance física nesta espécie (OTAKA et al., 2014). Além dos equinos, cães da raça Greyhounh e Camelos de corrida também podem ser afetados pela HPIE (HARKINS & TOBIN, 1995).

Esse distúrbio não é uma exclusividade de cavalos PSI corredores do turfe. Assim, atividades físicas consideradas de alta intensidade ($\geq 14\text{m/s}$) e/ou curtíssima duração como Polo, Salto, Enduro e/ou Provas de 3 tambores também podem gerar quadros de sangramento pulmonar típicos de HPIE em

todas as raças de cavalos (PASCOE, 1995; SILVA et al., 2012; ERGUILLETTE et al., 2016).

É importante frisar que a alta prevalência dessa afecção não está relacionada apenas aos quadros que envolvem exclusivamente a manifestação de epistaxe, mas também às formas mais brandas da hemorragia que podem ser observadas em até 120 minutos após o exercício físico (DERKSEN & ROBSON, 2002). A explicação para tal fato se baseia na apresentação de diferentes graus de sangramento visualizados através do exame endoscópico ou ainda do lavado broncoalveolar.

Na tentativa de evidenciar a severidade dos episódios de sangramento, Pascoe et al., (1981) estabeleceram um escore que varia entre 1 e 5, sendo capaz de evidenciar, em ordem crescente, a gravidade do quadro hemorrágico. Logo, o grau I e menos severo é caracterizado por traços de sangue na traquéia, grau II: presença de filete de sangue na traquéia, grau III: presença de sangue na traquéia em quantidade superior ao grau anterior, grau IV: presença abundante com acúmulo de sangue na traquéia e grau V: epistaxe e presença de sangue abundante e acumulado na traquéia até a orofaringe.

O Código Nacional de Corridas, preconiza que os animais acometidos pelo grau de manifestação mais severa (V), além das implicações fisiologicamente significativas ao animal durante o páreo, sejam suspensos e se os quadros de sangramento persistirem, o animal seja desligado da carreira atlética. Na Austrália, as Regras de Corrida que regulamentam o turfe (AR53), concluem que animais com epistaxe devem ser afastados imediatamente após a manifestação desta condição. Assim, 53,8 % dos cavalos atletas na Austrália são desligados permanentemente da vivência esportiva com aproximadamente 2 anos de idade, enquanto no Brasil, quando asfatados, os animais já possuem lesões crônicas pelo tempo de aproximadamente 3 anos de carreira (COSTA & THOMASIAN, 2006).

As lesões que acometem cavalos de corrida durante e após treinamento ou prova, como a HPIE, afetam diretamente o bem-estar geral desses animais. Não deveriam ser levadas em consideração apenas lesões capazes de afastar temporariamente aqueles acometidos. É necessário assumir que para traumas de grande recorrência, como os que circundam essa condição, o afastamento permanente deveria ser encarado como a única medida curativa para cavalos

com HIPE que nutrem a indústria de corrida (DISON et al., 2008).

3.5 Fisiopatogenia

A despeito da etiologia da HIPE, sem sombra de dúvidas, um dos principais mecanismos sugeridos atualmente é o aumento da pressão arterial pulmonar (PAP) verificada durante o exercício de máxima intensidade (BIRKS et al., 1997; MEYER et al., 1998; DERKSEN & ROBSON, 2002; WIEDMANN et al., 2003; HINCHCLIFF et al., 2010; SULLIVAN&HINCHCLIFF, 2015).

Mesmo com diversos núcleos de pesquisas sobre HIPE, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda não estão completamente elucidados (PASCOE, 1995; MONOHAR et al., 2000; HINCHCLIFF et al., 2015). A teoria atualmente aceita é resultado de um avanço científico que envolve diversas áreas de pesquisa que trazem a tona pontos importantes a serem discutidos. Sendo assim, a presença de sangue livre na árvore traqueobrônquica oriundo dos pulmões dos cavalos durante e após o exercício físico extenuante, capaz de atingir vias aéreas superiores ou não, com possibilidade de externalizar o sangramento pelas narinas, caracteriza um quadro de HIPE (DOUCET&VIEL, 2002, NEWTON, et al., 2005).

Muito embora não seja possível individualizar apenas uma causa como agente principal, o aumento da pressão transmural resulta em uma falha ocorrida na tensão capilar e conseqüentemente um rompimento desses capilares com extravasamento de sangue para dentro dos espaços alveolares (WEST et al., 1993).

Quando combinados, os mecanismos fisiopatológicos resultam em uma falência de capilares pulmonares por estresse, causados pelo aumento exponencial da pressão transmural da vasculatura do pulmão. Essa instabilidade de capilares demarca um colapso hipertensivo na membrana alveolo-capilar que pode facilitar a passagem e extravasamento do sangue através da membrana e atingir a árvore traqueobrônquica (JONES, 2003). A força da instabilidade pulmonar gerada em animais durante o exercício transpõe uma diferença significativa entre a pressão de inspiração em repouso (5,3 mmHg) e durante o exercício (64 mmHg). A pressão inspiratória negativa contribui para que ocorra um aumento na pressão transmural e esta seja responsável por evidenciar a

falha por estresse na estrutura pulmonar de cavalos com HPIE (SULLIVAN & HINCHCLIFF, 2015).

A intensidade do exercício requer do animal uma velocidade muito alta desenvolvida em um curto espaço de tempo, o que gera um aumento no débito cardíaco, capaz de influenciar no aumento da pressão arterial e da vasculatura pulmonar (MANOHAR et al., 1999). Os valores fisiológicos de referência para equinos atletas em repouso é de aproximadamente 25 mmHg e durante o exercício, a uma velocidade média de 14 m/s, a pressão pode atingir variar de 75 a 100mmHg ou até mesmo superar esse valor. O aumento em quatro vezes pode contribuir com rompimento dos capilares alveolares (BIRKS et al., 1997). A regressão das lesões, ocorre rapidamente assim que a tensão superficial exercida durante o esforço físico diminui, consequentemente após a estabilização da barreira sangue-gás, voltando ao normal sequencialmente pós exercício (MANOHAR et al., 1997).

Padilla et al., (2006), investigaram a possível co-participação da endotelina-I (ET-I) na fisiopatologia da HPIE. Os autores inferiram que o peptídeo vasoconstritor, secretado por células do endotélio vascular, são capazes de modular a pressão dentro da circulação pulmonar de equinos e humanos (SCHMECT et al., 1999; KEDZIERSKI&YANAGISAWA, 2001). Sabe-se ainda que a ET-I está relacionada ao aumento da PAP, e por isso utilizaram no experimento um antagonista de ET-IA na tentativa de reduzir o desequilíbrio da pressão pulmonar e consequentemente a HPIE. Embora os efeitos da endotelina em equinos não tenham sido totalmente elucidados, estudos apontam que durante e depois do exercício máximo, as concentrações de ET-I no plasma encontram-se elevadas (McKEEVER et al., 2002). Os autores concluíram que o bloqueio dos receptores ET-IA não se mostrou capaz de reduzir o aumento da PAP no pulmão, e da mesma forma, não foi capaz de reduzir a ocorrência de HPIE nos cavalos desse experimento.

Sobre o atrito que ocorre entre pulmões e diafragma, é importante frisar que, percursos mais curtos sintetizam no animal, além de um estresse metabólico aumentado. A compressão crânio-dorsal exercida pelo diafragma contra a região dorso-caudal do pulmão, dando origem a um trauma mecânico favorecido pela velocidade atingida no início do páreo, sendo esse mais um fator que colabora com a síntese da HPIE (PIOTTO, 2006; TAKAHASHI et. al. 2001).

As principais alterações histológicas descritas por Derksen et al., (2011) sugerem que HPIE gera remodelamento oclusivo das veias pulmonares, através de alterações morfofuncionais pelo aumento no depósito de colágeno no endotélio vascular e consequentemente uma redução do lúmen alveolar. Essa remodelação é favorecida por condições procoagulantes, enquanto a fibrinólise atua sobre a remoção dos depósitos de fibrina alveolar e neutraliza a coagulação e a fibrose inicial. Barton et al., 2016, citam que após os defeitos mecânicos e inflamatórios, que destroem o endotélio capilar e em particular o epitélio alveolar, as proteínas plasmáticas transudam para o espaço alveolar e ativam a coagulação, sendo a fibrina o produto final. Isso faz parte do processo natural de reparo e serve como uma oclusão primária do defeito membranoso (GUINTER et al., 2000). Por outro lado, a coagulação excessiva e persistente pode gerar problemas, como no caso da deposição de fibrina e a formação de fibrose intersticial, que tem um impacto negativo na patogênese e na progressão de múltiplas doenças respiratórias (AKINNUSI&EISOHL, 2007).

O parenquima dos alvéolos, em região caudo-dorsal, está comprometido devido ao acúmulo de hemossiderina no endotélio vascular, há uma região de intensa angiogênese bronco-alveolar e ainda intensa fibrose do interstício alveolar, septo e pleura. A distribuição do fluxo sanguíneo em região caudo-dorsal dos pulmões em equinos da raça PSI é muito maior, o que poderia servir como explicação para as lesões supracitadas. Em humanos e cães, o maior aporte vascular é visualizado em região crânio-ventral do pulmão, o que explica a ausência do mesmo tipo de lesão (ERICKSON et al., 2000).

Os danos fisiopatológicos repetidos unidos à frequência de execução dos exercícios, certamente evidencia a cronicidade das lesões (HINCHCLIFF, 2000). As manifestações mais severas desta patologia podem resultar em quadros de morte súbita durante o exercício (BODEN et al., 2005).

3.6 Fatores de risco

Mesmo com muitos estudos realizados ao longo do tempo e que comprovaram que alguns fatores de risco são comuns e podem ser identificados entre HPIE e epistaxe, não necessariamente eles ocorram simultaneamente e/ou exclusivamente juntos (SULLIVAN&HINCHCLIFF, 2015).

As maiores prevalências envolvendo HPIE e epistaxe, apontam que essas duas condições estão mais presentes em animais pós exercício e se relacionam à alta velocidade e/ou intensidade que a prova demanda. Dessa forma, quadros de HPIE em cavalos do turfe, em virtude da velocidade atingida durante a prova, possuem uma prevalência maior quando comparados a animais de salto ou hipismo (COOK, 1974; NEWTON et al., 2005; SULLIVAN E HINCHCLIFF, 2015).

Exercícios que envolvem alta intensidade predispoem o “status” de sangramento, que poderá ser desenvolvido pelo menos uma vez ao longo da carreira atlética. Além disso, esse processo pode estar intimamente relacionado à variáveis como sexo, idade, distância, tipo de pista, clima e velocidade atingida pelo animal durante a prova (COSTA et al., 2004).

Estudos relacionados com variáveis de sexo e idade apontaram que a maior prevalência se concentra em garanhões quando comparados a éguas e machos castrados, mesmo os dois últimos sendo aposentados com idades inferiores aos garanhões (HINCHCLIFF et al., 2010). A idade é um importante fator de risco para HPIE, uma vez que as lesões crônicas podem favorecer os quadros hemorrágicos (NEWTON & WOOD, 2002; WIEDMANN et al., 2003; NEWTON et al., 2005; MORLEY et al., 2015).

Sullivan & Hinchcliff (2015) inferem que, na maioria dos trabalhos publicados, a avaliação de cada indivíduo frente à idade, não leva em consideração o número de corridas realizados por cada animal durante sua vida atlética, tempo de cada prova e quantos episódios de sangramento esse animal pode ter apresentado. Portanto, os fatores citados estão intimamente correlacionados ao tempo de exposição do animal àquele tipo de exercício.

Segundo Hinchcliff et al., (2015), longas distâncias não são fatores predisponentes para quadros de HPIE. Sabe-se que animais sangradores podem manifestar eventos de HPIE independente do percurso, exibindo sangramento até mesmo quando expostos ao galope.

Em um estudo de incidência feito por Scipioni et al., (2003), os autores verificaram que a manifestação de HPIE em cavalos PSI em distâncias de 1.000 à 1.200 metros foi de aproximadamente 48%, 1.400 e 1.800 metros de 47% e acima de 2.000 metros 5%, respectivamente. Isso exemplifica, que a distância percorrida pelo animal em uma prova, e os desafios estão mais relacionados com quadros de exaustão do que com a HPIE propriamente dita. Além disso, é

importante reforçar que esses animais, corredores de percursos maiores, estão inseridos em programas de treinamento que subsidiam seu terinamento físico para tais provas.

Lapoint & Vrins (1994) apontam que animais em início de carreira quando comparados aqueles com aproximadamente 50 competições realizadas, apresentam uma probabilidade duas vezes maior de diagnóstico de HPIE grau $\leq$ I enquanto cavalos que praticam a atividade há pelo menos dois anos estão mais propensos ao grau V com quadros de epistaxe.

Segundo Wiedman et al., (2003), em um estudo realizado na África do Sul, apontaram que a idade influencia a progressão das condições hemorrágicas em animais até os cinco anos. Assim, até os dois anos de idade, cerca de 1,1% dos animais manifestam quadros de epistaxe. Apartir de três anos 2,7% e animais com 4 anos ou mais, as manifestações são significativamente mais frequentes.

Costa & Thomasian (2006), apresentaram dados sobre fatores de riscos relacionados à estação do ano e a distância das provas no Brasil. Os autores concluíram que, mesmo em clima temperado e com maiores distâncias percorridas nas provas, os animais apresentaram maiores recidivas de sangramento. O tempo prolongado da prova, esforço e clima seco poderiam ser fatores adicionais à HPIE unidos a uma possível predisposição genética.

Bordreaux et al., (2015), realizaram o primeiro estudo de base genética a fim de contribuir com a patogênese da HPIE em cavalos atletas. Os autores relatam a participação de dois principais genes, CD39 (expresso em células do endotélio vascular, plaquetas e leucócitos) e CD39 L1 (expresso exclusivamente dentro das células adventícias do endotélio vascular), que estão envolvidos na regulação da hemostasia e controle da inflamação. Os resultados da pesquisa demonstram que dos 20 cavalos avaliados com HPIE, em 19 (95%) o CD39 foi identificado, enquanto que CD39 L1 foi identificado em 6 (30%). Com estes resultados os autores comprovaram o envolvimento e a importância das alterações vasculares em quadros de HPIE e deixam expressos a importância de estudos genéticos mais aprofundados nesta área.

Recentemente, Crispie et al., (2017) realizaram um estudo sobre os parâmetros de desempenho durante a prova em uma população de cavalos com HPIE, diagnosticada através do uso de tranqueobroncoscopia, em animais livres

do uso de furosemida. Os autores demonstraram nesse estudo que cavalos com HPIE grau 1 e 2 estavam significativamente mais propensos a melhorar sua posição ao atingir os 400m finais, quando comparados aqueles cavalos com grau 0. Os autores afirmaram ainda que é altamente improvável que a HPIE possa conferir alguma vantagem atlética sobre os não sangradores.

Outro dado importante a ser relatado é que cavalos com HPIE ≥ 3 se mostraram significativamente mais rápidos durante o início da corrida. Contudo nos últimos 600m, esses animais sofrem grave desaceleração. Os autores afirmaram que dados como esses são mais difíceis de serem investigados, pelo fato de não ser possível responder a etiologia da desaceleração. Assim, não se sabe se o motivo principal foi uma eventualidade, fadiga ou ainda está associado à HPIE.

Outra possibilidade está relacionada a velocidade de partida, que é capaz de aumentar a pressão vascular nos pulmões e dessa forma atingir o limiar de ruptura dos capilares pulmonares mais rapidamente quando comparados aos animais que atingem velocidades inferiores no início da prova (CRISPIE et al., 2017).

A fim de compreender se a HPIE está associada ao desempenho de animais durante às provas, foram avaliados na Austrália, 744 cavalos PSI sem uso de medicação profilática (furosemida) ou ainda fitas nasodilatadoras, quanto à sua colocação no ranking de chegada. Os resultados demonstraram que animais com grau ≤ 1 , foram quatro vezes mais propensos à vitórias e possuem 1,8 vezes mais possibilidades de terminar entre os três primeiros colocados do páreo. Embora cavalos com HPIE >1 tenham terminado o páreo em posições significativamente distantes, as chances de cavalos com HPIE ≥ 1 vencerem ou terminarem a corrida nas três primeiras posições não foram significativamente diferentes das chances de cavalos sem HPIE (CRISPE et al., 2017).

Outro estudo conduzido por Sullivan et al., (2015) apontaram que graus ≤ 1 , ao longo da carreira, financeiramente foram 3,3 vezes mais bem sucedidos do que aqueles grau ≤ 2 . Animais não sangradores acumularam aproximadamente 135 vezes mais verba do aqueles com grau de sangramento IV.

Muitos resultados equivocados foram publicados pela comunidade científica a cerca da HPIE. A maioria dos estudos muitas vezes apresentam erros no delineamento experimental e contribuem com afirmações equivocadas para

tentar comprovar correlações entre animais e sua performance. Os estudos incluem erros metodológicos, número amostral insuficiente, vieses de seleção além de conclusões estatísticas equivocadas (COSTA & THOMASIAN, 2006; CRISPE et al., 2017).

3.7 Diagnóstico

Basicamente duas técnicas para o diagnóstico de HPIE são comumente utilizadas. O diagnóstico de sangramento pode ser realizado através do uso de traqueobroncoscopia e lavado broncoalveolar (LBA). Segundo Derksen et al., (2011), ambos os métodos utilizados para identificar a hemorragia não permitem concluir a gravidade do quadro e sim sua presença.

O diagnóstico realizado através da citologia de LBA é considerado como o método padrão ouro no diagnóstico de HPIE, por apresentar especificidade (100%). A identificação de hemácias e /ou hemossideróforos no líquido, torna essa técnica mais sensível e específica sendo capaz de concluir episódios de sangramento brandos por minimamente 21 dias após o quadro de hemorragia (MCKANE et al. 1993; DEPEKER et al.,2014). Os mesmos autores citam ainda que este método poderia resultar em avaliações equivocadas tendo em vista que o LBA proveniente de apenas um lobo pulmonar não seria capaz de representar um diagnóstico preciso de HPIE. As populações celulares podem se apresentar de maneiras diferentes em cada pulmão, daí a importância da avaliação bilateral somada a precisão diagnóstica.

A presença de hemossideróforos em avaliação citológica de LBA também é expressa em um escore de pontuação que varia entre 1 a 5. O escore 1 representa a população de hemossideróforos entre 1-9%, escore 2 de 10-20%, escore 3 de 21-40%, escore 4 de 41-60% e o escore 5 compreende uma população superior a 60%, respectivamente (DiFABIO et al.,2003).

Várias limitações estão envolvidas no emprego de LBA em equinos atletas (BIRKS et al., 2003). O tempo de processamento das amostras poderia ser fator limitante para o uso desse método. Entretanto estudos comprovaram que não houveram diferenças na contagem diferencial de células quando a avaliação citológica foi realizada imediatamente e 24 horas após a coleta, independente da temperatura de conservação às quais foram submetidas (DENIAU et al., 2010).

Outros fatores podem ser determinantes para o uso do LBA. Segundo Birks et al., (2003), mesmo que o LBA tem uma boa aplicação dentro de projetos que envolvem pesquisa, quando este método tenta ser adaptado à rotina clínica, dificilmente proprietários e treinadores disponibilizam seus animais. Essa questão envolve restrições de custo, tempo, equipamentos além do animal ter que ser submetido a protocolos de sedação e/ou anestesia, por exemplo.

Derksen et al., (2011), corroboram com toda a problemática citada anteriormente, uma vez que o uso de drogas anestésicas pode ser um fator complicador no que tange o exame anti Dopping, tendo em vista que muitos animais são submetidos a coletas após o final de cada páreo. Quando um animal tem a confirmação do uso de substâncias proibidas através Dopping, o mesmo é imediatamente suspenso ou afastado das competições por tempo indeterminado além do treinador receber uma advertência severa pelo uso de medicações proibidas.

Em contra partida, a introdução da técnica de endoscopia de fibra óptica flexível marca um enorme passo na contribuição do diagnóstico. Atualmente o exame do trato respiratório superior dos equinos é o método diagnóstico mais utilizado, sendo considerado uma técnica altamente específica e menos invasiva. O endoscópio permite a visualização da hemorragia desde a presença de sangue se apresentando em linhas delgadas, nem sempre visíveis, ou ainda através da coloração do muco no assoalho da traquéia (KNOTTENBELT & PASCOE, 1998). O período adequado para a realização do exame é de 30 a 120 minutos após exercício para ter o diagnóstico de sangramento das vias aéreas superiores (SWEENEY & REILLY, 2001; COSTA et. al., 2004).

Segundo Hinchcliff et al., (2009), no período de duas horas pós treino com uso da broncoscopia, é possível identificar sangramento em cerca de 43 à 75% dos cavalos Puro Sangue, sendo que se repetido o exame, a casuística pode aumentar para 85%.

Segundo Birks et al., (2003), as principais falhas atreladas ao uso da endoscopia estão relacionadas ao treinamento do avaliador sobre a graduação do sangramento, bem como a negligência durante a identificação de quadros hemorrágicos mais brandos. A geração de um possível trauma através da introdução do endoscópio ao longo do trato respiratório, é outro fato que pode gerar confusão sobre a real origem do sangramento.

3.8 Tratamento

Animais sangradores, somente nos Estados Unidos, geram gastos consideráveis a cerca de tratamentos, recuperação e dias de treinamento perdidos, que ultrapassam U\$ 250 milhões/ano.

O insucesso na maioria dos tratamentos de HPIE se relaciona basicamente a falta de condições que determinam a causa e origem do sangramento. Assim, embora muitos estudos tenham utilizado broncodilatadores, tiras de dilatação nasal, agentes procoagulantes, antifibrinolíticos, diuréticos e reológicos, a eficácia de cada um desses não se mostrou capaz de atenuar, corrigir ou cessar essas alterações (KING, 1995, JONES, 2003; SULLIVAN & HICHCLIFF, 2015).

Segundo Sullivan & Hinchcliff (2015), levando em consideração mecanismos fisiológicos competentes a nível do sistema hemostático, alguns estudos utilizaram ácido aminocapróico, um potente inibidor da dragadação de fibrina, vitamina K, aspirina, hesperidina, vitamina C. Contudo os resultados obtidos novamente foram afuncionais na redução dos quadros hemorrágicos.

3.8.1 Uso da Furosemida

O uso de drogas envolvendo animais atletas, antes da competição, é uma grande questão que gera incompatibilidade de opiniões entre os países que fomentam o turfe. Impasses envolvendo animais e Dopping se tornam problemas diretos e suficientemente incontestáveis a ponto de determinar o afastamento do animal e/ou penalidades para o treinador.

O código Nacional de Corridas (CNC), com apêndice realizado diretamente ao Jockey Club Brasileiro da Cidade do Rio de Janeiro, preconiza que animais atletas, usuários de medicação profilática, com quadros recidivantes de sangramento implicarão em quatro possibilidades de penas sendo a primeira em 30 dias, a segunda vez em 90 dias, terceira em 180 dias, quarta em um ano e na quinta o animal será afastado definitivamente das competições.

O uso do fármaco furosemida se tornou popular e atualmente é utilizado de maneira difundida na prevenção de HPIE. O mesmo atua como um possível retardatário na progressão da doença, mesmo o mecanismo de prevenção não

sendo claro. Segundo Hinchcliff (2005), somente na América do Norte cerca de 400 mil doses/ano são aplicadas em animais atletas do turfe. Esse número sugere que aproximadamente 92% dos animais correm sob efeito desta medicação.

No Brasil, o Código Nacional de corridas, na sessão que regulamenta o uso da furosemida, artigo 2º, parágrafo I, define que o fármaco pode ser usado na dose mínima de 100 e máxima de 250 mg/KG, aplicado pela via endovenosa, até quatro horas, antes do horário do páreo.

Algum locais preconizam o uso de furosemida e tiras nasais como medida preventida ao sangramento em cavalos. Um estudo realizado por Kindig et al., (2001), avaliaram o uso simultâneo em cavalos submetidos ao exercício submáximo em esteira, com diagnóstico de HPIE realizado através de LBA. Os resultados apontaram que o uso concomitante não foi capaz de mostrar resultados superiores em relação a redução da hemorragia.

A fim de tentar apresentar à comunidade científica um resumo sobre o uso da furosemida, Sullivan et al., (2015), publicaram uma revisão sistemática e uma meta análise para esclarecer que as evidências em torno do uso da medicação ainda são confusas. Os autores concluíram, mais uma vez, que erros metodológicos implicaram diretamente em falhas durante tratamento e conclusões equivocadas sobre dados não representativos. A partir de um estudo de meta-análise de 5653 cavalos com HPIE, foram avaliados o grau de sangramento e o uso da furosemida. Os resultados apontaram que há eficácia na redução do grau de sangramento quando esta medicação é aplicada até quatro horas antes da corrida.

Dentre as principais propriedades visualizadas para o princípio ativo, destacam-se início de ação rápido, se mostrando útil em situações de emergência, como em casos de hipertensão e /ou edema pulmonar sendo capaz de reduzir o fluxo sanguíneo local. Porém apresenta uma curta duração (WATSON, 2011). A droga atua diretamente nas bombas de sódio-potássio-cloreto ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$), tendo funcionalidade direta no ramo ascendente da alça de Henle, no néfron. A mesma se liga competitivamente aos receptores de cloro do contratransportador luminal $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$, inibindo a concentração do fluído tubular (HINCHCLIFF & MUIR, 1991). A droga aumenta a excreção de potássio

no túbulo distal e a perda de eletrólitos transporta a água livre para o interior dos túbulos aumentando o volume de urina (WATSON, 2011).

De acordo com Hinchcliff & Muir (1991), a ligação do medicamento ao túbulo distal pode ser influenciada fisiologicamente por diversos eventos como a secreção de ácidos orgânicos, fluxo sanguíneo renal e a concentração de proteínas plasmáticas e sua ligação com o fármaco.

Em resumo, a ação da furosemida na HPIE está associada à uma diminuição no volume de água e fluído intravascular, capaz de tornar os quadros de hipertensão arterial pulmonar mais brandos. Esse mecanismo associado ao exercício reduz a incidência da ruptura capilar alveolar e a hemorragia ocasionando uma vasodilatação em parênquima pulmonar (HINCHCLIFF & MUIR, 1991; HINCHCLIFF, 2009).

O uso em cavalos tem início rápido com pico de atuação 15 e 30 minutos após a administração, sendo facilmente visualizado pelo fluxo urinário. O clearance em animais saudáveis é de 503 ml/Kg/hora com retorno ao normal entre uma e duas horas (HINCHCLIFF & MUIR, 1991). A furosemida intra venosa (IV) apresenta as meias vidas alfa, beta e gama de 5,6, 22,3 e 158,5 minutos, respectivamente. Quando administrada por outras vias, como intramuscular, a meia vida da furosemida é maior e aumenta o fluxo urinário para até oito horas. A produção chega a 14,3 litros de urina nesse período sob a dose 1 mg/Kg, contra 2,3 litros no mesmo período em que animais não medicados.

Um estudo recente sobre o uso da furosemida em cavalos com HPIE, testaram a eficácia do diurético 24 horas após a administração da medicação, a fim de mostrar à comunidade científica que se a funcionalidade da droga fosse mantida após 24 horas, e ainda assim atenuasse os quadros de sangramento frente ao diagnóstico da doença, os esquemas mantidos na grande maioria dos hipodrómos poderia ser substituído de 4 para 24 horas. Os autores ainda tentaram descrever de forma comparativa a farmacocinética da droga entre 4 e 24 horas. Os resultados do estudo sugerem que essa abordagem regulatória não é aplicável, que em 24 horas após a administração, na urina, a concentração de furosemida não foi relevante. Apesar da farmacocinética, a eliminação sistêmica do fármaco não foi diferente em cavalos às 4 e 24 horas após a administração (KNYCH et al., 2017).

As conclusões científicas ainda são controversas entre seus benefícios e efeitos adversos. Os principais efeitos visualizados são extrarrenais, pela redução da pressão atrial, redução da pressão arterial pulmonar e do débito cardíaco, aumento da frequência cardíaca em resposta à redução da pressão (efeitos podem persistir por até 8 horas após a administração em animais com restrição hídrica), por compensação da hipovolemia, além da desidratação rápida, ototoxicidade além de predispor à síndrome de exaustão e cólica (HINCHCLIFF & MUIR, 1991; HINCHCLIFF, 2009; WATSON, 2011).

3.9 Hemostasia

Uma injúria aguda associada a um trauma vascular, necessita de uma intervenção rápida e funcional capaz de cessar o sangramento no local da lesão. O sistema hemostático atua como um complexo de segurança adaptado, que a partir da interação entre plaquetas, vasos sanguíneos, proteínas adesivas, entre outros tipos celulares, executa de maneira rápida e conjunta um processo altamente regulado e capaz de manter o estado de fluidez do sangue, reparar a injúria vascular e ainda remover o coágulo do espaço intravascular (MEYER et al., 1983; VERSTEEG et al., 2013; ASSENZA et al., 2014; GETZ et al., 2015).

Para que todo o processo ocorra de maneira regulada, é necessário um equilíbrio entre atividades coagulantes, anticoagulantes, fibrinolíticas e antifibrinolíticas. É fundamental que haja sincronização entre a formação do coágulo e a lise do trombo, caso contrário, qualquer disfunção no sistema de coagulação ou fibrinolítico podem resultar em hemorragia ou trombose excessiva (EPSTEIN, 2014).

A hemostasia está dividida em três pontos principais, a hemostasia primária (lesão vascular) que compreende a interação de vasos e plaquetas, a secundária (fatores da coagulação) (tabela 1) e a terciária (dissolução do coágulo do espaço intravascular através da ação da plasmina). Mesmo que cada um dos processos seja categorizado de forma separada, é imprescindível entender que as mesmas estão intimamente relacionadas e ocorrem simultaneamente, desde que todos os componentes envolvidos estejam presentes e sejam funcionais (THOMAS, 2002).

Tabela 1 - Fatores de coagulação, síntese e meia vida plásmatica.

Fator	Nome	Síntese	Meia vida plásmatica
I	Fibrinogênio	Fígado	1,5 – 6,3 dias
II	Protrombina	Fígado/macrófago	2,1 – 4,4 dias
III	Tromboplastina ativada	Constituinte de fibroblastos e membrana plasmática de células musculares lisas	
IV	Cálcio		
V	Proacelerina	Fígado, macrófagos	15 – 24 horas
VII	Proconvertina	Fígado, macrófagos	1 – 6 horas
VIII	Fator anti-hemofílico	Fígado	2,9 dias
IX	Fator de Christmas	Fígado	24 horas
X	Fator de Stuart-Prower	Fígado, macrófagos	32 – 48 horas
XI	Antecedente da tromboplastina do plasma	Fígado	30 horas
XII	Fator de Hageman	Fígado	18 - 52 horas
XIII	Estabilizador da fibrina	Fígado	4,5 – 7 dias
Pré calicreína	Fator de Fletcher	Fígado	35 horas
Cininogênio de alto peso molecular	Fator de Fitzgerald	Fígado	6,5 dias

Thrall et al., 2004.

3.9.1 Interação entre endotélio vascular e a cascata da coagulação

A interação de mecanismos fisiológicos entre vasos sanguíneos, plaquetas e a cascata da coagulação são responsáveis pela funcionalidade do sistema hemostático. É sabido que fisiologicamente a parede vascular possui atividade antitrombótica e antiinflamatória. Portanto, quando o fluxo normal de um vaso sanguíneo é interrompido, por uma injúria vascular ou funcional, uma resposta hemostática local, rápida e regulada é estabelecida a fim de cessar eventos trombohemorrágicos (PALTA&PALTA, 2014). Para isso, são ativados mecanismos prócoagulantes, prótrombóticos e próinflamatórios (BECKER et al.,

2000).

O endotélio vascular exerce uma atividade anticoagulante, que é responsável pela manutenção do estado de fluidez do sangue, através da vasodilatação, que evita a ativação plaquetária, impede a formação de trombina e deposição de fibrina dentro do vaso. A formação de trombina e fibrina no interior do vaso, é inibida através da ação do fator inibidor tissular (TFPI) que também é sintetizado pelas células do endotélio vascular, impedindo a interação com o fator VIIa (BECKER et al., 2000).

A síntese e secreção de prostaciclina (PGI₂) pelas células endoteliais, óxido nítrico (NO) e adenosina difosfato (ADP), atuam como um potente antiagregante capaz de impedir a ativação das plaquetas (SMITH, 2010). É responsável ainda pela produção de dois fatores ativadores do plasminogênio, sendo o tipo uroquinase (uPA) e o tipo tecidual, que quando clivado, é convertido em plasmina, que por sua vez pode inativar tanto o plasminogênio quanto o fibrinogênio, dando origem aos produtos de degradação da fibrina (PDF's) (MEYERS et al., 1987; SMITH, 2010).

As plaquetas podem secretar através de seus grânulos alfa, proteínas específicas como a trombomodulina, que em contato com o endotélio inibe a produção de trombina. A trombomodulina atua ainda como um cofator capaz de ativar a proteína S capaz de ativar a proteína C, que por sua vez é pode inativar os fatores V e VIII, enquanto a ligação da trombomodulina através da ligação com o fator Xa, inibe sua atividade.

A resposta do endotélio vascular à injúria possui um caráter neurogênico e é potencializada pela endotelina, que induz uma resposta vasoconstritora imediatamente após o trauma (GENTRY et al., 2008). A exposição do fator de FvW, uma proteína essencial para o sistema hemostático, dá início ao processo de reparação da lesão vascular (INTERLANDI et al., 2017). A liberação do FvW pelas células endoteliais atuam como um agente facilitador no processo de adesão, ativação e agregação plaquetária. O FvW facilita ainda a ligação das plaquetas ao colágeno exposto, e a partir disso, as plaquetas liberam mais grânulos a fim de facilitar a formação do coágulo.

As células do endotélio vascular podem, ainda que através de outros estímulos, promover a trombose. O fator ativador plaquetário (PAF) e tromboxane (TxA₂) podem contribuir na ativação e agregação das plaquetas.

Assim, a expressão ou liberação de fatores através do endotélio poderiam modular a atividade procoagulante semelhante às aquelas feitas pela tromboplastina tecidual, trombomodulina e ativadores ou inibidores do plasminogênio. A resposta às tais procoagulantes podem ser induzidas através das respostas aos patógenos e seus ativadores como a interleucina-1 (ILC-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) (MEYERS et al., 1987).

3.9.2 Hemostasia primária

As plaquetas estão envolvidas nesse processo e são capazes de cessar o sangramento através da formação de um tampão plaquetário, que envolve três etapas importantes adesão, ativação e agregação (LASNE et al., 2006). Algumas alterações hemostáticas, envolvendo plaquetas, coagulação e fibrinólise são relatadas em cavalos após o exercício (McKEEVER et al., 1990; SMITH et al., 1997; KINGSTON et al., 2002; PICCIONE et al., 2004, 2010; GIORDANO et al., 2010).

Para que o processo de adesão seja ativado, é necessário que um trauma vascular seja estabelecido, com consequente exposição de colágeno subendotelial às plaquetas circulantes no plasma. A partir disso, ocorre a expressão de P-selectina, uma proteína transmembrana específica para ligação em grânulos alfa de plaquetas, que quando ativadas se aderem aos receptores de colágeno (KOEDAM et al., 1992; FRENETTE et al., 1995). A secreção de fator de Von Willebrand das células endoteliais facilita essa ligação (GENTRY et al., 2008). Assim, ocorre a ativação plaquetária através da liberação de mediadores armazenados em suas organelas, como TxA₂, serotonina, ADP ou ainda a trombina, produto da hemostasia secundária (ROSENBLUM, 1997; THOMAS, 2002). Na presença de trombina, TxA₂, vWF e ADP no local da lesão estimulam então agregação que favorece a formação do tampão hemostático primário (NYARKO et al., 1998).

Os principais receptores plaquetários primários envolvidos nessa fase são conhecidos como integrinas (glicoproteínas), e mesmo que poucos estudos sejam aplicados a tais receptores na espécie equina, sabe-se que as principais glicoproteínas são os receptores de colágeno (GP Ia/IIa), fibronectina (GP Ic/IIIa), laminina (Ic/IIa), a vitronectina (Va) e fibrinogênio (IIb/IIIa) dependente de

ativação (PINTADO et al., 1995). Sabe-se que a ligação entre GPIIb/IIIa quando ligada ao FvW proporcionando uma adesão plaquetária irreversível ao subendotélio vascular (EPSTEIN, 2014).

Duante a fase de adesão, as plaquetas se aderem ao colágeno do subendotélio e secretam aminas vasoativas como a serotoninas, catecolaminas ou adrenalina que por sua vez promovem uma ação vasoconstritora no local da lesão. A redução do fluxo sanguíneo local favorece o agrupamento das plaquetas na presença de ADP e cálcio (LEME et al., 2009).

Para que não haja expansão do tampão hemostático no espaço intravascular, interações físicas e bioquímicas passam a acontecer entre células endotelias, íntegras e plaquetas através de mecanismos antitrombóticos. As cargas presentes nas membranas das plaquetas e das células endoteliais íntegras se repelem por serem igualmente negativas. Bioquimicamente, óxido nítrico e prostaciclina atuam localmente inibindo a ativação, adesão e agregação. Outras substâncias presentes na superfície de células endotelias reduzem a ativação através da remoção de agonistas como as ADPases, que degradam o ADP, o sulfato de heparano, que contribui na inativação da trombina, e trombomodulina, passa a inativar a ativação das plaquetas (RUGGERI, 2003).

Em situações normais as plaquetas não aderem ao endotélio a menos que sejam previamente ativadas na circulação (WEISS et al. 1997; REININGER et al. 1998). Em equinos, às disfunções plaquetárias ocorrem no curso de diversas enfermidades e são capazes de provocar trombose, conhecida também como um estado de hipercoagulabilidade mediada por agentes próinflamatórios, ou através da ativação inapropriada resultando em tromboembolismo (HEATH et al., 1994). Assim, quadros de hipercoagulabilidade, podem representar manifestações severas e podem resultar em morte súbita durante o exercício (BODEN et al., 2005).

Cavalos atletas e não atletas quando submetidos ao exercício agudo e de alta intensidade podem apresentar quadros de hipercoagulabilidade (ASSENZA et al., 2013). Esse estado se deve ao aumento da trombina e da hiperatividade do sistema plaquetário, somado a um aumento nos fatores de coagulação VIII e o FvW (LIPPI&MAFFULLI, 2009). Outra descoberta relevante acerca de cavalos de corrida foi feita por Smith et al., (1997), que exibiram resultados inesperados sobre a redução do FvW após a conclusão do exercício. Por apresentar uma

meia vida longa na circulação, o aumento do consumo dessa proteína é capaz de indicar a intensidade do trauma causado durante o exercício extenuante.

Parte da prevenção da hemorragia e da trombose dependem também das funções mediadas pelo colágeno. Segundo Jensen et al., (2016), as ligações estabelecidas entre colágeno, FvW, glicoproteínas e os fatores de coagulação estão interligados de maneira a restaurar o processo de injúria inicial. As alterações sofridas pelos vasos através da deposição dessa proteína intraluminalmente, também conhecida como fibrose, levam a oclusão ou remodelamento da microvasculatura como a do pulmão de cavalos com HPIE, por exemplo (DERKSEN et al., 2011) .

3.9.3 Hemostasia secundária

O modelo da cascata de coagulação é tradicionalmente dividido em três principais vias sendo elas extrínseca (componentes celulares e do sangue), intrínseca (componentes presentes no espaço intravascular) e comum (ativação do fator X). Isso quer dizer que as reações no processo hemostático são controladas pela localização em diferentes superfícies celulares.

A hemostasia secundária está relacionada à cascata das serino proetases, que tem como principal objetivo clivar o fibrinogênio através da ação da trombina (GALE, 2011). Este processo torna a malha de fibrina insolúvel no local da lesão e ocorre concomitantemente à agregação plaquetária (FALATI et al., 2002). Em condições fisiológicas os mecanismos anticoagulantes garantem que a ativação do sistemático hemostático seja poupado. Segundo Esmon et al., (1981) e Shimada et al., (1991), os principais mecanismos anticoagulantes estão relacionados à ação da trombomodulina e ao ao sulfato de heparano. A trombomodulina é um cofator da trombina, capaz de converter a ação prócoagulante em anticoagulante através da proetina C, enquanto os sulfatos de heparano estimulam a ativação inibidora da serinoprotease inativando a trombina e o fator Xa.

A ativação da via extrínseca depende da liberação de tromboplastina que é conhecida também como fator tecidual (FT). Presente em fibroblastos e tecidos extravasculares, ativam o fator VII, formando um complexo denominado protrombinase (FVIIa+FT), responsável pela ativação dos fatores X e IX

(DAHLBACK, 2000).

A via intrínseca é ativada por contato. A ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas com a presença de componentes do plasma como a pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativado, ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado, por traços de trombina, e em presença de íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (FERREIRA et al., 2010).

As duas vias atingem agora a “via comum” capaz de converter protrombina em trombina favorecendo a transformação de fibrinogênio em fibrina. Atualmente um novo modelo foi proposto para avaliação da hemostasia, no qual propõe que três fases principais devem ser avaliadas, iniciação, amplificação e propagação.

Uma vez que os monômeros de fibrina estão disponíveis na circulação, juntamente com a ação do fator XIIIa (fator XIII ativado pela trombina) e íons cálcio, o coágulo se mantém estável até sua resolução. Os fatores da cascata da coagulação são numerados de I a XIII e a interação visualizada entre os mesmos não determina a comunicação em cascata e sim a sua ordem de descoberta (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

3.9.4 Hemostasia terciária

A fibrinólise é responsável pela remoção do coágulo, que ocorre exclusivamente no local da lesão endotelial. Uma falha nesta etapa pode ser fundamental para o desenvolvimento de tromboembolismo (LISMAN et al., 2005).

Este processo é capaz de clivar a fibrina a partir da ação da plasmina e remover o excesso de fibrina localizado no espaço intravascular. O endotélio é responsável por liberar o plasminogênio, que se concentra no local da lesão liberando plasmina, uma protease capaz de clivar a fibrina produzindo fragmentos denominados de produtos da degradação da fibrina ou ainda os dímeros D, oriundos da degradação da fibrina estável (SMITH, 2010). A combinação entre plasmina (que está em excesso) e antiplasmina, limitam o

processo, de modo que o mesmo não seja desencadeado de maneira generalizada. Outro fator importante e que facilita a regulação deste processo, ocorre através da concentração plásmatica da antiplasmina que é 10 vezes maior que a plasmina.

A fibrina e seus derivados podem influenciar os mecanismos de inflamação e reparo do tecido pulmonar afetado (IDELL, 2003). A migração de células inflamatórias até o tecido lesionado pode ser mediado pela fibrina, bem como a adesão e proliferação de fibroblastos com a seguinte produção de colágeno (GRINELL et al., 1980; GRAYS et al., 1995). Além disso, a fibrina e seus derivados inibem o surfactante, diminuindo a tensão superficial alveolar, formando áreas com diminuição de trocas gasosas.

Segundo Ware et al., (2005), em pacientes humanos com doenças respiratórias, a membrana alveolar encontra-se danificada e isso é suficiente para desencadear um desequilíbrio entre a atividade coagulatória e fibrinolítica no espaço extravascular. Os autores afirmam ainda que coagulação e a fibrinólise desempenharam um papel importante nos mecanismos patogênicos de numerosas doenças pulmonares em seres humanos, e o desenvolvimento de terapêuticas que sustentam a fibrinólise é discutido como uma abordagem promissora.

Estudos sobre diferentes parâmetros de fibrinólise utilizando u-PA (ativador de plasminogênio de tipo uroquinase), PAI-1 (inibidor de ativador de plasminogênio 1) e α 2-AP (alfa 2-antiplasmina) e dímeros - D (um produto de degradação de fibrina contendo dois fragmentos D, da proteína de fibrina unida por uma ligação cruzada) demonstraram um aumento da coagulação em fluídos provenientes do LAB em pacientes com doença respiratória crônica (GUINTHER et al., 2000).

Até o momento, poucos estudos foram realizados em medicina veterinária a fim de apontar distúrbios da fibrinólise nesta espécie, principalmente em doenças que envolvam o trato respiratório de equinos atletas.

3.10 Tromboelastometria (TEM)

Tanto a tromboelastometria (TEM) quanto a tromboelastografia (TEG), são técnicas utilizadas a partir da interação entre fatores de coagulação, fibrinogênio,

plaquetas e sistema fibrinolítico em tempo real, avaliando as características cinéticas e viscoelásticas do coágulo diferindo apenas nos reagentes utilizados e nas variáveis obtidas em cada método (LÓPEZ et al., 2016).

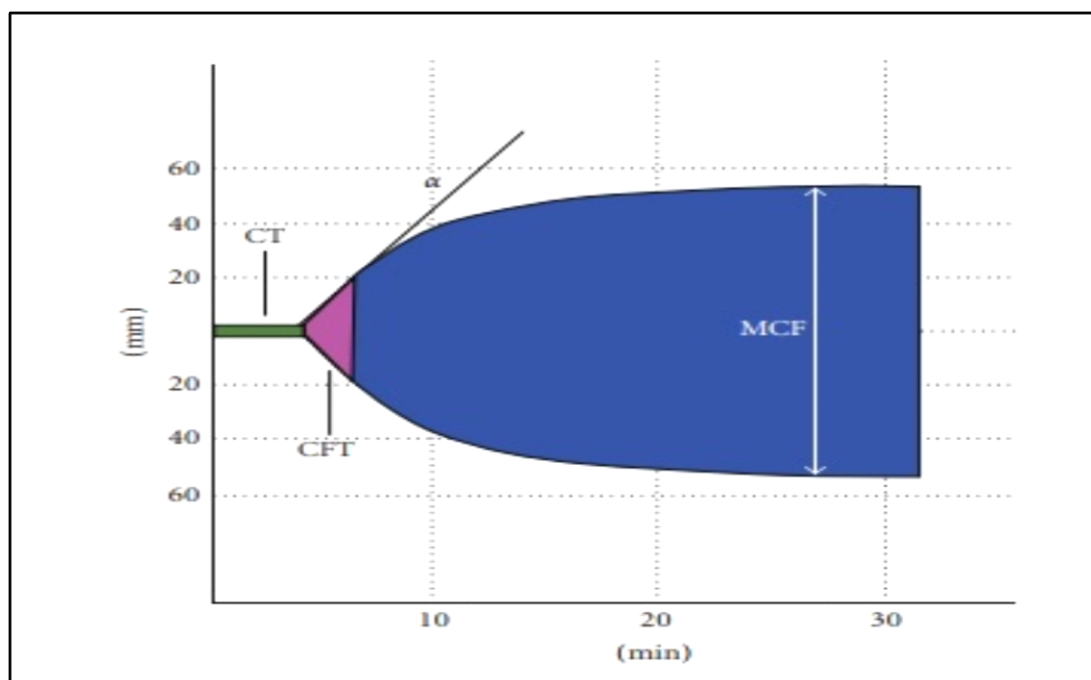
Segundo Luddington (2005), a TEM é uma tecnologia que vem sendo amplamente difundida, pois possui características que avaliam o sistema hemostático de animais e humanos através das propriedades viscoelásticas do sangue, desde a formação do coágulo até a fibrinólise. Dessa maneira, assume um novo formato analítico capaz de integrar a ação de componentes envolvidos no processo de coagulação, avaliando todo processo através da técnica realizada *in vitro*.

Esta tecnologia foi desenvolvida na Alemanha por volta de 1940 e vem sendo utilizada desde então com bons resultados. As análises realizadas a partir da TEM possuem um princípio de monitoramento que ocorre através da detecção óptica feita sobre o pino suspenso no sangue. Assim que a fibrina é formada, a diminuição da agitação reduz e as alterações são captadas por impedância e transmitidas a um sistema capaz de converter em gráfico as alterações na coagulação.

As variáveis fornecidas pelo gráfico se referem à viscoelasticidade do sangue. Logo, o tempo de coagulação (CT) dado pela alteração da viscoelasticidade do sangue, tempo de formação do coágulo (CFT) dado pela cinética da fibrina e formação do coágulo, ângulo alfa ($A^\circ\alpha$), firmeza máxima do coágulo (MCF) e a porcentagem de fibrinólise (LY 30/60), que é detectada através da lise máxima (LM) quando superior a 15% (KOL e BORJESSON, 2010, (MCMICHAEL e SMITH, 2011).

Figura 1 - Avaliação pela tromboelastometria (ROTEM® Delta) realizado em sangue total citratado. Na figura as variáveis CT (Clotting time): tempo de coagulação; CFT (Clot formation time): tempo de formação do coágulo; $A^\circ\alpha$ (α

angle): ângulo alfa e MCF(Maximum Clot firmness): firmeza máxima do coágulo.



Adaptado GIORDANO et al., 2010.

A ativação da coagulação na tromboelastometria é realizada através do emprego de reagentes inTEM® responsável por avaliar a via intrínseca através da ativação da coagulação por contato, exTEM® avalia a via extrínseca através da ativação da coagulação com fator tecidual, fibTEM® que avalia o fibrinogênio através das vias de ativação da coagulação com fator tecidual através da inibição das plaquetas pela citocalasina (KOL e BORJESSON, et al., 2010).

A técnica foi validada para monitoração hemostática em caninos (SMITH et al., 2010), equinos (KOL e BORJESSON, 2010) e felinos (MARSCHNER et al., 2010). Contudo vem sendo aprimorada a nível de valores de referência para as mesmas espécies (BRUNO et al., 2015; JUNGE et al., 2016; CHARLOTE et al., 2017).

Em estudos realizados com cavalos PSI predispostos a desenvolver HPIE, sugerem que a coagulação é pré ativada e a possibilidade de desenvolver esse quadro é maior mesmo que os episódios hemorrágicos sejam recentes ou recorrentes (GIORDANO et al., 2010, KOL e BORJESSON, 2010).

A utilização de testes como TP, TTPa, dímeros D e fibrinogênio são utilizados na realização de diagnóstico precoce na maioria das doenças que envolvem distúrbios hemostáticos (ANDREASEN, et al., 2012). Todavia, o uso

da TEM seria uma possível forma de otimizar resultados através de uma análise mais sensível na detecção de estados de coagulação intravascular disseminada, hipo ou hipercoagulabilidade, avaliando de maneira integral, cavalos com HPIE, por exemplo (KOL e BORJESSON, 2010, GIORDANO et al., 2010).

Segundo Paltrinieri et al., (2008) é importante avaliar através da TEM o desempenho analítico de equinos, tendo em vista que quando comparados à outras espécies, apresentam TP diminuído, TTPa aumentado, níveis de fibrinogênio aumentado, bem como aumento da atividade de factores I, II, V, e X. Os autores informam ainda que os intervalos de referência variam conforme a aptidão ou tipo de exercício realizado por cada animal, daí a importância de padronizar valores de referência dentro de cada estudo. Logo, as alterações no sistema hemostático de cavalos atletas, principalmente após o exercício, apresentam são diferentes daquelas visualizadas em cavalos de sela, por exemplo. Segundo GIORDANO et al., (2010), Cavalos atletas com HPIE podem apresentar quadros de hipercoagulabilidade em momentos pré e pós exercício, com as principais alterações verificadas principalmente em via intrínseca e atividade fibrinolítica.

As alterações hemostáticas têm sido reportadas também em humanos que praticam exercício físico extenuante, enquanto aquelas que geram alterações hemostáticas em equinos atletas são pouco documentadas. O impacto agudo gerado no sistema hemostático de humanos desencadeia a ativação da coagulação, ativação da fibrinólise e um aumento no número e na atividade das plaquetas. Brooks et al., (2014), verificaram que as variáveis da TEM são influenciadas pela viscosidade do sangue e não pelo hematócrito quando em condições experimentais adequadas.

As informações sobre a TEM em Medicina Veterinária começa a ganhar espaço a partir dos resultados de pesquisas através da expansão dessa tecnologia. O uso do ROTEM em estudos com cavalos atletas infere que o exercício agudo induz uma hemoconcentração, que pode variar de relativa a moderada, e um quadro de hipocoagulabilidade em animais saudáveis. (GIORDANO et al., 2010).

Vários fatores estão intrincados na elucidação da patogênese da HPIE. Portanto, episódios hemorrágicos recentes antes das coletas ou hemorragias

crônicas (recorrentes), da frequência de participação em provas, fragilidade capilar, podem agravar as lesões nas paredes dos vasos. Portanto as informações sobre quadros de hipo e hipercoagulabilidade nesta espécie ainda são conflitantes.

Uma avaliação sistemática baseado em evidências foi publicada por Hanel et al., (2014), os mesmo concluíram que os estudos que envolvem a TEM devem ser relatados universalmente, principalmente na Medicina veterinária, que possui poucos trabalhos capazes de evidenciar as principais alterações hemostáticas frente em diferentes doenças, ou até mesmo estabelecer valores de referências para diferentes espécies. Também foi recomendado que os trabalhos devem ser acompanhados dos valores de hematócrito, contagem de plaquetas e concentração de fibrinogênio para agregar informações aos dados da TEM. De modo geral, poucos estudos relacionados à hemostasia são realizados em cavalos atletas no Brasil. Quando relacionados à TEM são ainda menores.

3.11 Hemoparasitoses: impacto no sistema hemostático

Sabendo da importância do envolvimento de causas infecciosas comprometendo o sistema hemostático (DUMLER et al., 2007, PASA et al., 2017), até o momento não existe nenhum caso reportado sobre o impacto da erliquiose em cavalos atletas com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE).

Os principais distúrbios em sistema hemostático estão frequentemente associados ao curso agudo e/ou crônico das doenças, pela capacidade de comprometer integralmente todas as etapas do funcionamento do sistema de coagulação, afetando a função das plaquetas, fatores de coagulação além interferir no processo de reparação do coágulo no espaço intravascular (POLL, et al, 2011).

A infecção é capaz de induzir a inflamação e, através desse processo, ativar o fator tecidual, uma glicoproteína transmembrana, que pode ser expressa por fibroblastos entre outros tipos de tecidos do meio extravascular (LEVI e POLL, 2010). A participação de citocinas pró-inflamatórias ou de produtos bacterianos, envolvidos durante a fase de infecção, podem servir como

potenciais sinalizadores para que a coagulação seja ativada.

Até o momento, nenhum trabalho abordou o potencial da infecção sobre os parâmetros hemostáticos utilizando como fonte diagnóstica a tromboelastometria. Outro grande problema encontrado principalmente na rotina de grandes animais, é a negligência no diagnóstico dessas infecções. Sabe-se que os carrapatos possuem distribuição mundial e são importantes vetores para transmissão de doenças em animais domésticos e silvestres em todo o mundo (BARROS et al., 2015, SAINZ et al., 2015). Em equinos, são relatadas três espécies de carrapatos, *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus microplus*, que estão intimamente relacionados à transmissão de inúmeros patógenos tais como *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Anaplasma phagocytophilum* e bactérias do gênero *Ehrlichia* spp.

A prevalência de parasitos do gênero *Ehrlichia* spp. entre outros genótipos de *Ehrlichia* sp. vem se tornando uma problemática pelo aumento anual no número de casos (AGUIAR et al., 2014). A frequência do diagnóstico de *Ehrlichia* sp., em cães, é massivamente relatada em todo mundo (MYLIONAKIS et al., 2014; GUEDES et al., 2015).

As principais alterações clínicas observadas em animais positivos podem variar entre anemia e trombocitopenia. Contudo, o aumento da temperatura corporal, redução na contagem de glóbulos brancos, eosinófilos, hemácias, hemogloblina, hematócrito também sugerem quadros de vasculite que são estabelecidos durante o curso agudo ou crônico da doença (DUMLER et al., 2001). Assim, episódios de epistaxe, hematúria e diarreia hemorrágica associados à disfunção plaquetária, na erliquiose, estão relacionadas à gravidade dos sinais clínicos e também associados à trombocitopenia severa quando o número de plaquetas é inferior a 30.000 (BULLA et al., 2004). Além das principais anormalidades hematológicas, distúrbios respiratórios, oculares e neurológicos também são relatados e podem contribuir com os efeitos negativos sobre a hemostasia (CASTRO et al., 2004).

As citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores são capazes de ativar o sistema de coagulação e diminuir a regulação de importantes vias anticoagulantes fisiológicas principalmente nos casos mediados por infecções bacterianas como no caso de *Ehrlichia* spp. (LEVI e POLL, 2010).

Com o avanço epidemiológico das infecções por *Ehrlichia* spp. em todo mundo e, sabendo do potencial comprometimento, extensão e magnitude da doença, especialmente no que tange a espécie equina e o diagnóstico de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, são necessárias pesquisas que contribuam na elucidação do impacto causado pelo agente desde de o momento da infecção até as alterações causadas sobre os parâmetros hemostáticos além da relação com os episódios de sangramento do animal.

4. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M.; ZILIANI, T.F.; ZHANG, X. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks Tick Borne Disease**, v.5, p.537-44, 2014.

AKINNUSI, M.E., EISOLTH, A.A. The role of coagulation in pulmonary pathology. **Inflammation and Allergy—Drug Targets**, v.6, n.4, p.201-209.
doi.org/10.2174/187152807783334346

AMELN, H., GUSTAFSSON, T., SUNDBERG, C.J., OKAMOTO, K., JANSSON, E., POELLINGER, L., MAKINO, Y. Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v.19, n.8, p.1009-11. 2005.
[doi:10.1096/fj.04-2304fje](https://doi.org/10.1096/fj.04-2304fje)

ASSENZA, A., TOSTO, F., CASELLA, S., FAZIO, F., GAINETTO, C. PICCIONE, G. Changes in blood coagulation induced by exercise training in young athletic horses. **Research Veterinary Science**, v.95, n.2, p.1151-1154. 2013.
[doi:10.1016/j.rvsc.2013.07.005](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.07.005).

ASSENZA, A.; BERGERO, D.; CONGIU, F. Evaluation of serum electrolytes and blood lactate concentration during repeated maximal exercise in horse. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 34, n.10, p. 1175-1180. 2014.
doi.org/10.1016/j.jevs.2014.07.001

BARROS, E.M., BRAGA, Í.A., SANTOS, L.G.F., ZILIANI, T.F., MELO, A.L.T., BORGES, A.M.C.M., SILVA, L.G., AGUIAR, D.M. Detecção de *Theileria equi* e *Babesia caballi* e anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.3, p.716-722, 2015.

BHATTI, R., SHAIK, D.M. The effect of exercise on blood parameters. **Pakistan Journal of Physiology**, v.3, n.2, p.44-46. 2007.

BIRKS, E.K., MATHIEU, O., FU, Z. Very high pressures are required to cause stress failure of pulmonary capillaries in Thoroughbred racehorses. **Journal Applied Physiology**, v.82, n.5, p.1584-1592. 1997.
[doi:10.1152/japplphysiol.01170.2012](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01170.2012)

BIRKS, E.K., SHULER, K.M., SOMA, L.R., MARTIN, B.B., MARCONATO, L., DEL PIERO, F., TELEIS, D.C., SCHAR, D., HESSINGER, A.E., UBOH, C.E. EIPH: postrace endoscopic evaluation of Standardbreds and Thoroughbreds. **Veterinary Equine Journal**, v.34, n.34, p.375-378. 2002.
[doi:10.1111/j.2042-3306.2002.tb05451.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2002.tb05451.x)

BIRKS, E.K., DURANDO, M.M., McBRIDE, S. Exercise-induced pulmonary haemorrhage. **The Veterinary Clinics Equine**, v.19, n.1, p.87-100. 2003.
[doi.org/doi:10.1016/S0749-0739\(02\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00068-8)

BODEN, L.A., ANDERSON, G.A., CHARLES, J.A., MORGAN, K.L., MORTON, J.M., PARKIN, T.D.H., SLOCOMBE, R.F., CLARKE, A.F. Risk of fatality and causes of death of Thoroughbred horses associated with racing in Victoria, Australia: 1989–2004. ***Equine Veterinary Journal***, v.38, n.4, p.312-318. 2006.

BOUDREAUX, M.K., KOELHER, J., HABECKER, P.L. DePIERO, F. Evaluation of the genes encoding CD39/NTPDase-1 and CD39L1/ NTPDase-2 in horses with and without abnormal haemorrhage and in horses with pathologic evidence of exercise-induced pulmonary hemorrhage. ***Veterinary Clinical Pathology***, v.44, n.4, p. 617-625. 2015.

BROOKS, A.C.; GUILLAUMIN, J.; COOPER, E.S.; COUTO, C.G. Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings. ***Transfusion***, v.54, n.3, p.727-734. 2014.
doi: [10.1111/trf.12354](https://doi.org/10.1111/trf.12354).

BULLA, C., KIOMI TAKAHIRA, R., PESSOA ARAÚJO, J., Jr, APARECIDATRINCA, L., SOUZA LOPES, R. & WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. ***Veterinary Research***, v.35, n.12, p.141-146, 2004.

CASTEJÓN, F., RUBIO, M.D., AGUERA, E.I. Respuesta hematológica y plasmática al ejercicio em cinta rodante. In: **LÓPEZ, G.E.V. Valoración morfofuncional e la selección de reproductores del Caballo de Pura Raza Española**. 1.ed. Córdoba: Caja Rural, 2007. p.169-196.

CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. ***Veterinary Parasitology***, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

COOK, W. R. Epistaxis in the race horses. ***Equine Veterinary Journal***, v.6, p.45-48, 1974.

COSTA,M.F.M, THOMASSIAN,A,GOMES,T.S. 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***, v.11, n.3, p.89- 91. 2004.

COSTA, M.F.M., THOMASSIAN, A. Evaluation of race distance, track surface and season of the year on exercise-induced pulmonary haemorrhage in flat racing Thoroughbreds in Brazil. ***Equine Veterinary Journal***, v. 38, p. 487-489. 2006.
doi: [10.1111/j.2042-3306.2006.tb05592.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2006.tb05592.x)

COUROUCÉ, A. Endurance and sprint training. In: **CONFERENCE ON EQUINE SPORTS MEDICINE AND SCIENCE**, 1998, Cordoba, Espanha. Anais____The Netherlands: Wageningen Pers, 1998. 272p. p.190-202.

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

CRISPE, E.J., LESTER, G.D., SECOMBE, C.J., PEREIRA, D.I. The association between exercise-induced pulmonary haemorrhage and race-day performance in Thoroughbred racehorses. ***Equine veterinary journal***, v.0, p. 1-7. 2017.
doi: 10.1111/evj.12671

CHRISTOV, C., CHRETEIN, F., ABOU-KHALIL, R. Muscle satellite ´ cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. ***Molecular Biology of the Cell***, v.18, n. 4, p.1397-1409. 2007.
doi:10.1091/mbc.E06-08-0693

DAVIE, A.J., WEN, L., CUST, A.R.E., BEAVERS, R., FYFE, T., ZHOU, S. The effects of moderate intensity training in a hypoxic environment on transcriptional responses in Thoroughbred horses 2017. ***Biology Open***, 2017.
doi: 10.1242/bio.020388

DENIAU, V., Comparison of cytological profiles of bronchoalveolar lavage fluid–BALF-obtained from left and right lungs according to conditions of conservation and preparation. ***Performance Diagnosis and Purchase Examination of Elite Sport Horses***, v.81. 2010.

DESMECHT, D., LINDEN, A., AMORY, H., ART, T., LEKEUX, P. Relationship of plasma lactate production to cortisol release following completion of different types of sporting events in horses. ***Veterinary Research Communications***, v.20, n.4, p.371-379. 1996.

DERKSEN, F.J., ROBSON, N.E. Overview of the equine respiratory system. In: LEKEUX, P. Equine Respiratory Disease. Ithaca: ***International Veterinary Information Service***, 2002.

DERKSEN, F.J., WILLIAMS, K.J., STACK, A. Exercise Pulmonary, Hemorrhage in horses: the role of pulmonary veins. ***Compendium Continuing Education for Veterinarians***. 2011.
doi: 10.1111/jvim.12593

DEPECKER, M., RICHARD, E.A., PITEL, P.H., FORTIER, G., LELEU, C. Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: Influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. ***The Veterinary Journal***, v.199, n.1, p. 150-156. 2014.
doi: 10.1016/j.tvjl.2013.10.013.

Di FABIO, V. Emorragia polmonare da sforzo (EIPH): diagnosi e valutazione citologica degli emosiderociti nel lavaggio broncoalveolare (BAL) in 77 cavalli trottatori. ***ATTI DELLA SOCIETA' ITALIANA DELLE SCIENZE VETERINARIE***, v.57, p.259-260. 2003.

DIAS, P.M.D., TEIXEIRA, L.G., BERNARDI, N.S., GRAVENA, K., ALBERNAZ, R.M., VALADÃO, C.A.A., QUEIROZ-NETO, A., LACERDA-NETO, J.C. Técnica para avaliação da pressão arterial pulmonar de equinos durante o exercício progressivo em esteira rolante. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.254-260. 2013.

doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200020

DONALDSON, L.L. A Review of the pathophysiology of exercise-induced pulmonary hemorrhage in the equine athlete. **Veterinary Research Communications**, v.15, n.22, p. 211-226. 1991.

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. 2002.

DUMBLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, A.F., DASCH, G.A., PALMER, G.H. RAY, S.C. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Internal Journal of System Evol Microbiology**, v.51, n.6, p. 2145–2165, 2001.

DUMLER, J.S., MAGIDAN, J.E., PUSTERLA, N., BAKKEN, J.S. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical infectious diseases**, v.45, Supplement 1, p. 45-51. 2007.

DUREN, S. Freeding the endurance horse. In: **Pagan JD. Advances in equine nutrition. Notthighan: Nottingham Univesity Press**, 2000. p.351-363.

DYSON, P.K., JACKSON, B.F., PFEIFFER, D.U., PRICE, J.S. Days lost from training by two- and three-year-old Thoroughbred horses: a survey of seven UK training yards. **Equine Veterinary Journal**, v.40, n.7, p.650-657. 2008.

EATON, M.D. Energetics and performance. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. **IN: The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**, Philadelphia: Saunders. 1994. p.49- 62.

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**, 30, p.521-527. 1999.

ECKERSALL, P. D. & CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v.12, n.2, p.169-178. 1988.

EGUILLETTE, R.L., STEINMANN, M., BOND, S.L., STANTON, B. Tracheobronchoscopic Assessment of Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage and Airway Inflammation in Barrel Racing Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.30, n. 15, p. 1327-1332. 2016.

[doi:10.1111/jvim.13959](https://doi.org/10.1111/jvim.13959)

ERICKSON, B.K., ERICKSON, H.H., COFFMAN, J.R. Pulmonary artery, aortic and oesophageal pressure changes during high intensity treadmill exercise in the horse: a possible relationship to exercise-induced pulmonary haemorrhage. ***Equine Veterinary Journal***, v.9, p.47-52. 1990.

ERICKSON, H. H. A review of exercise-induced pulmonary hemorrhage and new concepts for preventions. ***Proceedings of the Annual Convention American Association Equine Practitioners***, v.46, n.12, p.193-196. 2000.

EPSTEIN, K.L., BRAINARD, B.M., LOPES, M.A.F., BARTON, M.H., MOORE, J.N. Thrombelastography in 26 healthy horses with and without activation by recombinant human tissue factor. ***Journal of Veterinary Emergency Critical Care***, v.101, n.13, p. 19-96. 2009
[doi:10.1111/j.1476-4431.2008.00381.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00381.x)

EVANS, D.L., HARRIS, R.C., SNOW, D.H. Correlation of Racing Performance with Blood Lactate and Heart Rate After Exercise in Thoroughbred Horses. ***Equine Veterinary Journal***, v.25, n.5, p.441- 445. 1993.
[doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb02987.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb02987.x)

EVANS, D.L. Overview of Equine Exercise Physiology and Biochemistry. In: **EVANS, D. L. (Ed.) Training and Fitness in Athletic Horses. Rural Industries Research and Development Corporation**, 2000. cap. 2, p.10-32.

FAIS, R., LÉGER, B., VESIN, J.M., FOURNIER, P.E., EGCEL, Y., DÉRIAZ, O., MILLET, B.P. Significant molecular and systemic adaptations after repeated sprint training in hypoxia. ***PLoS ONE***, v.8, n.2, p. 565-622. 2013.
doi.org/10.1371/journal.pone.0056522

FALASCHINI, A., TROMBETTA, M. Modifications induced by training and diet in some exercise-related blood parameters in young trotters. ***Journal of Equine Veterinary Science***, v.21, n.12, p. 601-604. 2001.
[doi.org/10.1016/S0737-0806\(01\)80021-6](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(01)80021-6)

FALLON, K. E. The acute phase response and exercise: the ultramarathon as prototype exercise. ***Clinical Journal of Sport Medicine***, v.11, n.1, p.38-43. 2001.

FAO, IFAD, OECD IMF, and WFP UNCTAD. "the World Bank, the WTO, IFPRI and the UN HLTF (2011)." ***Price Volatility in Food and Agricultural Markets: Policy Responses***. Rome, FAO (2011).

FAVIER, F.B., BRITTO, F.A., FREYSSENET, D.G., BIGARD, A., BENOIT, H. HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v.72, n. 24, p. 4681–4696. 2015.

FAZIO, F., ASSENZA, A., TOSTO, F., CASELLA, S., PICCIONE, G., CAOLA, G. Modifications of some acute phase proteins and the white blood cell count in thoroughbreds. ***Veterinary Record***, v.167, p.370-372, 2015.
[doi: 10.1136/vr.c3761](https://doi.org/10.1136/vr.c3761)

FERGUSON, E.W., BERNIER, L.L., BANTA, G.R., YU-YAHIRO, J., SCHOOMAKER, E.B. Effects of exercise and conditioning on clotting and fibrinolytic activity in men. ***Journal Applied Physiology***, v.62, n.4, p.1416-1421. 1987.

FERREIRA, C.N., SOUSA, M.O., DUSSE, L.M.S., CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. ***Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia***, v.32, n.5. 2010.
doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016

FONSECA, R.G., KENNY, D.A., HILL, E.W., KATZ, L.M. The relationship between body composition, training and race performance in a group of Thoroughbred flat racehorses. ***Equine Veterinary Journal***, v.45, n.5., p.552-557. 2013.
[doi: 10.1111/evj.12024.](https://doi.org/10.1111/evj.12024)

FRAIPOINT, A., VAN ERCK, E., RAMERY, E., RICHARD, E., DENOIX, J. M., LEKEUX, P. & ART, T. Subclinical diseases underlying poor performance in endurance horses: diagnostic methods and predictive tests. ***Veterinary Record***, v. 6, 154-169. 2011.
[doi: 10.1136/vr.d4142.](https://doi.org/10.1136/vr.d4142)

FRENETTE, P.S., JOHNSON, R.C., HYNES, R.O. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v.92, n.16, p.7450-7454. 1995.

FUKUDA, R., ZHANG, H., KIM, J.W., SHIMODA, L., DANG, C.V., SEMENZA, G.L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. ***Cell***, v.129, n.1, p.111-122. 2007.
doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.047

GRAYS, A.J; BISHOP, J.E; REEVES, J.T; MECHAM, R.P; LAURENT, G.J. Partially degraded fibrin(ogen) stimulates fibroblast proliferation in vitro. ***American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology***, v. 12, n. 6, p. 684–690, 1995.

GENTRY, P., BURGESS, H., WOOD, D., KANECO, J. J., HARVEY, J.W., BRUSS, M. L. Hemostasis. ***In: Clinical biochemistry of domestic animals***. 6. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2008. Chap. 10, p. 287-330.

GETZ, T. M., PIATT, R., PETRICH, B. G., MONROE, D., MACKMAN, N., BERGMAN, W. Novel mouse hemostasis model for real-time determination of bleeding time and hemostatic plug composition. ***Journal of Thrombosis and Haemostasis***, v.13, n.3, p.1–9. 2015.
[doi:10.1111/jth.12802](https://doi.org/10.1111/jth.12802)

GIORDANO, A., MEAZZA, C., SALVADORI, M., PALTRINIERI. Thromboelastometric profiles of horses affected by exercise-induced pulmonary haemorrhages. ***Veterinary Medicine International***, v.30, n.2, p.1-6. 2010.
[doi:10.4061/2010/945789](https://doi.org/10.4061/2010/945789).

GOMIDE, L.N.W., MARTINS, C.B., ORZCO, A.G., SAMPAIO, R.C., BELLI, T., BALDISSERA, V., NETO-LACERDA, J.C. Concentrações sanguíneas de lactato em eqüinos durante a prova de fundo do concurso completo de equitação. ***Ciência Rural***, v.36, n.2, p.509-513. 2006.

GOSH, M., CHO, M.G., PARK, J.W., CHOI, J.Y., CHUNG, Y.H., SHARMA, N., SINGH, A.K., KIM, N.E., MONGRE, R.K., HUYNH, D., JIAO, Z.J., LEE, H.K., SONG, K.D., CHO, B.W., JEONG, D. Comparative Transcriptomic Analyses by RNA-seq to Elucidate Differentially Expressed Genes in the Muscle of Korean Thoroughbred Horses. ***Apply of Biochemistry and Biotechnology***, v.180, n.3., p.588-608. 2016.
[doi:10.1007/s12010-016-2118-4](https://doi.org/10.1007/s12010-016-2118-4)

GUEDES, P.E., OLIVEIRA, T.N., CARVALHO, F.S., CARLOS, R.S., ALBUQUERQUE, G.R., MUNHOZ, A.D., WENCESLAU, A.A., SILVA, F.L. Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. ***Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária***, v.24, n.2, p. 115-121, 2015.

GU, J.N., PARK, S.D., KATZ, L.M., SULIMOVA, G. A Genome Scan for Positive Selection in Thoroughbred Horses. ***PLoS ONE***, v,4, n.6, p.57- 67. 2009.
[doi:10.1371/journal.pone.0005767](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005767).

GUNTHER, A., MOSAVI, P., HEINEMANN, S. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia: comparison with the acute respiratory distress syndrome. ***American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine***, v.161. n.2, p.454-462. 2000.
[doi: 10.1164/ajrccm.161.2.9712038](https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.9712038).

GRINELL, F; FELD, M; MINTER, D. Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). ***Cell***, v. 19, n. 2, p. 517–525, 1980.

HANEL, R.M.; CHAN, D.L.; CONNER, B.; GAUTHIER, V.; HOLOWAYCHUK, M.; ISTVAN, S.; WALKER, J.M.; WOOD, D.; GOGGS, R.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. ***Journal of Veterinary Emergency and Critical Care***, v.24, n.1, p. 47-56, 2014.
[doi.org/doi:10.1111/vec.12145](https://doi.org/10.1111/vec.12145).

HARKINS, J. D.; TOBIN, T. Racing horses, nitro-glycerine and EIPH. ***Equine Veterinary Journal***, v.27, p.240-241. 1995.
[doi: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb03069.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1995.tb03069.x)

HARRIS, P.A.; HARRIS, R.C. Nutritional ergogenic aids in the horse – uses and abuses. In: **CONFERENCE ON EQUINE SPORTS MEDICINE AND SCIENCE**, 1998, Cordoba, Espanha. Anais... The Netherlands: Wageningen Pers, 1998. 272p. p.203-218.

HEATH, M.F., EVANS, R.J., POOLE, A.W., HAYES, L.J., McEVOY, R.J., LITTLER, R.M. The effects of aspirin and paracetamol on the aggregation of equine blood platelets. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy**, v. 17 n. , p.374-378. 1994.
DOI: [10.1111/j.1365-2885.1994.tb00262.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1994.tb00262.x)

HIIL, E.W., EIVERS, S.S., McGIVINEY, B.A., FONSECA, R.G., GU,J., SMITH, N.A., BROWNE, J.A., MACHUGH, KATZ, L.M. Moderate and high intensity sprint exercise induce differential responses in *COX4I2* and *PDK4* gene expression in Thoroughbred horse skeletal muscle. **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.38, p.576-581. 2010.
doi: [10.1111/j.2042-3306.2010.00206.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00206.x)

HINCHCLIFF, K.W; MUIR, W.W. Pharmacology of Furosemide in the Horse: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, p.211-218. 1991.
doi: [10.1111/j.1939-1676.1991.tb00951.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1991.tb00951.x)

HINCHCLIFF, K. W. Counting red cells-is it an Answer to EIPH. **Equine Veterinary Journal**, v.32, p.979-984. 2000.
doi: [10.2746/042516400777591084](https://doi.org/10.2746/042516400777591084)

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

HINCHCLIFF, K.W., MORLEY, P.S., GUTHRIE, A.J. Efficacy of furosemide for prevention of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred racehorses. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.235, n. , p. 76–82. 2009.
doi:[10.2460/javma.235.1.76](https://doi.org/10.2460/javma.235.1.76).

HINCHCLIFF, K.W., MORLEY, P.S., JACKSON, M.A. Risk factors for exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*,v.42, n.23, p.228–34. 2010.
doi:[10.1111/j.2042-3306.2010.00245.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00245.x).

HINCHCLIFF, K.W., COUETIL, L.L., KNIGHT, P.K., MORLEY, P.S. ROBINSON, N.E. SWEENEY, C.R., VAN-ERCK, E. Exercise Induced Pulmonary Hemorrhage in Horses: American College of Veterinary Internal Medicine Consensus Statement. **Veterinary Clinical North America: Equine practice**, v. 3, n.12, p. 187-198. 2015.
doi.org/[10.1111/jvim.12593](https://doi.org/10.1111/jvim.12593).

HIRAGA, A., SUGANO, S. Studies on exercise physiology and performance testing of racehorses performed in Japan during the 1930s using recovery rate as an index. **Journal of Equine Science**, v.27, n.4, p.131-142. 2016.
doi: [10.1294/jes.27.131](https://doi.org/10.1294/jes.27.131)

HOPPELER, H., KLOSSNER, S., VOGT, M. Training in hypoxia and its effects on skeletal muscle tissue. **Scandinavia Journal Medicine Science Sports Supply**, v.1, n. p.38-49. 2008.
doi: [10.1111/j.1600-0838.2008.00831.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2008.00831.x)

HULTEN, C., TULAMO, R.M., SUOMINEN, M.M., BURVALL, K., MARHAUG, G., FORSBERG, M. A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.68, n.2, p. 267-281. 1999.

IDELL, S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 31,n. 4, p. 213–220, 2003.

JOHANSSON, P., STISSING, T., BOCHSEN, L., OSTROWSKI, S. Thrombelastography and tromboelastometry in assessing coagulopathy in trauma. **Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine**, v.17, n.1, p. 123-143. 2009.
doi:[10.1186/1757-7241-17-45](https://doi.org/10.1186/1757-7241-17-45)

JONES, W.E. What do we know today about EIPH? **Journal of Equine Veterinary Science**. v.23, n.6, p.283-84. 2003.
doi.org/[10.1053/jevs.2003.80](https://doi.org/10.1053/jevs.2003.80).

JUNGE, H.K.; RINGER, S.K., MAYER, N., COLIN, C.S. Assessment of method reliability and determination of reference intervals for rotational thromboelastometry in horses. **Journal of Veterinary Emergency and Critical care**, v.26, n.5, p. 691-703. 2016.
doi: [10.1111/vec.12515](https://doi.org/10.1111/vec.12515).

KEDZIERSKI, R.M., YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annals Review Pharmacology and Toxicology**, v.41, n.12, p.851-876.2001.
doi.org/[10.1146/annurev.phamtox.41.1.851](https://doi.org/10.1146/annurev.phamtox.41.1.851).

KINDING, C.A., McDONOUGH, P., FENTON, G., POOLE, D.C., ERICKSON, H.H. Efficacy of nasal strip and furosemide in mitigating EIPH in Thoroughbred horses. **Journal Apply Physiology**, v.91, v.3, p.1396- 400. 2001.

KING, C. EIPH: Rational approach to therapy. **Journal of equine Veterinary science**, v.15, n.1, p.7-12. 1995.
doi.org/[10.1016/S0737-0806\(07\)80562-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(07)80562-4)

KNYCH, H.K., VALE, A., WILSON, W.D., KASS, P.H., ARTHUR, R.M., JONES, J.H. Pharmacokinetics of furosemide administered 4 and 24 hours prior to high-speed exercise in horses. *Journal of Pharmacology and Therapy*. doi:10.1111/jvp.12458

KIM, H., LEE, T., PARK, W., LEE, J.W., KIM, J., LEE, B. Y., AHN, Y., MOON, S., CHO, S., DO, K.T., KIM, K. T., LEE, H. S., LEE, H. K., KONG, C. K., YANG, H. S., PARK, Y. M., KIM, J., KIM, H. M., HWANG, B. C., BHAK, S., BURT, J., PARK, D., CHO, K.D.B.W., Kim, H. Peeling back the evolutionary layers of molecular mechanisms responsive to exercise-stress in the skeletal muscle of the racing horse. *DNA Research*, v.20, n.3, p.287–298. 2013. doi: 10.1093/dnares/dst010.

KOEDAM, J.A., CRAMER, E.M., BRIEND, E., FURIE, B., WAGNER, D.D. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *The Journal of Cell Biology*, v.116, n.3, p. 617-625. 1992.

KOL, A., BORJESSON, D.L. Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, v.39, n.4, p.405-416. 2010. doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00263.x

KNOTTENBELT, D.C., PASCOE, R. Afecções e distúrbios do cavalo. São Paulo: Editora Manole. 1998.

LABROCINI, R.A. A pureza do sangue híbrido: os bastidores do turfe para a produção de cavalos e homens de corrida. *Iluminuras*, V.17, n.41, p.447-460. 2016.

LACOMBE, V.A., HINCHCLIFF, K.W., GEOR, R.J., BASKIN, C.R. Muscle glycogen depletion and subsequent replenishment affect anaerobic capacity of horses. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, n.4, p. 1782-1790. 2001.

LACOMBE, V.A., HINCHCLIFF, K.W., TAYLOR, L.E. Interactions of substrate availability, exercise performance, and nutrition with muscle glycogen metabolism in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.223, n.11, p. 1576-1585. 2003. doi.org/10.2460/javma.2003.223.1576

LANGDORF, J.L., THOMSON, P.C., KNIGHT, P.K. Epistaxis in racehorses: risk factors and effects on career. *Australian Veterinary Journal*, v.91, n.13, p. 198-203. 2013. doi: 10.1111/avj.12049.

LAPORTE, J. M., A. VRINS, E. McCARVULL. A survey of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Quebec Standardbreds racehorses. *Equine Veterinary Journal*, v.6, p. 482-485. 1994.

LEME, F.O.P., WURZINGER, L., ALVES, G.E.S., COSTA-VAL, A.P., PINOTTI, M.B., PAES, P.R.O., OLIVEIRA, M.E.B.C. Inibição e reversão da agregação plaquetária de eqüinos in vitro com o uso de ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.10, p. 803-808. 2009. doi.org/10.1590/S0100-736X2009001000005.

LIPPI, G., MAFFULLI, N. Biological influence of physical exercise in hemostasis. **Seminars Thrombosis Hemostasis**, v.35, n.3, p. 269-276. 2009. doi.org/10.1055/s-0029-1222605.

LEVI, M., POLL, T.V. Inflammation and coagulation. **Critical Care Medicine**, v.38, n2, p.26-34. 2010.

LÓPEZ, A., MARTINUZZO, M., TAIE, F.F., BARRERA, L.H., D'AMOT, M.A., OTASO, J.M., OYHAMBURU, J. Thromboelastometry ROTEM® delta vs. Thromboelastography and classical hemostasis tests. **Acta bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.50, n.2, p. 309-318. 2016.

LUDDINGTON, R.J. Thrombelastography/thromboelastometry - Review. **Clinical Laboratory Haematology**, v.27, n.2, p.81-90. 2005. doi.org/10.1002/14651858.CD007871

MANOHAR, M., GOETZ, T.E., SULLIVAN, E., GRIFFIN, R. Pulmonary vascular pressures of strenuously exercising Thoroughbreds after administration of varying doses of frusemide. *Equine Veterinary Journal*, v.29, n.4, p. 298-304. 1997. [doi.org/doi:10.1111/j.2042-3306.1997](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997)

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. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/1997/Manohar.pdf>>. Acesso em: 2 maio 2017.

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

MANOHAR, M., GOETZ, T.E., ROTHENBAUM, P. Clenbuterol administration does not enhance the efficacy of furosemide in attenuating the exercise-induced pulmonary capillary hypertension in Thoroughbred horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.23, n.6, p.389–395. 2000. [doi:10.1111/j.1365-2885.2000.00293.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2000.00293.x)

MANOHAR, M.; GOETZ, T. E.; ROTHENBAUM, S. Clenbuterol administration does not attenuate the exercise-induced pulmonary arterial, capillary or venous hypertension in strenuously exercising Thoroughbred horses. **Equine Veterinary Journal**, v.32, n.6, p.546-50. 2000. [doi: 10.2746/042516400777584604](https://doi.org/10.2746/042516400777584604)

MANON-JENSEN, T., KJEELD, N.G., KARSDAL., M.A. Collagen-mediated hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.14, n.3, p.438-448. 2016.

[doi: 10.1111/jth.13249.](https://doi.org/10.1111/jth.13249)

MARSCHNER, C.V., BJORNVAD, C.R., KRISTENSEN, A.T., WIIBERG, B. Thromboelastography results on citrated whole blood from clinically healthy cats depends on modes of activation. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, n.38, p. 1-5. 2010.

doi.org/10.1186/1751-0147-52-38

MORLEY, P.S., BROMBEREK, J.L., SAULEZ, M.N., HINCHCLIFF, K.W., GUTHRIE, A.J. Exercise-induced pulmonary haemorrhage impairs racing performance in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v.47, n.34, p. 358-365. 2015.

[doi: 10.1111/evj.12368.](https://doi.org/10.1111/evj.12368)

McGIVNEY, B.A., McGETTINGAN, P.A., BROWNE, J.A., EVANS, A.C., FONSECA, R.G., LOFTUS, B.J., LOHAN, A., Machugh, d.e., murphy, b.a., katz, L.M., HILL, E.W. Characterization of the equine skeletal muscle transcriptome identifies novel functional responses to exercise training. **BMC Genomics**, v.11, p.398 . 2010.

doi.org/10.1186/1471-2164-11-398

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

[doi: 10.1111/j.1751-0813.1993.tb06072.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb06072.x)

McKEEVER, K.H., ANTAS, L.A., KEAMS, C.F. Endothelin response during and after exercise in horses. **The Veterinary Journal**, v.164, n.1 , p.38-46. 2002.

doi.org/10.1053/tvjl.2002.0706

McMICHAEL, M., Primary hemostasis. **Journal of Veterinary Emergency Critical Care (San Antonio)**, v.15, n.1, p.1-8. 2005.

[doi: 10.1111/j.1476-4431.2005.04021.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2005.04021.x)

McMICHAEL, M. A., SMITH, S. A. Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40, n.2, p.140–153, 2011.

[doi:10.1111/j.1939-165X.2011.00302.x.](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00302.x)

MYLONAKIS, M.E., XENOULIS, P.G., THEODOROU, K., SIARKOU, V.I., STEINER, J.M., HARRUS, S., RALLIS, T., SUCHODOULSKI, J.S., KOUTINAS, A.F. Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity in experimentally induced and naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **Veterinarian Microbiology**, v.14, n.169, p. 198-202, 2014.

NAHAHISA, H., MUKAI, K., OHMURA, H., TAKAHASHI, T., MIYATA, H. Effect of High-Intensity Training in Normobaric Hypoxia on Thoroughbred Skeletal Muscle. ***Oxidative Medicine and Cellular Longevity***, v. 47, p. 324-331. 2016.
[doi:10.1155/2016/1535367](https://doi.org/10.1155/2016/1535367)

NAKSTAD, B., LYBERG, T., SKJONSBORG, O.H., BOYE, N. P. Local activation of the coagulation and fibrinolysis systems in lung disease. ***Thrombosis Research***, v.57, n.6, p. 827-838. 1990.
[doi: 10.1016/0049-3848\(90\)90150-b](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90150-b).

NEWTON, J.R., WOOD, J.L., MARLIN, D.J. Evidence of an association between inflammatory airway disease and EIPH in young Thoroughbreds during training. ***Equine Veterinary Journal Supply***, v.34, n.23, p.417–424. 2002.
[doi:10.1111/j.2042-3306.2002.tb05459.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2002.tb05459.x)

NEWTON, J.R., ROGERS, K., MARLIN, D.J. 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, n.11, p.402–411. 2005.

NYARKO, K.A., COOMBER, B.L., MELLORS, A., GENTRY, P.A. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. ***Veterinary Microbiology***, v.61, n.61, p.81-91. 1998.
[doi: 10.1016/S0378-1135\(98\)00171-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00171-0)

OHMURA, H., MUKAI, K., TAKAHASHI, T., AIDA, H., JONES, J.H. Cardiorespiratory function in Thoroughbreds during locomotion on a treadmill at an incline or decline. ***American Journal of Veterinary Research***, v.78 n.3, p. 340-349. 2017.
[doi: 10.2460/ajvr.78.3.340](https://doi.org/10.2460/ajvr.78.3.340).

OTAKA, J.N.P., SILVA, K.M., JORGE, M.L.A.L., GONÇALVES, A.P., OTAKA, D.Y., LESSA, D.A.B. Ocorrência de Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Exercício em cavalos de Pólo na cidade do Rio de Janeiro/RJ. ***Archives of Veterinary Science***, v.19, n.2, p. 84-87. 2014.
[doi:10.5380/avs.v19i2.33986](https://doi.org/10.5380/avs.v19i2.33986)

PALTRINIERI, S., MEAZZA, C., GIORDANO, A., TUNESI, C. Validation of thromboelastometry in horses. ***Veterinary Clinical Pathology***, v.37, n.3, p.277-285. 2008.
[doi:10.1111/j.1939-165X.2008.00052.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00052.x)

PASA, S., URAL, K., GULTEKIN, M. Interpretation of Coagulation Tendency Contributing to Thrombosis in Vector-Borne Diseases (Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Leishmaniosis, and Dirofilariosis) among Dogs. ***Acta Scientiae Veterinariae***, v. 45, p. 1445-1451. 2017.

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, n.5, p. 703-707. 1981.

PASCOE, J. R. Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage (EIPH). In: BECCH, J. **Equine Respiratory Disorders**, p. 237-252. 1991.
doi: 10.1111/j.1939-165X.2008.00052.x.

PADILLA, D.J., EPP, T.S., McDONOUGH, P., MARLINS, D.J., ERICKSON, H. H., POOLE, D.C. Effects of a specific endothelin-1 A antagonist on exercise-induced pulmonary haemorrhage (EIPH) in Thoroughbred horses. **Equine Veterinary Journal Supply**, v.36, n. 12, p. 198-203. 2006.
doi:10.1111/j.2042-3306.2006.tb05539.x

PALTRINIERI, S., MEAZZA, C., GIORDANO, A., TUNESI, C. Validation of thromboelastometry in horses. **Veterinary Clinical Pathology**, v.37, n.3, p.277-285. 2008.
doi:10.1111/j.1939-165X.2008.00052.x.

PENG, H.T., RHIND, S.G. Thromboelastographic Study of Psychophysiological Stress: A Review. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 21, n. 6, p. 497–512. 2016.
doi: 10.1177/1076029613512415.

PEPYS, M.B., BALTZ, M.L., TENNENT, G.A., OUSEY, J., ROSSDALE, P.D. Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. **Equine Veterinary Journal**, v.21, n.2, p.106-109. 1989.
doi: 10.1111/j.2042-3306.1989.tb02108.x

PEREIRA, L.P., REGATIERI, I.C., FERRAZ, G.C., NETO, A.Q., CURI, R. A. Perspectiva do uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de equinos de corrida da raça Quarto de Milha. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, p. 347-369. 2015.

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

PETERSEN, H.H., NIELSEN, J.P., HEERGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, n.2, p.163–187. 2004.
doi.org/doi:10.1051/vetres:2004002.

PINTADO, C.O., FRIEND, M., LLANES, D. Characterization of a membrane receptor on ruminants and equine platelets and peripheral blood leukocytes similar to the human integrin receptor glycoprotein IIb/IIIa (CD41/61). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.44, n.22, p. 359-368. 1995.
DOI: 10.1016/0165-2427(94)05310-O

PIOTTO, J.R.S. B. Hemorragia pulmonar induzida por esforço. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária + Equina**, v.1, n.3, p.22-25. 2006.

POLL, T.V., BOER, J.D., LEVI, M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 12, p. 273-278. 2011.

REININGER, A., KORNDORFER, M.A., WURZINGER, L.J. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. **Thrombosis and Haemostasis**, v.70, n.5, p.998-1003. 2009.

RICHARD, E.A., FORTIER, G.D., PITEL, P.H., DUPUIS, M.C., VALETTE, J. P., ART, T., DENOIX, J.M., LEKEU, P.M., ERCK, E.V. Sub-clinical diseases affecting performance in Standardbred trotters: diagnostic methods and predictive parameters. **The Veterinary Journal**, v.184, n.3, p.282–289. 2010. doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.016.

ROGERS, B. (2013). Australian Racing Board investigates hypoxic training. **Performance Genetics**, Disponível em: www.performancegenetics.com/single-post/2014/04/08/

ROSE, R.J., HODGSON, D.R. Structural Considerations in Equine Sports Medicine - Hematology and Biochemistry. In: **The Athletic Horse**. W. B. Saunders Company, 1994. 497 p, seção 1, cap. 5, p. 63-78.

ROSENBLUM, W.I. Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. **Journal of Vascular Research**, v.34, n.6, p.409-417. 1997. doi.org/10.1159/000159251

ROTEM® Delta. Sistemas de Hemostasis basados en tromboelastometría. Manual del Usuario. Versión del manual: 2.2.0.01.ES . TemInnovations GmbH. Munich, Alemania. Patentes: DE4437 475 C1, US5777215 A, WO96/12954, 2013.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, n.7, p. 1335-1342. 2003.

PICCIONE, G., FAZIO, F., GIUDICE, E. Nycthemeral change of some haematological parameters in horses. **Journal of Applied Biomedicine**, v.3, n.2, p.123– 128. 2005.

SAINZ, A., ROURA, X., MIRÓ, G., ESTRADA-PEÑA, A., KOHN, B., HARRUS, S., SOLANO-GALLEGO, L. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasitology Vectors**, v.4, n.8. p.188-203, 2015.

SANTIAGO, J.M., ALMEIDA, F.Q., SILVA, L.L.F., MIRANDA, A.C.T., AZEVEDO, J.F., OLIVEIRA, C.A.A., CARRILHO, S.S. Hematologia e bioquímica sérica de equinos de concurso completo de equitação em treinamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.383-392. 2013.
doi: 10.1590/S0102-09352013000200013

SCHMECT, J., KRAFFT, P., GROSCHLER, P., HELLER, A., NEUHOF, H., ACKERN, K., KOCH, T. Characterization and distribution of endothelin receptors in the pulmonary circulation: investigation of isolated, perfused and ventilated rabbit lungs. **Shock**, v.12, n.3 p.247-254. 1999.

SILVA, K., OTAKA, J.N.P., JORGE, M.L.L., GONÇALVES, C.A.P., ALENCAR, N.X., LESSA, D.A.B. Escore de hemossiderina em citologia de lavados traqueais para avaliação da hemorragia pulmonar induzida por esforço em cavalos de pólo após o exercício. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.2, p. 15-23. 2012.
doi.org/10.5380/avs.v17i2.24805

SMITH, J.M., MEYERS, K.M., BARBEE, D.D., BAYLY, W.M. Plasma von Willebrand factor in thoroughbreds in response to high-intensity treadmill exercise. **American Journal Veterinary Research**, v.58, n.1, p.71-76. 1997.

SMITH, S.A. Overview of Hemostasis. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 6.ed. Iowa: Blackwell Publishing, cap. 84, p. 635-653. 2010.
doi:10.1092/50UQGUPFW6XW1X7B.

SCIPIONI, H.L.; CUTAIN, A.G.; SMETANA, A.; PETRONE, N.J.; ROCCATAGLIATA, C.A. Estudio estadístico de la hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio de sangre pura de carrera en la Republica Argentina. In: **Anais do Congresso de La Asociación Mundial De Veterinaria Equina**, v.8. CONGRESO NACIONAL DEL TURF, Buenos Aires, 2003. p.178-182.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Hemostasia. In: **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap. 5, p.213-262.

STOKOL, T., ERB, H.N., De Wild, L. Evaluation of latex agglutination kits for detection of fibrin(ogen) degradation products and D-dimer in healthy horses and horses with severe colic. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.4, p.375-382. 2005.
doi:10.1111/j.1939-165X.2005.tb00064.x

SUCKER, C., ZOTZ, R.B., SENFT, B., RUDIGER, E., KROGER, K., ERBEL, R., MOHLENKAMP, S. Exercise-Induced Hemostatic Alterations Are Detectable by Rotation Thrombelastography (ROTEM): A Marathon Study. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 16, n. 5, p. 543-548. 2010.
doi: 10.1177/1076029609342091.

SULLIVAN, S., HINCHCLIFF, K. Update on exercise-induced pulmonary haemorrhage. ***Veterinary Clinics of North America: Equine Practice***, v.31, n.1, p.187-198. 2015(a).
[doi:10.1016/j.cveq.2014.11.011](https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.011).

SULLIVAN, S.L., WHITTEN, T., MORLEY, P.S., HINCHCLIFF, K.W. A systematic review and meta-analysis of furosemide for exercise induced pulmonary haemorrhage in thoroughbred and standardbred racehorses. ***Equine Veterinary Journal***, v.47, p.341-349. 2015(b).
[doi:10.1111/evj.12373](https://doi.org/10.1111/evj.12373).

SWEENEY, C. R.; REILLY, L. K. Sistema Respiratório. ***In: Segredos em Medicina de Equinos***. Porto Alegre: Artmed, 2001, p. 136-51.

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.

TYLER-McGOWAN, C. M., GOLLAND, L.C., EVANS, D.L., HODGSON, D R., ROSE, R.J. Haematological and Biochemical Responses to Training and Overtraining. Equine Exercise Physiology 5. ***Equine Veterinary Journal Supply***, v.31, n.30, p. 621-625. 1999.
[doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb05297.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb05297.x)

THOMAS, S. Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. ***Clinical Laboratory***, v.48, n.5, p. 247-262. 2002.

VERSTEEG, H.H., JOHAN, W.M., HEEMSKERK, M.L., REITSMA, P.H. New fundamentals in hemostasis. ***Physiology Reviews***, v.93, p. 327-358. 2013.
[doi:10.1152/physrev.00016.2011](https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011).

WATSON, M. Furosemide. ***Journal of Exotic Pet Medicine***, v. 20, n. 1, p.60-63, 2011.
doi.org/10.1053/j.jepm.2010.11.014

WEIDEMANN, H., SCHOEMAN, J., JORDAAN, G.F. Epistaxis related to exercise induced pulmonary haemorrhage in South African Thoroughbreds. ***Journal Suplly African Veterinary Association***, v.74, n.12, p.127–131. 2003.
[doi:10.4102/jsava.v74i4.525](https://doi.org/10.4102/jsava.v74i4.525)

WEISS D.J., EVANSON, O.A., McCLENAHAN, D., FAGLIARI, J.J., JENKINS, K. Evaluation of platelets activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. ***American Journal Veterinary Research***, v.58, n.12, p. 1376-1380. 1997.

WESTE, J.B., MATHIEU-COSTELLO, O., JONES, J.H. Stress failure of pulmonary capillaries in racehorses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. ***Journal of Applied Physiology***, v.75, n.3, p.1097–1109. 1993.

WILKIN, T., BAOUTINA, A., HAMILTION, N. Equine performance genes and the future of doping in horseracing. ***Drug Testing and Analysis***, v.33, n.23, p. 344-359. 2017.
[doi:10.1002/dta.2198](https://doi.org/10.1002/dta.2198).

5.OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos gerais

- ✓ Avaliar o perfil hemostático de equinos atletas com HPIE, pré e pós prova de turfe;
- ✓ Avaliar as três principais vias da coagulação (intrínseca, extrínseca e fibrinólise) por meio da tromboelasmterria e correlacionar os resultados com a contagem de plaquetas e testes de coagulação TP, TTPA e fibrinogênio, pré e pós exercício físico extenuante;

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar se o exercício agudo e extenuante é capaz de causar alterações no perfil hemostático de equinos atletas em campanha atletas, com HPIE, com e sem o uso de furosemida;
- ✓ Investigar a presença de quadros de hiperfibrinólise pré e pós prova;
- ✓ Investigar se esses animais apresentam quadros de hipo ou hipercoagulabilidade pré e pós exercício.

6.MATERIAL E MÉTODOS

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP/Botucatu – SP, sob o protocolo número 171/2014.

6.2 Seleção dos animais

Foram selecionados 26 equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) em campanha no Jockey Club Brasileiro (JCB) do Rio de Janeiro, sendo 6 fêmeas e 20 machos não castrados com idade entre 3 e 5 anos, com peso entre 488 e 583 quilos. Todos os animais possuíam histórico de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) e foram inseridos em programas de treinamento para percorrer distâncias entre 1.400, 1800 e 2.000 metros, avaliados nos momentos pré e pós exercício.

Animais diagnosticados com outras comorbidades, seja através do exame clínico, laboratorial ou ainda aqueles submetidos à protocolos medicamentosos (uso de antimicrobianos, antiinflamatórios esteroidais ou não esteroidais) foram excluídos do estudo para evitar vieses dentro dos resultados da pesquisa. Todos os equinos incluídos na pesquisa, tiveram suas amostras de sangue submetidas ao exame de reação em cadeia pela polimerase (PCR) contra *Ehrlichia* sp. e aqueles positivos, foram excluídos do estudo.

Durante o período experimental foi acordado que os animais não usariam nenhum medicamento além de furosemida. Os animais que participaram da pesquisa mantiveram o manejo de estabulação, receberam alimentação, água *ad libitum*, casqueamento e ferrageamento, além da rotina de nado, banho e exercícios preservada. As saídas dos animais para corridas externas ao JCB foram interrompidas durante o período experimental. Todos os cavalos participantes foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido para o uso de animais em pesquisa pelo

proprietário ou treinador responsável.

6.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para este estudo foram resultados positivos para *Anaplasma* spp. *Babesia* spp e *Ehrlichia* spp, administração de antiinflamatórios não-esteróides, corticosteróides, antibioticoterapia, alterações nos exames de triagem (hemograma e exame bioquímico).

6.3 Delineamento experimental

Os cavalos foram divididos em dois grupos e cada um foi seu próprio controle, uma vez que os mesmos foram submetidos aos mesmos testes em após diferentes tipos de tratamentos.

Para isso, dois grupos experimentais foram criados:

Grupo 1: Animais que realizaram corridas sem o uso de diurético,

Grupo 2: Animais que realizaram corridas com uso de diurético (Furosemida) na dose de 250mg/kg/IV, quatro horas antes da corrida (Fonte: Comitê nacional de corridas).

Durante o período experimental, cada animal do grupo 1 e 2 foi submetido duas vezes ao exercício extenuante (alta intensidade e curto espaço de tempo), sendo a primeira vez sem nenhum tratamento, a segunda vez sob uso de furosemida.

Um intervalo mínimo de 15 dias entre as avaliações dos dois grupos foi solicitado aos treinadores que cederam animais ao experimento, pensando na recuperação daqueles que apresentassem escores de sangramento superiores a 3. Aqueles que obtiveram graduação de sangramento no pós exercício igual ou superior a 3, quando o proprietário manifestou interesse, foram submetidos à nebulização com solução fisiológica, duas vezes por dia por cinco dias. Em caso de necessidade de incrementar antibiótico (gentamicina) ou antiinflamatório (Dimetilsulfóxido – DMSO) à nebulização, os animais foram excluídos dos respectivos grupos experimentais.

6.4 Das corridas

Todas as corridas foram realizadas respeitando o Código Nacional de Corridas do JCB. Os animais que participaram do estudo utilizaram a mesma sela e adereços usados em uma corrida habitual, assim como foram montados pelo mesmo joquei/joqueta nas duas repetições, para evitar variações de intensidade no exercício pela diferença pelo peso. A distância percorrida foi a mesma para cada animal durante os dois momentos.

Após o término da corrida, os joqueys conduziram os animais até o VETCORR (Departamento responsável pela liberação dos animais no dia das corridas, no JCB) onde a colheita de amostras e avaliações dos animais foram realizadas.

6.5 Avaliação dos animais

O médico veterinário avaliador dos parâmetros vitais e do sistema respiratório foi o mesmo para todos os animais, em todas as repetições do experimento e não era informado a qual tratamento o animal examinado estava submetido. A avaliação dos parâmetros vitais se deu pela auscultação das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), aferição da temperatura retal (TR), inspeção visual da coloração da mucosa oral e tempo de preenchimento capilar (TPC).

Os animais foram avaliados em três momentos (M0, M1 e M3) por meio de exame físico, coleta de sangue e avaliação endoscópica:

Momento 0 (M0): 30 minutos antes do exercício,

Momento 1 (M1): imediatamente após o exercício,

Momento 2 (M2): 30 minutos após o exercício,

Assim no M0 e M1, foram realizadas a avaliação clínica dos parâmetros vitais e do sistema cardiorespiratório, coleta de sangue para hemograma, perfil bioquímico ((ureia, creatinina, aspartato transaminase (AST), alanina transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamil transferase (GGT), proteína total sérica (PTS), albumina e lactato sérico nos momentos M0, M1 e M2. Para os testes de hemostasia TEM e para os testes clássicos como TP, TTPa e

fibrinogênio. Além disso os animais foram submetidos à avaliação endoscópica do trato respiratório superior.

6.6.1 Avaliação específica do trato respiratório

A avaliação específica do sistema respiratório se iniciou pela inspeção, do modo da atividade respiratória (eupnéia ou dispnéia), o tipo (costal, costo-abdominal ou abdominal), a amplitude (normal, superficial ou profunda) a coloração da mucosa nasal e presença de secreções nas narinas, e ainda a presença ou ausência do reflexo de tosse. Em seguida realizou-se ausculta dos campos laringo-traqueal, traqueo-brônquico e brônquio-bronquiolar para averiguar a presença ou não de ruídos patológicos.

6.6 Avaliação endoscópica do trato respiratório

A avaliação foi realizada nos momentos pré e pós exercício em todos os animais do estudo. As endoscopias e as imagens foram avaliadas sempre pelo mesmo avaliador sem que ele soubesse a qual grupo experimental o animal pertencia. A metodologia utilizada para tal metodologia foi descrita por PASCOE et al., 1981. Assim, o exame foi realizado através do uso de um colonofibroscópio, acoplado a uma câmera capaz de capturar e transmitir as imagens a um computador para que as mesmas fossem gravadas e posteriormente avaliadas.

Nenhum animal deste experimentado foi submetido a qualquer protocolo de contenção química. Sendo assim, após a contenção física, o endoscópio foi introduzido pelo meato nasal ventral da narina direita ou esquerda, aleatoriamente. Foram analisadas as estruturas anatômicas desde os meatos nasais até a bifurcação brônquica (carina). A avaliação semi-quantitativa para a presença de sangue foi avaliada para:

Grau 0: ausência de sangue aparente na traquéia;

Grau 1: traços de sangue na traquéia;

Grau 2: filete de sangue na traquéia;

Grau 3: sangue na traquéia em quantidade superior ao grau anterior;

Grau 4: presença abundante com acúmulo de sangue na traquéia;

Grau 5: hemorragia nasal ou presença de sangue abundante e acumulado na traquéia até a orofaringe;

6.7 Colheita das amostras de sangue

As coletas de sangue foram realizadas a partir das veias jugulares direita e/ou esquerda aleatoriamente. Todavia, para coleta de sangue no momento pós exercício, preconizou-se a colheita de sangue da veia jugular contrária aquela utilizada no momento pré exercício, para evitar alterações nos resultados das amostras de hemostasia.

Foram coletados aproximadamente 40mL de sangue para a realização das avaliações pré e pós exercício. Portanto, foram coletados 20mL de sangue em cada momento do experimento. Sendo apenas as coletas de sangue para análise do lactato sérico, colhidas 30 minutos após o exercício.

O sangue coletado para a hematologia (3mL), foi acondicionado em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA K3¹) a 7,5%. Para as análises bioquímicas¹ (5mL), o sangue foi acondicionado em tubos sem anticoagulante, e posteriormente centrifugados a 3000 rpm, para separação e congelamento do soro.

As amostras de plasma citratado foram destinadas aos testes de hemostasia realizados através do coagulômetro (4,5mL). As dosagens de lactato sérico¹ (4mL), foram acondicionadas em tubos contendo fluoreto de sódio. Ambas foram submetidas ao mesmo protocolo de centrifugação e permaneceram congeladas a temperatura de -80°C² até o processamento das amostras.

Para a tromboelastometria, foram colhidos 9 mL de sangue em tubos com citrato de sódio 3,2%¹ em temperatura ambiente. As análises da tromboelastometria foram processadas em até cinco minutos após a coleta de sangue total citratado.

¹ BD®, New Jersey, Estados Unidos.

² Sanyo® Ultra Low, Osaka, Japão.

6.8 Exames laboratoriais

6.8.1 Hemograma

O hemograma foi realizado em contador hematológico³. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células, com a avaliação da morfologia de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em esfregaços sanguíneos corados pelo corante panótico rápido.

6.8.2 Avaliação de bioquímica sérica

Os testes bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato transaminase (AST), alanina transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamil transferase (GGT), proteína total sérica (PTS) e albumina foram realizados em equipamento de bioquímica automatizada⁴ utilizando kits comerciais⁵.

6.8.3 Contagem de plaquetas

As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer, após diluição de 20µL de sangue total (EDTA K3) em 2mL da solução de Brecher.

6.9 Testes de hemostasia

Amostras de sangue total para o perfil de coagulação foram coletadas coletados por punção de veia jugular (agulha 40x12) e colocado em 2 tubos contendo 3,2% de citrato trissódico (1 parte de citrato: 9 partes de sangue). Qualquer interrupção no fluxo venoso durante a coleta ou ainda diversas tentativas sem sucesso ou ainda reposicionamento da agulha foram determinantes para que o vaso contralateral fosse o alvo da coleta subsequente.

³ Sysmex® - Poch-110 iV, Miami, Estados Unidos

⁴ Roche® - Cobas Mira Plus, Basileia, Suíça.

⁵ Katal®, Belo Horizonte, Brasil.

6.9.1 Tromboelastometria

A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM® Delta⁶ que mantém a amostra de sangue a temperatura de 37°C. Três canais diferentes (exTEM, fibTEM e inTEM), foram utilizados para a avaliação simultânea de cada amostra durante todo o período experimental, sendo o canal 1 para avaliação da via extrínseca (exTEM), canal 3 responsável pela avaliação da fibrinólise (fibTEM) e o canal 4 para a via intrínseca (inTEM). Em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado, recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio 0,2 mol/L, sendo que a ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal, empregando-se os seguintes reagentes: InTEM® (20µL, fosfolipídeos de tromboplastina parcial⁶), FIBTEM® (20µL tromboplastina tecidual e 20µL citocalasina⁶) e exTEM® (20µL, tromboplastina tecidual⁶).

Foram avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; ângulo α : velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo; ML (Lise máxima): medida do tempo para perda da resistência de um coágulo.

6.9.2 Coagulograma

A hemostasia secundária foi avaliada por meio de testes padrões como tempo de protrombina (TP), Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogênio, a partir do plasma citratado através de coagulometria (ClotTimer®⁷) em triplicata, utilizando os Kits específicos (Clot®⁷) para cada teste.

⁶ Pentapharm, Munique, Alemanha.

⁷ Laser Sensor, Sorocaba, Brasil.

6.10 Lactato plasmático

As colheitas das amostras foram realizadas em aparelho de análises bioquímicas semi automático (Celm SB-190⁸), utilizando kits para dosagem de lactato (Bioclin®⁹) para cada teste.

⁸ Celm SB – 190.

⁹ Bioclin®, Belo horizonte, MG, Brasil.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise através do Teste t (pareado) para amostras dependentes. Quando a normalidade ou a homogeneidade das amostras das variâncias falharam foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Em ambos os testes, o nível de significância foi de 5% ($p=0,05$). O programa estatístico utilizado para as análises foi o SigmaStat.

8.RESULTADOS

8. RESULTADOS

A ocorrência de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) foi diagnosticada nos 26 cavalos participantes desse estudo, totalizando o escore de sangramento em 100% desta população. Os animais foram seus próprios controles e houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os animais do grupo controle quando comparados ao grupo tratado (furosemida). A comparação do grau de sangramento entre os tratamentos encontra-se na tabela 2.

Os animais do grupo controle apresentaram graus de sangramento ≥ 2 . Assim, três animais apresentaram grau II (11,5%), 13 animais escore III (50%), oito animais o escore IV (30,8%) e dois animais apresentaram o grau máximo de sangramento (V) com manifestação de epistaxe (7,7%). Quando tratados com furosemida, os graus de sangramento foram inferiores aos do grupo controle, logo, quatro animais apresentaram grau I (15,3%), oito animais grau II (30,7%), 10 animais grau III (38,4%), um animal grau IV (3,8%) e três animais com grau V (11,5%).

Os valores obtidos através da tromboelastometria foram utilizados para comparação entre os resultados dos dois grupos em dois momentos, pré e pós exercício (Tabela3). No pré exercício, tanto o grupo controle quanto o grupo furosemida não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para a TEM. No momento pós exercício, as variáveis estatisticamente significativas nos três testes realizados através da TEM foram tempo de coagulação aumentado (CT), formação máxima do coágulo (MCF) e ângulo alfa ($A^\circ\alpha$) nos testes inTEM e exTEM, e $A^\circ\alpha$ no fibTEM, mostraram-se diminuídos indicando a fragilidade do coágulo (Tabela4).

O GC apresentou diferenças estatísticas na avaliação da

tromboelasmetria da via intrínseca (inTEM) nas variáveis formação máxima do coágulo (CFT) ($p<0,001$), ângulo alfa ($A^\circ\alpha$) ($p<0,001$), A10 ($p<0,001$), A20 ($p<0,001$) e formação máxima do coágulo (MCF) ($p<0,001$). Na avaliação da via extrínseca (exTEM) CFT ($p<0,001$), $A^\circ\alpha$ ($p<0,002$), A10 ($p<0,001$), A20 ($p<0,001$), MCF ($p<0,001$) e lise máxima (ML) ($p<0,001$) apresentaram alterações, enquanto a via fibrinolítica (fibTEM) A10 ($p<0,016$), A20 ($p<0,008$), MCF ($p<0,010$) e LM ($p<0,013$).

O GF também indicou alterações importantes nos parâmetros da TEM. Na via intrínseca (inTEM) nas variáveis tempo de coagulação aumentado (CT) ($p<0,002$), MCF ($p<0,001$), $A^\circ\alpha$ ($p<0,001$), A10 ($p<0,018$), A20 ($p<0,020$) e MCF ($p<0,001$). Na via extrínseca (exTEM) $A^\circ\alpha$ ($p<0,002$), A10 ($p<0,001$), A20 ($p<0,002$), MCF ($p<0,001$), enquanto a via fibrinolítica (fibTEM) apenas o $A^\circ\alpha$ ($p<0,007$) apresentou valor estatístico significativo.

Os valores obtidos para as variáveis de leucometria indicaram diferenças estatísticas dentro de cada grupo. Assim, a contagem total de leucócitos do GC ($p<0,001$), e os valores dos diferenciais tanto para neutrófilos ($p<0,001$) e linfócitos foram estatisticamente diferentes. No GF contagem total de leucócitos ($p<0,001$) e o número de neutrófilos ($p<0,001$) apresentaram diferenças estatísticas. Os valores das médias de leucometria entre os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Contudo, em 8 animais do grupo controle e 10 do grupo furosemida, foi observado uma linfocitose no momento pós corrida.

Quanto aos valores do eritrograma, as variáveis hematócrito, proteína total sérica e hemácias apresentaram diferenças estatísticas entre os dois grupos nos dois momentos avaliados, pré e pós exercício ($p<0,001$). Quantos

aos valores de hemácias ($p < 0,001$) (tabela 5), hematócrito ($p < 0,001$) (tabela 6), proteína total sérica ($p < 0,001$) (tabela 7) e plaquetas ($p < 0,001$) (tabela 8) do GC todos indicam que estatisticamente existem diferenças dentro do grupo. Quanto às mesmas variáveis, quando avaliadas no GF, hemácias ($p < 0,001$), hematócrito ($p < 0,001$) e proteína total sérica ($p < 0,001$) apresentaram diferença estatística.

Nos testes de TP, TTPa e fibrinogênio pré exercício, as principais alterações visualizadas entre os dois grupos, mostraram-se significativas na variável TTPa ($p = 0,04$). (Tabela 9). Enquanto no momento pós exercício, TP ($p < 0,001$) e fibrinogênio ($p < 0,001$) obtiveram maior significância estatística quando os dois grupos foram comparados. (Tabela 10). Quando as mesmas variáveis foram comparadas dentro dos GC e GF, não obtiveram diferenças estatísticas. Quando as mesmas variáveis foram comparadas dentro dos GC e GF, não obtiveram diferenças estatísticas.

Não houve diferença estatística em relação a contagem de plaquetas entre e dentro dos dois grupos no momento pré exercício. Foi observado após o exercício, em todos os animais com HPIE, que o número de plaquetas, foi menor quando comparado ao pré exercício ($p < 0,001$).

Os valores dos exames bioquímicos não apresentaram diferença estatística entre os grupos no pré exercício. Entretanto, pós exercício, as diferenças estatísticas foram observadas para ALT ($p = 0,03$) e AST ($p = 0,01$) (tabela 12) e creatinina (0,026) respectivamente.

Quanto às avaliações realizadas para o lactato, os animais foram avaliados em três momentos: pré exercício, imediatamente após e trinta minutos após o exercício. No momento pré exercício, os grupos não obtiveram alterações estatísticas significativas (tabela 13). Nos momentos imediatamente ($p = 0,013$) e

pós 30 minutos de prova ($p<0,001$) houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e o grupo tratado. As coletas realizadas após 30 minutos de corrida evidenciaram uma diminuição nos valores séricos de lactato. As diferenças dentro de cada grupo também foram avaliadas indicando que estatisticamente o lactato plásmático variou nos três momentos ($p<0,001$).

9.DISSCUSSÃO

9. DISCUSSÃO

Todos os 26 cavalos que participaram deste experimento obtiveram graus diferentes de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício. Segundo Hinchcliff, 2007, a HPIE ocorre com alta frequência em cavalos atletas do turfe e a severidade do quadro de sangramento pode ser um fator adicional ao comprometimento fisiológico e agravamento das lesões dependendo da frequência de provas que são disputadas.

Embora duas principais formas de diagnóstico sejam utilizadas para caracterizar a HPIE em equinos atletas, o uso da endoscopia de fibra ótica flexível neste estudo permitiu caracterizar em 100% dos animais quadros de sangramento imediatamente após a prova. As recomendações baseadas na literatura inferem que a realização do exame entre 30 a 90 minutos após exercício, é capaz de identificar sangramento em até 75% dos animais (SWEENEY & REILLY, 2001).

Mesmo que o uso de furosemida não tenha sua comprovação de eficácia, os resultados obtidos nesse estudo apontam que no grupo de animais que fez uso de diurético até quatro horas do início da corrida, em sua maioria, apresentaram quadros mais brandos de sangramento. Dos 26 animais que participaram desse estudo, no grupo furosemida, 11 animais (42%) apresentaram sangramento grau III e grau IV, enquanto no grupo controle, 19 animais (80%) apresentaram os mesmos escores de sangramento. Até o momento, apesar da discrepância entre os países da permissão ou não do uso de fármacos nos animais antes de competição, a furosemida é o fármaco mais utilizado para prevenir HPIE e retardar a progressão das lesões pulmonares (HINCHCLIFF, 2009).

Em um estudo recente, a eficácia da furosemida foi discutida e entre os principais conflitos que giram a cerca da problemática, os autores citam falhas de metodologia, erros em número amostral e problemas com análises estatísticas (SULLIVAN & HINCHCLIFF, 2015). Além dos problemas que envolvem o delineamento experimental, outros estudos informam que na América do Norte, por exemplo, o uso da medicação atinge 92% dos cavalos PSI corredores do turfe, fomentando um gasto de aproximadamente 400 mil doses/ano (HINCHCLIFF, 2005).

Os resultados da através da TEM, indicaram que não houve diferença estatística entre os grupos controle e furosemida no momento pré corrida. Isso pode ser justificado uma vez que os abalos sofridos pelo início do treinamento já estão amenizados nesta etapa tendo em vista que os animais desse estudo estão na carreira atlética há pelo menos um ano. Assim, os danos iniciais causados pelos programas de treinamento, que consistem na fase de adaptação, não são mais visualizados nessa etapa da carreira atlética. As principais alterações verificadas nas reações mediadas pelo inTEM, exTEM e fibTEM demonstram o envolvimento das vias intrínseca, extrínseca e fibrinolise nos dois grupos após o exercício. O prolongamento do tempo de coagulação (CT) tanto em exTEM como em inTEM, sugeriu um quadro de anticoagulação, provavelmente relacionado à baixa interação entre dos fatores de coagulação durante o processamento das amostras pós corrida. As outras duas variáveis que sofreram alterações foram, a firmeza máxima do coágulo (MCF), que apresentou um encurtamento que pode estar relacionado a uma deficiência no substrato de coagulação que pode estar relacionada ao fibrinogênio e /ou plaquetas, e o ângulo α ($A^\circ\alpha$), que por sua vez caracterizou o quadro de

hipocoagulabilidade. Os resultados obtidos nesse estudo são diferentes daqueles encontrados por Giordano et al., 2010, que a partir da avaliação de cavalos com HPIE demonstrou a possibilidade dos mesmos apresentarem quadros de hipercoagulação pré e pós corrida. Os autores citam ainda que os resultados do estudo não permitem entender quais são as causas ou mecanismos envolvidos no quadro de hipercoagulabilidade, uma vez que diferenças nos testes de TP e TTPa não foram verificados e os animais não apresentavam hiperfibrinogenemia na avaliação pré corrida.

Os resultados obtidos para o tempo de protrombina (TP - via extrínseca), foram estatisticamente significativos nesse trabalho e estão de acordo com aqueles apresentados pelo CT das análises da TEM. Contudo, Johnstone et al., (1991), afirmam que em cavalos com HPIE, a hemostasia pode ser ativada mesmo que os valores de TP e TTPa estejam normais para a espécie. Tais testes, dependem de inúmeros fatores que não substituem a especificidade da avaliação pela tem TEM. Ainda sobre os testes convencionais, segundo Paltrinieri et al., (2008), cavalos de corrida quando comparados à outras espécies, apresentam valores de TP diminuído, TTPa e fibrinogênio aumentados, bem como aumento na atividade dos fatores I, II, V, e X. Esses resultados corroboram também com os encontrados nesse estudo para os valores de fibrinogênio pós corrida. Durante a realização dos testes de coagulação, a atividade fibrinolítica pós exercício apresentou-se superior após a corrida.

Todos os resultados obtidos nesse estudo através de refratometria para o fibrinogênio estiveram dentro dos valores de referência nos momentos pré e pós

prova (100-400 mg/dL). Logo, foi possível compreender que todos os animais já estavam adaptados ao treinamento.

O Fb apresenta um papel funcional muito importante na fase inicial do treinamento em cavalos atletas, e está intimamente relacionado à intensidade de carga que o exercício demanda, tipo de pista, duração e percurso da prova (BHATTI & SHAIKH, 2007; FAZIO et al., 2015). Assim, suas concentrações aumentaram moderadamente frente ao estímulo inflamatório causado pelo exercício (HULTÉN et al., 2002).

Durante o período de treinamento, conhecido também como fase de adaptação, os níveis de Fb aumentados em virtude da modulação da resposta inflamatória. Os resultados do fibrinogênio obtidos através de coagulometria apontaram diferenças entre os valores no pré e pós exercício. Mesmo que os valores de coagulometria para o fibrinogênio não possuam valores de referência, foi possível observar que os animais deste estudo apresentaram uma redução após o final da corrida.

Nesse estudo evidenciamos que os animais pós corrida apresentaram uma redução no número de plaquetas. Uma das principais justificativas para tal redução, tendo em vista que todos os animais deste trabalho sangraram após o exercício, é que tenha ocorrido um consumo localizado no foco da HPIE nos pulmões, através de uma extensa lesão vascular.

Os resultados encontrados no momento pós corrida por Giordanos et al., (2010), apresentaram resultados diferentes em relação às plaquetas, registrando um aumento após o exercício, muito provavelmente demarcado pela contração esplênica que contribui na liberação de plaquetas para o pool marginal. Levando em consideração a informação do aumento na disponibilização de

plaquetas pela contração esplênica, é possível admitir que a dimensão da área de HPIE concentrada nos pulmões desses animais é extremamente grande tendo em vista que o consumo foi tão grande capaz de evidenciar trombocitopenia após a prova. Segundo Johnstone et al., (1991), as plaquetas assumem a primeira linha de defesa quando um dano vascular é estabelecido. As plaquetas são os principais mediadores celulares da hemostasia e, quando ativadas em resposta a um dano vascular iniciam a produção de trombina, que ativa o fibrinogênio, que polimeriza para formar a malha de fibrina e bloquear o sangramento (NORRIS et al., 2007).

Os resultados obtidos a partir da hematimetria apontam o aumento no número de hemácias e hematócrito após a prova, confirmando que a capacidade de hemoconcentração moderada é mediada pela intensidade do exercício. Os aumentos verificados nessas variáveis acontecem através da contração esplênica, a partir da ação das catecolaminas. A reinserção de hemácias na corrente sanguínea, e assume um papel importante na biodisponibilização de oxigênio para os tecidos em hipoxemia (MANOHAR et al., 2001). Os valores de hematócrito (Ht) em que cavalos PSI em repouso estão entre 32 e 48%, e durante o exercício pode atingir aproximadamente 61% ou mais (EVANS, 2000).

As proteínas totais séricas (PTS) podem ter se comportado de maneira diferente uma vez que no grupo furosemida, sua concentração foi elevada nos dois momentos. Assim, esse aumento reflete a compensação de fluídos dos vasos até os tecidos tornando o plasma ainda mais viscoso (TYLER-McGOWAN, 1999). O medicamento aumenta a excreção de potássio no túbulo distal e a perda de eletrólitos transporta a água livre para o interior dos túbulos aumentando o volume de urina (WATSON, 2011).

Entretanto, o aumento na concentração de PTS durante o exercício de alta intensidade ocorreu também também no grupo controle. Outras alterações bioquímicas que podem ocorrer após a prova e estão relacionadas principalmente à perda de eletrólitos através do suor. A fase que compreende o deslocamento ou perda de fluídos pode estar relacionada com a duração e intensidade do exercício, por isso essa fase é reestabelecida em até 30 minutos depois da prova. O dimensionamento da perda de fluídos através da sudorese em equinos é reduzida e capaz de representar em quilos, uma perda de aproximadamente, 5 a 10 kg de peso corporal depois de uma corrida (KOWAL et al., 2006). De acordo com Hinchcliff & Muir (1991), a ligação do medicamento ao túbulo distal pode ser influenciada fisiologicamente por diversos eventos como como secreção de ácidos orgânicos, fluxo sanguíneo renal e a concentração de proteínas plasmáticas e sua ligação com o fármaco.

Os resultados obtidos para as variáveis de leucometria não foram estatisticamente significativos. Contudo, 18 animais, de ambos os grupos, apresentaram uma linfocitose no momento pós corrida. A intensidade do exercício, pode também aumentar de 10 a 30% os perfis celulares no pós exercício, e servir como indicador de estresse de treinamento em cavalos de corridas (TYLER-McGOWAN, 1999). A linfocitose verificada após o exercício, pode ser explicada através da liberação de leucócitos sequestrados pelo baço e provenientes do pool marginal. Assim, ocorre uma linfocitose transitória, que se estabiliza após algumas horas após a realização do exercício, assim como a diminuição da relação neutrófilos/linfócitos (KOWAL et al., 2006).

As alterações visualizadas nas avaliações bioquímicas em creatinina, ALT, AST e creatinina significativas nesse estudo no pós exercício podem estar

relacionadas ao condicionamento físico desses animais. As alterações na creatinina foram sugeridas por Valberg et al., (1993), e podem estar relacionadas primeiramente à hemoconcentração, hiperhidrose e síntese muscular, também sofrida em decorrência do exercício agudo. Mesmo que a alteração tenha sido relatada em nossos resultados, todos os valores estão dentro daqueles de referência para a espécie.

O aumento de AST referido nos momento pós corrida, não necessariamente está relacionado com a lesão de fibras musculares ou especificamente miócitos. Essa elevação pode sugerir um aumento na permeabilidade da célula ou ainda em caso de lesões de ultraestrutura durante o exercício, um aumento marcante nas concentrações da enzima pode ser visualizado (SANTOS et al., 2002). O envolvimento da AST e GGT nesse estudo infere que mesmo com diferenças estatísticas significativas, todos os resultados obtidos estiveram dentro dos valores de referência.

As dosagens de lactato plasmático, utilizadas nesse estudo, apresentaram elevações significativas em dois momentos, imediatamente e 30 minutos após a prova, indicando que o esforço ao qual os animais foram submetidos nessa fase, foi mais intenso. Os resultados apresentados por ANDREWS et al., (1995), demonstraram que ocorre uma elevada taxa de metabolismo anaeróbico para suprir as demandas energéticas durante o exercício, o que consequentemente gera um acúmulo de lactato e acidose metabólica. Outro fator que deve ser levado em consideração além da intensidade do exercício e condicionamento, é o aumento nos valores das amostras obtidas a partir do plasma e não de sangue total. Os mesmo resultados foram relatados por KOWAL et al., (2006), onde o aumento da concentração de

lactato indicou maior utilização do metabolismo anaeróbico para produção de energia, com as maiores concentrações imediatamente após o término do exercício para a maioria dos animais. O autor relatou que em 5-10 minutos a concentração de lactato começou a apresentar redução de seus valores, sendo que a redução mais acentuada da concentração de lactato foi observada em 15-20 minutos após o término do exercício. Após duas horas os níveis de lactato no plasma se encontraram bem próximos dos valores basais.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

10. Considerações finais

Os resultados do presente estudo demonstraram que cavalos com quadros de HPIE apresentam evidências de risco hemorrágico caracterizado por alterações no sistema hemostático após a prova.

A tromboelastometria se mostrou como uma importante ferramenta capaz de detectar evidências de hipocoagulabilidade bem como hiperfibrinólise nesta espécie.

A redução no número de plaquetas verificado após a prova, bem como o envolvimento das vias intrínseca, extrínseca e fibrinolítica da cascata da coagulação participam das tendências hemorrágicas apresentadas por cavalos com HPIE.

Os resultados desse estudo fornecem informações adicionais e úteis para a para a compreensão da HPIE. Mesmo que a utilização de exames que avaliem de maneira mais fidedigna a hemostasia nesses animais ainda seja um grande desafio, a investigação acurada do envolvimento dos quadros de hipocoagulabilidade ainda necessitam ser investigados, uma vez que a principal importância clínica, o sangramento, não está claro.

11.REFERÊNCIAS

11. REFERÊNCIAS

- 1) ANDREWS, F.M; GEISER, D.R; WHITE, S.L; WILLIAMSON, L.H; MAYKUTH, P.L; GREEN, E.M. Haematological and biochemical changes in horses competing in a 3 Star horse trial and 3-dayevent. ***Equine Veterinary Journal***, v.20, n.12, p.57-63, 1995.
- 2) BHATTI, R., SHAIK, D.M. The effect of exercise on blood parameters. ***Pakistan Journal of Physiology***, v.3, n.2, p.44-46, 2007.
- 3) EVANS, D.L. Overview of Equine Exercise Physiology and Biochemistry. In: **EVANS, D. L. (Ed.) Training and Fitness in Athletic Horses. Rural Industries Research and Development Corporation**, 2000. cap. 2, p.10-32.
- 4) FAZIO, F., ASSENZA, A., TOSTO, F., CASELLA, S., PICCIONE, G., CAOLA, G. Modifications of some acute phase proteins and the white blood cell count in thoroughbreds. ***Veterinary Record***, v.167, p.370-372, 2015.
- 5) GIORDANO, A., MEAZZA, C., SALVADORI, M., PALTRINIERI. Thromboelastometric profiles of horses affected by exercise-induced pulmonary haemorrhages. ***Veterinary Medicine International***, v.30, n.2, p.1-6, 2010.
- 6) HINCHCLIFF, K.W; MUIR, W.W. Pharmacology of Furosemide in the Horse: A Review. ***Journal of Veterinary Internal Medicine***, v.5, p.211-218. 1991.
- 7) HINCHCLIFF, K.W.; JACKSON, M.A.; MORLEY, P.S.; BROWN, J.A.; DREDGE, A.E.; OCALLAGHAN, P.A.; McCAFFREY, J.P.; SLOCOMBE, R.E.; CLARKE, A.E. Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage and performance in Thoroughbred racehorses. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, v. 227, n. 5, p. 768-774, 2005.
- 8) HINCHCLIFF, K.W; MCGORUM, B.C; DIXON, P.M; ROBINSON, N.E; SCHUMACHER, M. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Journal Equine Respiratory Medicine Surgery*, In: **Saunders Elsevier**, p. 617-629, 2007.
- 9) HINCHCLIFF, K.W., MORLEY, P.S., GUTHRIE, A.J. Efficacy of furosemide for prevention of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred racehorses. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.235, n. , p. 76–82, 2009.
- 10) HULTEN, C., TULAMO, R.M., SUOMINEN, M.M., BURVALL, K., MARHAUG, G., FORSBERG, M. A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid

- A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, v.68, n.2, p. 267-281, 1999.
- 11) JOHNSTONE, I.B; VIEL, L; CRANE, S; WHITING, T. Hemostatic studies in racing standardbred horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. ***Canadian Journal of Veterinary Research***, v. 55, N. 2, p. 101–106, 1991.
 - 12) KOWAL, R.J; ALMOSNY, N.R; CASCARDO, B; SUMMA, R.P; CURY, L.J. Evaluation of plasma lactate and seric activity of creatine kinase values in thoroughbred (PSI) horses (*Equus caballus*) submitted to effort tests on treadmill. ***Revista Brasileira de Ciências Veterinárias***, v.13, n.1, p.13-19, 2006.
 - 13) MANOHAR, M., GOETZ, T.E., ROTHENBAUM, P. Clenbuterol administration does not enhance the efficacy of furosemide in attenuating the exercise-induced pulmonary capillary hypertension in Thoroughbred horses. ***Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics***, v.23, n.6, p.389–395. 2001.
 - 14) NORRIS, F.W; PRATT, S.M; HUNTER, F; GARDNER, I.A, TABLIN, F. Prevalence of reduced fibrinogen binding to platelets in a population of Thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research*, v.68, n.7, p. 716-721, 2007.
 - 15) PALTRINIERI, S., MEAZZA, C., GIORDANO, A., TUNESI, C. Validation of thromboelastometry in horses. ***Veterinary Clinical Pathology***, v.37, n.3, p.277-285, 2008.
 - 16) SANTOS, S.A.; CRISPIM, S.M.A.; SOARES, A.C.; MAURO, R.A.; PEREIRA, M.; SERENO, J.R.B. Grazing patterns of pantaneiro horses. An element of adaptability to the pantanal region, Brazil. ***Archivos de Zootecnia***, v.51, n. 19, p. 129-138, 2002.
 - 17) SULLIVAN, S., HINCHCLIFF, K. Update on exercise-induced pulmonary haemorrhage. ***Veterinary Clinics of North America: Equine Practice***, v.31, n.1, p.187-198, 2015.
 - 18) SWEENEY, C. R.; REILLY, L. K. Sistema Respiratório. ***In: Segredos em Medicina de Equinos***. Porto Alegre: Artmed, 2001, p. 136-51.
 - 19) TYLER-McGOWAN, C. M., GOLLAND, L.C., EVANS, D.L., HODGSON, D R., ROSE, R.J. Haematological and Biochemical Responses to Training and Overtraining. *Equine Exercise Physiology 5. Equine Veterinary Journal Supply*, v.31, n.30, p. 621-625. 1999.
 - 20) VALBERG, S; JONSSON, L; LINDHOLM, A; HOLMGREN, N. Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. ***Equine Veterinary Journal***, v. 25, n.1, p.11-6, 1993.

- 21) WATSON, M. Furosemide. ***Journal of Exotic Pet Medicine***, v. 20, n. 1, p.60-63, 2011.

12. ARTIGOS CIENTÍFICOS

A new profile of coagulation in Thoroughbred horses with EIPH: hypocoagulation and hyperfibrinolysis

M.O. WILMSEN^{1*}, P. C. MAGALHÃES², T.R.M. CARVALHO³, M. FILHO³, J.B.V. INGLEZ³, L. BARBOSA⁴, R.K. TAKAHIRA⁵.

BACKGROUND:

In order to monitor abnormalities in the hemostatic system of running horses with cases of exercise-induced pulmonary hemorrhage, was employed the use of thromboelastrometry (ROTEM® Delta) in front of the acute and strenuous exercise.

OBJECTIVES:

The objective of this study was to investigate the presence of disturbs in the hemostatic system of English Pure Breed horses, submitted to two types of different protocols of treatment (with and without diuretic), and verify the main alterations in the analysis from TEM.

METHODS:

To carry out the samples, it was utilized the ROTEM® Delta equipment (Pentapharm GmbH, Munich, Germany), in 26 total citrate blood samples in two periods, before and after exercise, being the samples processed immediately after its collect. The same animals were submitted twice to the protocol of

¹ PhD, Department of Clinical Veterinary, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

*email: wilmsenvet@hotmail.com

² M.Sc, Department of Surgery and Anesthesiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³ Veterinarian of Jockey Club Brasileiro – JCB, Rio de Janeiro - RJ, Brazil.

⁴ Professor, Department of Biostatistics of Institute of Biosciences, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁵ Professor, Department of Clinical Veterinary, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

strenuous exercise, and divided in two groups, being control characterized by animals without use of prophylactic medication for EIPH and group treated using 0,5mg/kg/IV of furosemide (Diurax® – Agener União Saúde animal – Brasil). All animals went through endoscopic exam of the respiratory tract before and after race, to diagnose cases of EIPH. The blood samples were collected randomly from right and/ or left jugular veins.

RESULTS:

The animals presented variations seen through TEM in the moment post exercise. The main alterations happened in three tests inTEM, exTEM and fibTEM, being them, alterations in the variables increased coagulation time (CT), maximum formation of clot (MCF) and alfa angle ($A^\circ\alpha$).

CONCLUSIONS:

ROTEM was able to provide additional and helpful informations for the comprehension of EIPH. The thromboelastrometry showed as an important tool capable of detecting evidences of hipocoagulability as well hyperfibrinolysis in this species.

KEYWORDS: Hipocoagulability, Hyperfibrinolysis, Hemostasis, Racehorses, Bleeding horses, Furosemide.

INTRODUCTION

The occurrence of exercise-induced pulmonary hemorrhage is an important clinical cause of bleeding in horses that perform strenuous physical activity both during and after exercise throughout the world ^[1,2,3,4]. It is not known if the degree of EIPH progressively increases with time ^[5], however, in the long term, the pneumopathies lead to the chronic remodeling of the bronchial walls and extend throughout the lung parenchyma, resulting in the formation of areas of fibrosis.

Concomitant to the vascular lesion that occurs in the alveolar endothelium, there is an immediate activation of the hemostatic system through the transudation of plasmatic proteins into the intra-alveolar space where the interaction between platelets and coagulation factors has as main objective the formation of fibrin for primary correction of the occlusion as well as the membranous defect ^[25].

The vascular remodeling process is favored by procoagulant and fibrinolytic conditions, which are responsible for physiologically correcting fibrin deposits in the intra-alveolar space. However, it is known that the persistent and persistent activation of haemostatic mechanisms is able to favor fibrin deposition and the formation of fibrosis potentially compromising the establishment of other inflammatory conditions ^[26].

Excessive fibrin deposition may also favor the migration of inflammatory cells as well as fibroblast adhesion and proliferation at the focus of the lesion, thus favoring the reduction of intravascular space by exacerbated collagen production ^[27]. Although fibrinolysis has been more carefully studied in horses with colic and arthritis ^[28,29], it has been a neglected component of the study of

sports animals, serve as an important tool in elucidating pathological mechanisms that surround the lungs of athletic horses.

In human medicine, a hypothesis has been strongly worked out in the sense that respiratory diseases, which damage the alveolar membrane, are mainly responsible for the imbalance between coagulation mechanisms and fibrinolysis ^[30]. It is also known that in humans, the acute stress generated in the hemostatic system triggers the activation of coagulation, activation of fibrinolysis and an increase in the number and activity of platelets ^[6].

The use of thromboelastometry (TEM) amplifies a new hemostasis evaluation profile. Thus, it is possible to obtain a comprehensive evaluation of the hemostatic system through the interaction of cellular components with each other and the use of specific reagents that favor an overall evaluation of the three main pathways of the coagulation cascade, intrinsic, extrinsic and fibrinolytic, through a technique. The technique was validated for monitoring in horses ^[8] and other species, but few studies have been carried out to date demonstrating profiles of hypocoagulation and hyperfibrinolysis in athletic horses.

In order to contribute to the issues involving HPIE, the objective of this study was to investigate the presence of disorders in the hemostatic system of Thoroughbred horses submitted to two different treatment protocols (with and without diuretic), and to verify the main changes in the analyzes from TEM.

MATERIAL AND METHODS

Document of ethics in animal experimentation

The study was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, under

protocol 171/2014. The owners were informed in advance about the experimental protocol and from this they gave their written consent for the animals to be included in the study.

a. Admission of animals:

All animals included in this study were admitted as residents of the Brazilian Jockey Club (JCB) of the state of Rio de Janeiro in full exercise of their athletic activities. Thus, 26 Thoroughbred equine horses, aged between three and five years, females, castrated males and stallions that ran distances between 1,000 and 1,800 meters were evaluated before and after exercise.

During the experimental period, 26 horses were selected, composing two experimental groups, group C (control group - free of medication use) and GF (furosemide group - using furosemide). The animals were their own controls and ran in two moments within each group, pre and post exercise. Horses that ran through GF received a dose of furosemide (0.5 mg / kg) intravenously four hours prior to the test. The animals were evaluated at two moments, M0: 30 minutes before exercise and M1: immediately after exercise.

b. Criteria for inclusion of the study

To compose the experimental group, all animals needed compulsory prior history of exercise-induced pulmonary hemorrhage, and after performing the match, all bleeding scores were confirmed by tracheobronchoscopy. For the animals that obtained the bleeding score ≥ 3 , the trainer was advised to nebulize with saline solution twice a day. Exclusion criteria used at all stages of the experimental period were changes in clinical and laboratory screening, administration of non-estrogenic anti-inflammatory drugs,

corticosteroids or antinbiotic therapy or any medication other than furosemide and PCR tests positive for *Anaplasma* sp. *Babesia* sp. and *Ehrlichia* sp.

c. Laboratory analysis:

The Blood samples were drawn from the right and / or left jugular veins randomly. However, blood collection from the jugular vein was used to collect blood in the post-exercise period, contrary to that used in the pre-exercise period, in order to avoid changes in hemostasis samples results. In citrate tubes, 4.2mL of blood were collected for the thromboelastometric tests (ROTEM - Delta ®), in tubes containing EDTA, approximately 2mL of blood, to evaluate the leukocyte, erythrocyte and platelet series and serum biochemistry for function evaluation renal and hepatic disorders. The globular volume was determined by the microhematocrit technique and plasma total protein levels were determined by refractometry.

d. Clinical analysis:

The evaluation was performed based on the Pascoe methodology [11]. All animals were restrained by physical methods for later introduction by the ventral nasal meatus of the right or left nostril, randomly. Anatomical structures were analyzed from the nasal meatus to the bronchial bifurcation. The semi-quantitative evaluation for the presence of blood was performed through the existing HPIE score, which takes into consideration the degree of bleeding I and V.

STATISTICAL ANALYSIS

The results were submitted to statistical analysis through the t (paired) test for dependent samples. When the normality or homogeneity of the varinance

samples failed, the nonparametric Wilcoxon test was used. In both tests, the level of significance was 5% ($p = 0.05$). The statistical program used for analysis was SigmaStat.

RESULTS

The animals were their own controls and there was a significant difference between the degrees of bleeding ($p < 0.001$) of GC and GF (table 1). The animals in the control group showed degrees of bleeding ≥ 2 . Thus, three animals presented score II (11,5%), 13 animals score III (50%), eight animals the score IV (30,8%) and two animals presented the maximum degree of bleeding (V) with epistaxis manifestation (7,7%). When treated with furosemide, the degrees of bleeding were lower than those of the control group, thus, four animals had score I (15,3%), eight score II animals (30,7%), 10 score III animals (38,4%), one animal score IV (3,8%) and three animals with score V (11,5%).

When the comparison within each group was performed for the TEM variable, changes in inTEM, exTEM and fibTEM presented significant differences.

The GC presented statistical differences in the assessment of intrinsic thromboelasticity (inTEM) in the variables clot formation (CT) ($P < 0.001$), α angle ($P < 0.001$), A10 ($p < 0.001$), A20 ($p < 0.001$) and maximal clot formation (MCF) ($p < 0.001$). In the evaluation of the extrinsic pathway (exTEM) CFT ($p < 0.001$), α angle ($p < 0.02$), A10 ($p < 0.001$), A20 ($p < 0.001$), MCF ($p < 0.001$) and maximal lysis ($p < 0.001$) presented changes, while the fibrinolytic pathway (fibTEM) A10 ($p < 0.016$), A20 ($p < 0.008$), MCF ($p < 0.010$) and LM ($p < 0.013$) presented significant statistical values. The GF also indicated significant changes in TEM parameters CT: $p < 0.002$, CFT: $p < 0.001$, α angle: $p < 0.001$, A10: $p < 0.018$, A20: $p < 0.020$ and MCF: $p < 0.001$ in the intrinsic (inTEM) pathway. In the extrinsic pathway (exTEM) α angle ($p < 0.001$), A10 ($p < 0.001$), A20 ($p < 0.002$), MCF (p

<0,001), while the fibrinolytic pathway (fibTEM) α angle ($p < 0,007$) presented a statistically significant value (table 2).

At the post-exercise moment, the variables statistically significant in the three tests performed, inTEM, exTEM and fibTEM were observed. Therefore, increased coagulation time (CT), maximum clot formation (MCF) and α angle (A°), were shown to be decreased indicating clot fragility (Table 3). The platelet count was performed at both times to complete the TEM information.

However, there was no statistical difference in relation to the platelet count in the two groups at the pre-exercise moment. However, post-exercise, in all animals the number of platelets was lower ($p < 0,001$) when compared to pre-exercise (table 7).

The values obtained for the leukometric variables indicated statistical differences within each group. Thus, the total leukocyte count of the GC ($p < 0,001$), and the values of the differences for both neutrophils ($p < 0,001$) and lymphocytes were statistically different. In the GF total leukocyte count ($p < 0,001$) and the number of neutrophils ($p < 0,001$) presented statistical differences.

About hematocrit values ($p < 0,001$), serum total protein ($p < 0,001$), and platelet counts ($p < 0,001$) were all statistically significant within the group. Regarding the same variables, when evaluated in GF, red blood cells ($p < 0,001$), hematocrit ($p < 0,001$) and total serum protein ($p < 0,001$) presented statistical difference. However, the values obtained through TEM for comparison between the two groups did not obtain statistical differences at the pre turf.

Complementary to TEM, tests were performed for classics of coagulometry such as prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (PTPa) and fibrinogen (fib). Even though the results were statistically

significant between the groups, both are within the reference values for the species. (Table 8 and 9). When the same variables were compared within the GC and GF, they did not obtain statistical differences.

The values of hematocrit, total serum protein (TSP) and red blood cells were statistically different between the two groups at the two moments evaluated ($p < 0.001$).

Table 1 - Distribution of medians and percentiles 25 and 75% of the degree of bleeding before and after exercise racehorses with untreated (control) or treated with furosemide ($n = 26$).

TREATMENT	PRE	POST	p-value
Control	0,0 [0-0]	3,0 [3-4]	<0,01
Furosemide	0,0 [0-0]	3,0 [2-3]	<0,01

Wilcoxon Test. $p \leq 0,05$: statistical difference.

Table 2. Distribution of mean and standard deviation of thromboelastometry (TEM) variables into the groups C and F pre and post exercise in Thoroughbred horses with EIPH (n=26).

ROTEM	GC		GF		p-Value	
<i>inTEM</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>GC</i>	<i>GF</i>
CFT (s)	148,8±32,0	206,5±67,2	147,1±59,2	216,4±85,5	p<0,001	p<0,001
A°α	64,6±5,3	57,3±7,5	66,0±7,4	56,9±7,3	p<0,001	p<0,001
MCF (mm)	42,1±5,7	35,4±6,1	42,0±8,1	34,9±8,1	p<0,001	p<0,001
A10	40,2±5,5	31,7±4,4	-	-	p<0,001	-
A20	41,5±5,6	34,7±6,3	42,5±9,3	36,4±9,4	p<0,001	p=0,02
<i>exTEM</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>GC</i>	<i>GF</i>
CFT (s)	138,5±21,6	180,3±44,1	164,1±58,8	199,4±58,9	p<0,001	NS
A°α	63,7±7,6	57,0±11,8	65,9±6,8	57,0±8,4	p=0,02	p<0,001
MCF (mm)	48,8±10,6	47,8±11,9	53,2±11,0	38,0±8,1	p<0,001	p<0,001
<i>fibTEM</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>GC</i>	<i>GF</i>
A°α	57,3±26,4	48,1±8,3	55,1±6,7	29,3±35,3	p<0,001	p=0,007
A10	13,2±5,9	10,0±4,4	14,3±5,4	12,1±6,6	p=0,016	NS

t-Test: p≤0,05% statistical difference. inTEM®: Contact activator. exTEM®: Tissue factor activator. fibTEM®: Activated tissue factor (exTEM®) + cytochalasin. CT: coagulation time. CFT: Clot formation time. A° α: Angle α; MCF: Maximum clot firmness. ML: Lise maxima. Test t: p≤0,05: statistical difference. * p≤0,05; ** p <0.001. NS: not significant.

Table 3. Distribution of mean and standard deviation of thromboelastometry (TEM) variables into the groups C and F pre and post exercise in Thoroughbred horses with EIPH (n=26).

ROTEM	GC		GF		p-Value	
<i>inTEM</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>
CT	276,4±49,1	223,1±33,4	249,1±37,9	229,5±31,9	NS	NS
CFT (s)	148,8±32,0	155,4±44,1	147,1±59,2	199,4±58,9	NS	NS
MCF (mm)	42,1±5,7	35,4±0,9	42,0±8,1	34,9±0,8	0,03	NS
A10	40,2±5,5	31,7±4,4	40,1±7,9	35,1±11,1	NS	NS
A20	41,5±5,6	34,7±6,3	42,5±9,3	36,4±9,4	NS	NS
<i>exTEM</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>
CT	66,3±11,6	67,2±25,2	64,5±18,4	75,5±23,9	NS	p=0,03
A°α	63,7±7,6	57,9±9,8	65,9±6,8	57,0±8,4	NS	p=0,01
MCF (mm)	48,8±5,9	37,8±6,9	53,2±11,0	38,0±8,1	NS	NS
A10	66,1±6,7	35,1±6,6	43,5±6,7	36,0±6,0	p<0,001	NS
A20	48,3±6,1	37,5±6,7	46,9±7,3	38,0±6,4	NS	NS
<i>fibTEM</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>GC</i>	<i>GF</i>
A10	13,2±5,9	10,0±4,4	14,3±5,4	12,1±6,6	NS	NS
A20	13,6±6,3	13,6±6,3	14,6±5,5	14,6±5,5	NS	NS

Paired t-Test. NS: not significant.

DISCUSSION

All 26 horses that participated in this experiment had different degrees of exercise-induced pulmonary hemorrhage. The occurrence of HPIE cases is high frequency and the condition is one of the most important clinical causes of bleeding in horses that perform strenuous physical activity during and after exercise throughout the world [1,2,3,4,5].

Although two main diagnostic approaches are used to characterize HPIE in equine athletes, the use of flexible fiber optic endoscopy in this study allowed the characterization of bleeding frames immediately after the test in 100% of the animals. Two types of diagnoses are used to identify bleeding, bronchoalveolar lavage, and endoscopy. However, the endoscopy technique is faster and does not require the use of anesthetic drugs, which may be a complicating factor for those animals submitted to the anti-Dopping examination after the end of each match [12]. In the two-hour post-training period with bronchoscopy, it is possible to identify bleeding in about 43 to 75% of Purebred horses, and if repeated, the sample may increase to 85% [13]. Even though the use of furosemide does not have its efficacy, the results obtained in this study indicate that in the group of animals that used diuretics up to four hours before the race, the majority of the patients presented milder bleeding. Of the 26 animals that participated in this study, 11 animals (42%) presented grade III and grade IV bleeding in the furosemide group, whereas in the control group, 19 animals (80%) had the same bleeding scores. To date, despite the discrepancy between countries whether or not to allow the use of drugs in animals prior to competition, furosemide is the drug most commonly used to prevent HPIE and to delay the progression of lung injury [14,13,15].

In a recent study, the efficacy of furosemide was discussed and among the main conflicts surrounding the problem, the authors cite that methodological failures, errors in sample number and problems with statistical analyzes [5]. In addition to the problems involved in the experimental design, other studies report that in North America, for example, the use of the medication affects 92% of the PSI horses in the turf corridors, promoting an expenditure of approximately 400,000 doses / year [3].

The results obtained from TEM, indicated that there was no statistical difference between and within the GC and GF groups at the pre-evaluation time. This can be justified since all the animals entered in this study have been in the athletic race for at least one year. Initial damage to the hemostatic system in the adaptation phase is no longer visualized at this stage of the athletic career.

The main changes were mediated through inTEM, exTEM and fibTEM, demonstrating the involvement of the intrinsic, extrinsic and fibrinolytic pathways in the two groups after exercise. The prolongation of coagulation time (CT) in both exTEM and inTEM suggested an anticoagulation scenario, probably related to the low interaction between coagulation factors during post-run sample processing. The other two variables that underwent changes were the maximum clot firmness (MCF), which presented a shortening that may be related to a clotting substrate deficiency that may be related to fibrinogen and / or platelets, and the angle α ($A^\circ \alpha$), which in turn characterized the hypocoagulability. The results obtained in this study are different from those found by [7] which from the evaluation of horses with HPIE demonstrated the possibility of presenting pre and post race hypercoagulation. The authors also point out that the results of the study do not allow to understand the causes or mechanisms involved in

hypercoagulability, since differences in PT and PTT tests were not verified and the animals did not present hyperfibrinogenemia in the pre turf evaluation.

The results obtained for the prothrombin time (PT - extrinsic pathway) were statistically significant in this study and are in agreement with those presented by the CT of the TEM analyzes. In a study investigating hemostasis in horses with EIPH, some results pointed out that it could be activated even though the values of TP and TTPa are normal for the species ^[16]. Such tests depend on numerous factors that do not replace the specificity of the TEM assessment. Also on the conventional tests, some racehorses, when compared to other species, have augmented PT values, increased aPTT and fibrinogen, as well as the activity of factors I, II, V, and X ^[17]. These results also corroborate with those found in this study for the values of fibrinogen post turf. During the coagulation tests, post-exercise fibrinolytic activity was superior pre pareo.

All pre and post exercise fibrinogen results obtained by refractometry were within the reference values (100-400 mg / dL), proving that all the animals were already adapted to the training. Fb has an important behavior in the initial phase of training in athletic horses, and is closely related to the intensity of the load demanded by the exercise, type of track, duration and course of the test ^[18].

In this study, it was evidenced that the post race animals had a reduction in the number of platelets. One of the main justifications for such a reduction is that consumption has occurred in the focus of EIPH in the lungs, through an extensive vascular injury. The results found at the time after the race, presented different results in relation to the platelets, registering an increase after the exercise ^[7]. The Platelets take the first line of defense when vascular damage is established ^[16]. The Platelets are the main cellular mediators of hemostasis and,

when activated in response to vascular damage, thrombin is initiated, which activates fibrinogen, which polymerizes to form the fibrin mesh and blocks bleeding ^[19].

The results obtained from the hematimetry indicate the increase in the number of red blood cells and hematocrit after the test, confirming that the capacity of moderate hemoconcentration that is mediated by the intensity of the exercise. The increases observed in these variables occur through splenic contraction, from the action of catecholamines. The reinsertion of red blood cells in the bloodstream plays an important role in the bioavailability of oxygen to tissues in hypoxemia ^[20]. Hematocrit values in which resting Thoroughbreds are between 32 and 48%, and during exercise may reach approximately 61% or more ^[21].

The Total plasma protein (PPT) in the furosemide group were higher than the reference values. This increase can be explained because the compensation of fluid from the vessels to the tissues makes the plasma more viscous ^[22]. The drug increases the excretion of potassium in the distal tubule and the loss of electrolytes conveys the free water to the interior of the tubules increasing the urine volume ^[23]. However, the increase in concentration during high intensity exercise may also occur in the control group. Other biochemical changes that may occur after the test are mainly related to the loss of electrolytes through sweat. The phase comprising the displacement or loss of fluids may be related to the duration and intensity of the exercise, so this phase is reestablished within 30 minutes after the test. Sizing of fluid loss through sweating in horses is reduced and able to represent in kilograms a loss of approximately 5 to 10 kg of body weight after a run ^[24]. The binding of the drug to the distal tubule can be influenced

physiologically by several events such as secretion of organic acids, renal blood flow and plasma protein concentration and its binding to the drug ^[14].

CONCLUSIONS

The results of this study provide additional and useful information for understanding the EIPH. Thromboelastigraphy proved to be an important tool capable of detecting evidence of hypocoagulability as well as hyperfibrinolysis in this specie. The reduction in the number of platelets verified after the test, as well as the involvement of the intrinsic, extrinsic and fibrinolytic pathways of the hemostatic system participate in the hemorrhagic tendencies presented by EIPH in Thoroughbreds race horses. Further studies are needed to contribute to the accurate investigation of the involvement of the hypocoagulability, in order to understand if this condition can serve as a predisposing factor to the condition of the HPIE.

REFERENCES

- 1) COOK, W. R. Epistaxis in the race horses. ***Equine Veterinary Journal***, v.6, p.45-48, 1974.
- 2) BIRKS, E.K., DURANDO, M.M., McBRIDE, S. Exercise-induced pulmonary haemorrhage. ***The Veterinary Clinics Equine***, v.19, n.1, p.87-100. 2003.
- 3) HINCHCLIFF, K.W.; JACKSON, M.A.; MORLEY, P.S.; BROWN, J.A.; DREDGE, A.E.; OCALLAGHAN, P.A.; McCAFFREY, J.P.; SLOCOMBE, R.E.; CLARKE, A.E. Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage and performance in Thoroughbred racehorses. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, v. 227, n. 5, p. 768-774, 2005.
- 4) LANGDORF, J.L., THOMSON, P.C., KNIGHT, P.K. Epistaxis in racehorses:

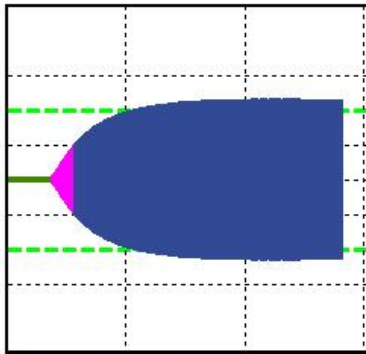
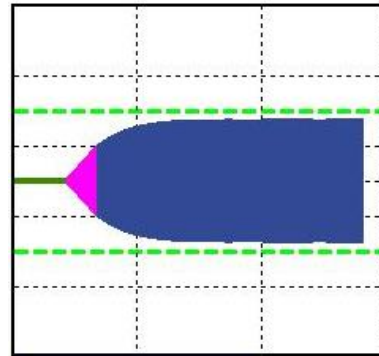
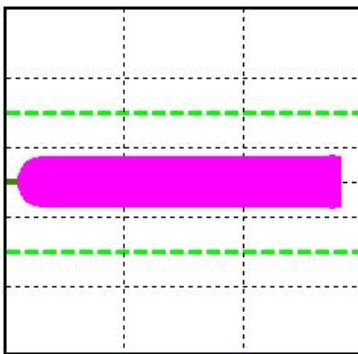
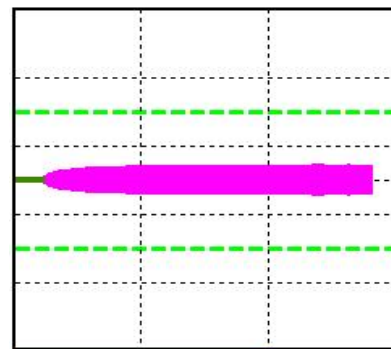
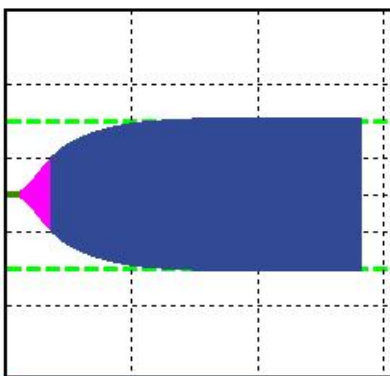
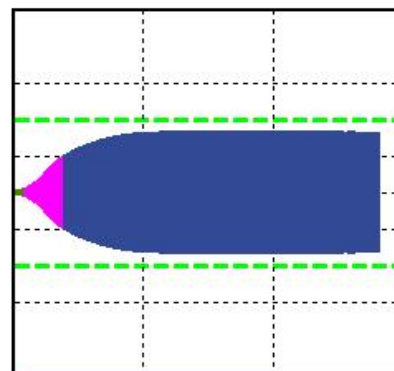
- risk factors and effects on career. **Australian Veterinary Journal**, v.91, n.13, p. 198-203. 2013.
- 5) SULLIVAN, S., HINCHCLIFF, K. Update on exercise-induced pulmonary haemorrhage. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.31, n.1, p.187-198. 2015(a).
- 6) BROOKS, A.C.; GUILLAUMIN, J.; COOPER, E.S.; COUTO, C.G. Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings. **Transfusion**, v.54, n.3, p.727-734. 2014.
- 7) GIORDANO, A., MEAZZA, C., SALVADORI, M., PALTRINIERI. Thromboelastometric profiles of horses affected by exercise-induced pulmonary haemorrhages. **Veterinary Medicine International**, v.30, n.2, p.1-6. 2010.
- 8) KOL, A., BORJESSON, D.L. Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. **Veterinary Clinical Pathology**, v.39, n.4, p.405-416. 2010.
- 9) PICCIONE, G., FAZIO, F., GIUDICE, E. Nycthemeral change of some haematological parameters in horses. **Journal of Applied Biomedicine**, v.3, n.2, p.123– 128. 2005.
- 10) HANEL, R.M.; CHAN, D.L.; CONNER, B.; GAUTHIER, V.; HOLOWAYCHUK, M.; ISTVAN, S.; WALKER, J.M.; WOOD, D.; GOGGS, R.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.24, n.1, p. 47-56, 2014.
- 11) 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, v.5, p. 703-707. 1981.
- 12) DERKSEN, F.J., WILLIAMS, K.J., STACK, A. Exercise Pulmonary Hemorrhage in horses: the role of pulmonary veins. **Compendium Continuing Education for Veterinarians**. 2011.
- 13) HINCHCLIFF, K.W., MORLEY, P.S., GUTHRIE, A.J. Efficacy of furosemide for prevention of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred racehorses. **Journal of American Veterinary Medicine**

- 374 **Association**, v.235, n. , p. 76–82. 2009.
- 375 14) HINCHCLIFF, K.W; MUIR, W.W. Pharmacology of Furosemide in the
376 Horse: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, p.211-
377 218. 1991.
- 378 15) SULLIVAN, S.L., WHITTEN, T., MORLEY, P.S., HINCHCLIFF, K.W. A
379 systematic review and meta-analysis of furosemide for exercise induced
380 pulmonary haemorrhage in thoroughbred and standardbred racehorses.
381 **Equine Veterinary Journal**, v.47, p.341-349. 2015(b).
- 382 16) JOHNSTONE, I.B; VIEL, L; CRANE, S; WHITING, T. Hemostatic studies
383 in racing standardbred horses with exercise-induced pulmonary
384 hemorrhage. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, N. 2, p.
385 101–106, 1991.
- 386 17) PALTRINIERI, S., MEAZZA, C., GIORDANO, A., TUNESI, C. Validation
387 of thromboelastometry in horses. **Veterinary Clinical Pathology**, v.37,
388 n.3, p.277-285. 2008.
- 389 18) FAZIO, F., ASSENZA, A., TOSTO, F., CASELLA, S., PICCIONE, G.,
390 CAOLA, G. Modifications of some acute phase proteins and the white
391 blood cell count in thoroughbreds. **Veterinary Record**, v.167, p.370-372,
392 2015.
- 393 19) NORRIS, F.W; PRATT, S.M; HUNTER, F; GARDNER, I.A, TABLIN, F.
394 Prevalence of reduced fibrinogen binding to platelets in a population of
395 Thoroughbreds. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n.7, p.
396 716-721, 2007.
- 397 20) MANOHAR, M., GOETZ, T.E., ROTHENBAUM, P. Clenbuterol
398 administration does not enhance the efficacy of furosemide in attenuating
399 the exercise-induced pulmonary capillary hypertension in Thoroughbred
400 horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.23,
401 n.6, p.389–395. 2001.
- 402 21) EVANS, D.L. Overview of Equine Exercise Physiology and Biochemistry.
403 In: **EVANS, D. L. (Ed.) Training and Fitness in Athletic Horses. Rural**
404 **Industries Research and Development Corporation**, 2000. cap. 2,
405 p.10-32.
- 406 22) TYLER-McGOWAN, C. M., GOLLAND, L.C., EVANS, D.L., HODGSON, D
407 R., ROSE, R.J. Haematological and Biochemical Responses to Training

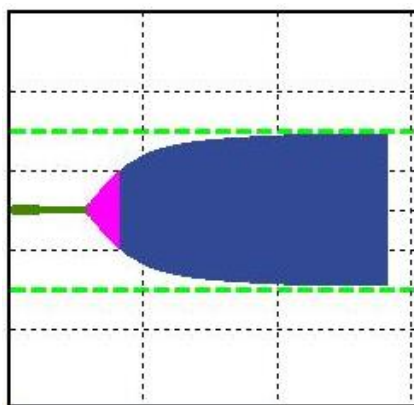
- and Overtraining. Equine Exercise Physiology 5. **Equine Veterinary Journal Supply**, v.31, n.30, p. 621-625. 1999.
- 23)WATSON, M. Furosemide. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, n. 1, p.60-63, 2011.
- 24)KOWAL, R.J; ALMOSNY, N.R; CASCARDO, B; SUMMA, R.P; CURY, L.J. Evaluation of plasma lactate and seric activity of creatine kinase values in thoroughbred (PSI) horses (Equus caballus) submitted to effort tests on treadmill. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.13, n.1, p.13-19, 2006.
- 25)GUNTHER, A; MOSAVI, P; HEINEMANN, H; RUPPERT, C; MTH, H; MARKART, P; GRIMMINGER, F; WALMRATH, D; TEMMESFELD-WOLLBRUCK, B; SEEGER, W. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia: comparison with the acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 2, p. 454– 462, 2000.
- 26)IDELL, S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 31,n. 4, p. 213–220, 2003.
- 27)DERKSEN, F.J., WILLIAMS, K.J., STACK, A. Exercise Pulmonary Hemorrhage in horses: the role of pulmonary veins. **Compendium Continuing Education for Veterinarians**. 2011.
- 28)MONREAL. L; ANGLÉS, A; ESPADA, Y; MONASTERIO, J, MONERAL, M. Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. **Equine Veterinary Journal**. V. 32, p. 19–25, 2000.
- 29)DELGADO, M.A; MONREAL, L; ARMENGOU, L; RIOS, J; SEGURA, D. Peritoneal D-dimer concentration for assessing peritoneal 10 Mediators of Inflammation fibrinolytic activity in horses with colic. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V. 23, n. 4, p. 882–889, 2009.
- 30)BARTON, A.K; GEHLEN, H. Pulmonary Remodeling in Equine Asthma: What Do We Know about Mediators of Inflammation in the Horse? **Mediators of Inflammation**, 2016.

ANEXOS:

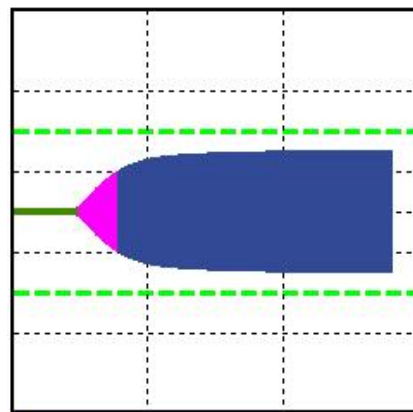
Figura 1 – Graphical representation of TEM, referring to the exTEM®, inTEM® and fibTEM® tests, in racehorses with EIPH pre and post exercise in control group (GC) (n=26).

**inTEM pre GC****inTEM post GC****fibTEM pre GC****fibTEM post GC****exTEM pre GC****exTEM post GC**

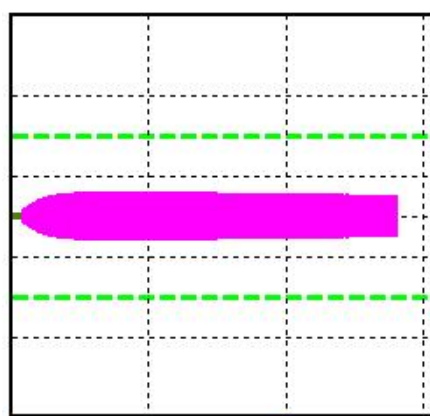
453 Figura 2 – Graphical representation of TEM, referring to the exTEM®, inTEM®
454 and fibTEM® tests, in racehorses with EIPH pre and post exercise in control
455 group (GC) (n=26).



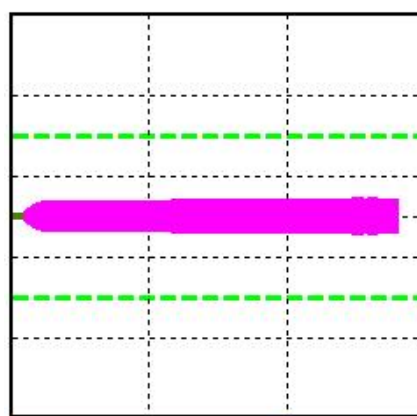
457 **inTEM pre GF**



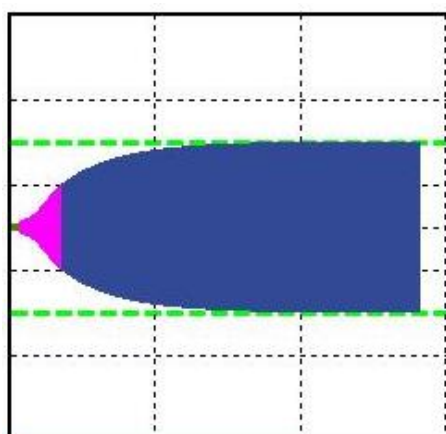
inTEM post GF



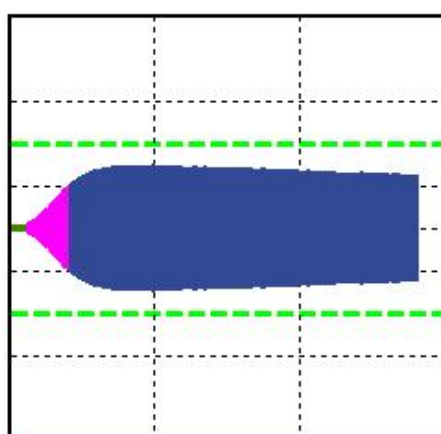
459 **fibTEM pre GF**



fibTEM post GF



461 **exTEM pre GF**



exTEM post GF

1 EHRlichiosis in Racehorses: A New Challenge for Hemostasis

2 WILMSEN, M.O¹; MAGALHÃES, P, C²; CARVALHO, T.R.M³; BARBOSA, L⁴;
3 TAKAHIRA, R.K⁵.

4
5 **Introduction:** The exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) is one of the
6 main causes of hemorrhage involving athlete horses in all world. The employ of
7 thromboelastrometry has contributed as a diagnostic mechanism for hemostatic
8 disorders, especially for understandings cases of hypo and hypercoagulability still
9 briefly discussed within the species.

10 **Hypothesis:** Horses naturally infected with *Ehrlichia* sp. are more susceptible to
11 develop severe cases of EIPH.

12 **Animals:** Were evaluated seven horses with *Ehrlichia* sp. (Group E), and seven
13 clinically healthy horses (Group C - control), the second, constituted the Control
14 Group, both under use of furosemide, a prophylactic medication.

15 **Materials and methods:** Was carried out a prospective study, evaluating the
16 hemostatic changes in horses with EIPH through thromboelastrometry, PT, aPTT
17 and fibrinogen.

¹ PhD, Department of Clinical Veterinary, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.
*email: wilmsenvet@hotmail.com

² M.Sc, Department of Surgery and Anesthesiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³ Veterinarian of Jockey Club Brasileiro – JCB, Rio de Janeiro - RJ, Brazil.

⁴ Professor, Department of Biostatistics of Institute of Biosciences, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁵ Professor, Department of Clinical Veterinary, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Results: The main alterations were verified through the reactions mediated by inTEM®, exTEM® and fibTEM®, showing the involvement of intrinsic and extrinsic vias, and fibrinogen. All animals that participated the study developed cases of EIPH. The animals from Group E achieved higher hemorrhage degrees and presented cases of anticoagulation, showed through increase of CT, MCF, α angle, A10mm, A20mm. Hyperfibrinolysis cases were verified through ML in exTEM and fibTEM, in 6 out of 7 animals from Group E.

Conclusions: Horses with EIPH and *Ehrlichia* sp. infection showed tendency to more severe hemorrhagic cases than those not infected when evaluated through TEM.

KEYWORDS: Racehorses, Hemostasis, Bleeding horses, Thromboelastometry, Hyperfibrinolysis, Hipocoagulability.

INTRODUCTION

Currently, infections caused by *Ehrlichia sp.* are responsible to create great impacts over human and animal health in all world. Being Brazil a tropical climate country with environmental conditions that favor tick infestations, it is still neglected the diagnosis of the disease in equines, while in canine species, the same infections are massively reported in all world. Acknowledging the importance of infectious causes involvement compromising the hemostatic system, are scarce the studies that report the impact of this disease in athlete animals with exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH), The main alterations related to the disease in canines evidence the presence of anemia, thrombocytopenia and generalized vasculitis.

The occurrence EIPH is an important bleeding clinical cause in Pure Breed English (PSI) horses that realize strenuous physical activity, during and after exercise, in all globe.

An integral evaluation of the hemostatic system, in order to aid the elucidation of the main alterations identified with the use of thromboelastrometry (TEM), allows an earlier identification of hypo and hypercoagulability cases when compared to coagulopathies diagnostic in either humans or animals.

TEM uses viscoelastic tests that allow track the participation and interactions between platelets and coagulation factors since the beginning of clot development, until fibrinolysis

Acknowledging the scarce and necessity of research applied to hemostasis in athlete equines via TEM in Brazil, the object of this study was to evidence the main hemostatic alterations, visualized via TEM in horses with EIPH, use of furosemide and infected with *Ehrlichia sp.*, also, if the infection could be

considered an agent that could favor the hemorrhagic case in this animals, before and after strenuous exercise.

MATERIAL AND METHODS

The Commission of Ethic in Animal Use (CEUA) of School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, approved the study, under the protocol 171/2014.

a. Selection of animals:

Were evaluated before and after exercise, 14 Pure Breed English (PSI) athlete equines with age ranging from three to four years old, weight ranging from 422 to 483 kg, stallions, in campaign at Brazilian Jockey Club (JCB). The traveled distance through the experimental tests was 1.000 meters and all animals in this study received a dose of furosemide (250mg, about 0,5mg/kg) IV, four hours before strenuous exercise.

For evaluation, the animals were divided in two groups of 7, *Ehrlichia* group (GE) and control group (GC). The animals from group E, submitted to exercise, had a diagnosis of *Ehrlichia* sp., obtained through PCR exam, post exercise.

b. Evaluation of animals

The animals were evaluated in two moments:

Moment 0 (M0): 30 minutes before exercise

Moment 1 (M1): immediately after exercise.

c. Laboratory analysis

The blood collection were made starting from either right or left jugular vein, randomly. However, for blood collection in the moment post exercise, was advocated the blood collection from the jugular vein contrary of that used in the moment pre exercise, to avoid alterations in hemostasis sample results.

In citrate tubes, were collected 4,2ml of blood for elaboration of thromboelastrometry (ROTEM - Delta®) tests, in tubes containing EDTA, about 2ml of blood, to evaluate leukocyte, erythrocytes and platelets series. The globular volume was determined through microhematocrit techniques, the total plasmatic protein (PPT) levels were determined by refractometry.

d. Clinical analysis:

Endoscopic evaluation of respiratory tract

The evaluation of bleeding score was obtained based in Pascoe methodology. All animals were physically restrained for later insertion of an optic fiber endoscope through the ventral nasal meatus of the right or left nostril, randomly.

Were analysed anatomic structures from nasal meatus to bronchial bifurcation. The same veterinarian, properly trained to identify bleeding scores in all animals, performed the semi quantitative evaluation for EIPH, with presence of degrees I to V blood. He was not informed about the experimental group in which each animal belonged, therefore reducing errors in evaluation criteria.

STATISTICAL ANALYSIS

Was used Student's t for independent samples (not paired). When

normality and homogeneity of variances failed, the test was not applied. In this case, it was used the Non-parametric Mann-Whitney test comparing groups E and C in moments pre and post exercise. Both tests assumed level of significance of 5% ($p > 0.05$). Statistical analyzes were processed using the SigmaStat program.

RESULTS

The exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) was diagnosed in 100% of animals in this study. Except for those animals with manifestation of epistaxis post test, the diagnostic method used was endoscopy, performed within ten minutes after the end of the test. All animals belonging to group E presented EIPH with a degree bleeding score V ($p < 0.001$) with consequent manifestation of post test epistaxis. (Table 1). The main alterations visualized in the graphs produced by TEM, indicated the impact on the hemostatic profile of the animals that participated in this study in the pre (Figure 2) and post exercise (Figure 3), in the tests that evaluated the three main routes of extrinsic coagulation (exTEM®), intrinsic (inTEM®) and fibrinolytic (fibTEM®), respectively.

The PT (prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time) and fibrinogen (FIB) were used to compare the results of the two groups at the two moments, pre and post exercise. Group E presented significant CT prolongation (exTEM®) and shortening of MCF (exTEM®), A10, A20 (fibTEM / inTEM®) α angle and MCF (inTEM®) at pre-exercise when compared to group C (Table 2). Post-exercise, prolongations in CT and CFT (exTEM®), CFT and ML fibTEM / inTEM®) were identified in group E. However, A10, A20, α angle and MCF were decreased indicating clot fragility (Table 3).

In the PT, aPTT and FIB pre-exercise tests, changes in PT and fibrinogen ($p < 0.001$) (Table 4) were significant in group E at the pre-exercise moment, while at the post-exercise moment, aPTT ($p < 0,05$) and fibrinogen ($p < 0.001$) were more statistically significant when compared to group C. (Table 5).

The hematocrit and total plasma protein values of the E and C groups presented statistical differences ($p < 0.01$) in both pre (Table 6) and post exercise (Table 7). Although thrombocytopenia was evident in group E, at pre-exercise, it was statistically significant only at post-exercise ($p < 0.01$)

In the individual comparison of each group, both groups E (Table 8) and group C (Table 9) obtained significant statistical differences ($p \leq 0.05$) in the values of hematocrit, total plasma protein and platelets.

When the groups were compared in relation to the end time of the test, the animals of the group E needed a longer time to finish the test when compared to the group C ($p < 0.001$) (Table 10).

DISCUSSION

The animals that participated in the study had no signs of infestation by any type of ectoparasite during the experimental period. The animals were housed and periodically cleaned. However, they shared spaces with animals from other regions of the country who competed in the Brazilian Joquey Club (JCB), in addition to the presence of dogs in the same environment. It is known that most of the animals parasitized by ectoparasites harbor a small portion of the parasite load present in the environment. The transmission of the disease occurs through the tick bite, member of the Ixodidae family, *Rhipicephalus microplus*, which acts both as a reservoir vector of rickettsiae. Another important fact is that the

occurrence of vectors can be facilitated in countries with a tropical climate, such as Brazil ^[1]. In the case of the state of Rio de Janeiro, during the summer, during which the experiment was carried out, high temperatures are associated with the humid climate, which may serve as an explanation for the occurrence of these parasites. Although the prevalence of EIPH in this study was 100%, the most severe bleeding scores were identified in all E group animals. In addition to predisposing factors to bleeding horses, the maximum bleeding score reached by all group E may have been exacerbated by infection of the parasites of the genus *Ehrlichia* sp. The prevalence of EIPH with or without manifestation of epistaxis in racehorses is high and is related to the intensity of the exercise and the speed reached by the animal during the competition ^[16,9]. The authors also infer that the identification of bleeding frames is more frequently visualized in animals after the test. It is known that thrombocytopenia, commonly seen in animals with ehrlichiosis, may favor hemostasis disorders such as hemorrhagic diathesis in dogs, horses and cattle. However, in dogs, particularly in the chronic phase of the disease, intense vaculitis is a potential source of platelet deficiency consumption by consumption ^[6,28].

The animals that did not present post-test epistaxis were submitted to a tracheobronchial examination, which was able to identify precisely and less invasively the bleeding scores. The flexo fiber optic endoscopy technique has contributed a lot to the digest of EIPH. If used at the correct time, in the period from 30 to 120 minutes, it is possible to identify bleeding frames in up to 75% of the animals, and if repeated after that period, the casuistry by increase up to 85% ^[17].

The two groups ran under the drug furosemide, a loop diuretic commonly used in animals with EIPH, in order to mitigate the degree of bleeding. The action of furosemide in EIPH is associated with a decrease in the volume of water and intravascular fluid, capable of making the pulmonary arterial hypertension pictures more lenient. This mechanism associated with exercise reduces the incidence of alveolar capillary rupture and hemorrhage leading to pulmonary parenchymal vasodilation. Even with the use of the medication, all the animals in group E presented grade EIPH, while in group S, the animal that bore the most reached score III. Although the literature still evidences many conflicts despite the use in the prevention of EIPH, research has pointed to the efficacy of furosemide in randomized studies, when compared with placebo or meta-analysis studies, in which horses with EIPH manifestations, when used furosemide up to four hours before the run, reduced the degree of postoperative bleeding [9, 18]. These data corroborate with those presented in this study, where group C, when compared to group E, obtained lower bleeding scores.

The results produced in this study through MET, indicate that both pre and post exercise, *Ehrlichia* sp. in the equine species can also cause damage to the hemostatic system. The main changes were observed in the reactions mediated by exTEM®, inTEM® and fibTEM® demonstrating the involvement of the intrinsic, extrinsic and fibrinolytic pathways, evidencing the even greater hemorrhagic risk in these animals. It is known that acute and strenuous exercise can cause changes in the hemostatic system of horse athletes [19,20]. The results of thromboelastometry showed changes in group E when compared to group C. Thus, the prolongation of coagulation time (CT) of exTEM® characterized the anticoagulation, probably related to the interaction between

coagulation factors. The shortening observed in the variable that records the maximum clot firmness (MCF) indicated a deficiency in the coagulation substrate related to fibrinogen and / or platelets. The hypocoagulability was characterized by the angle α ($A^\circ \alpha$) and the amplitude of the clot in A10 and A20mm, were also compromised. Prolonged bleeding time and poor clot retraction are evidence of thrombocytopenia or platelet dysfunction [21,22].

All variables were even more impaired in the post-exercise of the animals of group E, mainly mediated by MCF results, which demonstrated the platelet / fibrin / fibrinogen impairment was even greater at that time. Thrombocytopenia and hypofibrinogenemia, verified at both times, but higher in post-exercise, may be related to the worsening of this situation due to the consumption of platelets in any extension of the pulmonary parenchyma as a result of EIPH. Another fact that could explain the thrombocytopenia since the pre-exercise, would be the vasculitis. It is known that in dogs, the transport of infected cells to other tissues, especially spleen, lung, liver, rinses and meninges, facilitate the process of adhesion of the parasite to the vascular wall, inducing vasculitis processes. From this, they may show signs of thrombocytopenia and leukopenia [22]. In addition, it is known that ehrlichiosis can be a disease easily neglected by the poverty of clinical signs, especially in the initial phase where clinical changes are silent.

Another important factor verified in this study was maximal lysis (ML), in which six of the seven animals of the E group presented pictures superior to 15% in clot reduction in fibTEM®, thus characterizing hyperfibrinolysis, while all animals in group C values below 15%. When ML is less than 15%, this indicates that there is stability of the clot and that higher levels indicate frames compatible with hyperfibrinolysis [23]. The fibTEM® assay (tissue factor along with the

activation of phospholipids with platelet inhibition) provides a qualitative assessment of fibrinogen status. Thus, the assay has the potential to better detect hyperfibrinolysis, since fibTEM® can isolate fibrin polymerization from platelet-fibrin / fibrinogen interactions in the presence of cytochalasin D as a platelet inhibitor [30].

Even though the possibility of bleeding was the same for all the individuals in this study, group C presented a lower degree of bleeding when compared to group E. The animals were submitted to the same conditions of training, lane, jockey and aptitude. Therefore, even though *Ehrlichia* sp. has been aggravated by the degree of bleeding in group E, the impairment observed in the performance of these animals, indicated a reduction in the chances of victory. The EIPH has a great impact on the performance of animals on the track, as well as the commitment of victories throughout the athletic career [24,18].

Serum total protein (STP) was elevated in both groups when compared to the reference values for the species. This may be warranted since all animals received a dose of furosemide four hours prior to strenuous exercise. The use of furosemide is widely used in the prevention of EIPH [25]. In addition, the medication contributes to intense and rapid dehydration, interfering with weight and increasing the animal's ability to reach higher speeds during the test [26]. Even after comparing the two groups with the use of prophylactic medication, group E still maintained STP values higher than those of group C. However, it is not possible to state that only the effect of dehydration is responsible for the increase in group E STP. In dogs, changes such as hypoalbuminemia, hyperglobulinemia and hypergammaglobulinemia are known to be common in ehrlichiosis [27].

Another factor that may have contributed to the fact that the diagnosis of bleeding in the animals of group E was much larger when compared to group C, refers to the fact that these animals presented thrombocytopenia before and after the turf. This condition may have favored bleeding of these animals up to grade V. It is known that thrombocytopenia, commonly diagnosed in animals with ehrlichiosis, may favor hemostasis disorders in horses, cattle and dogs, and in the latter, particularly in the chronic phase of disease, hemorrhagic diathesis may occur due to the intense thrombocytopenia [6, 28]. The changes in extrinsic pathways (exTEM®), α angle and MCF, correspond to the time of clot formation, the onset of the interaction between platelets and fibrinogen, and the interaction of α angle, which corresponds to the kinetics of clot formation, which could also be explained by thrombocytopenia. The maximum firmness of the clot depends on platelets and the activation of fibrinogen and factor XIII [29].

5.CONCLUSION

The evaluation of horses with EIPH naturally infected with *Ehrlichia* sp., performed through thromboelastometry (ROTEM® Delta), proved to be an important and efficient tool in the early detection of changes in the hemostatic profile of these animals, suggesting that hemoparasite infection of the genus *Ehrlichia* sp. may favor bleeding conditions in animals diagnosed with EIPH.

The profiles of hypocoagulability and hyperfibrinolysis identified here may spark new discussions about the importance of diagnostic screening for infectious diseases in these animals prior to competition. Further work is required to carefully investigate the impact and co-participation of *Ehrlichia* sp. in the pathophysiology of EIPH.

6. REFERENCES

- 1) UENO, T.E.H., AGUIAR, D.M., PACHECO, R.C., et al. *Ehrlichia canis* in dogs attended in a veterinary hospital from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p. 57-61, 2009.
- 2) HALAC, E. Infección por Ehrlichia en un niño: características clínicas y revisión de la bibliografía Ehrlichia infection in a child: clinical findings and review of the literature. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v.114, n.3, p. 199-200, 2016.
- 3) SAINZ, A., ROURA, X., MIRÓ, G., et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasitology Vectors**, v.8, n.75, p. 1-20, 2015.
- 4) DUMLER, J.S., MAGIDAN, J.E., PUSTERLA, N., BAKKEN, J.S. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical infectious diseases**, v.45, Supplement 1, p. 45-51, 2007.
- 5) PASA, S., URAL, K., GULTEKIN, M. Interpretation of Coagulation Tendency Contributing to Thrombosis in Vector-Borne Diseases (Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Leishmaniosis, and Dirofilariosis) among Dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1445-1451, 2017.
- 6) DAGNONE, A.S., De MORAIS, H.S., VIDOTTO, M.C., JOJIMA, F.S., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary parasitology**, v.117, n.4, p. 285-290, 2003.
- 7) LANGDORF, J.L., THOMSON, P.C., KNIGHT, P.K. Epistaxis in racehorses: risk factors and effects on career. **Australian Veterinary Journal**, v.91, n.13, p. 198-203, 2013.

- 316 8) MORLEY, P.S., BROMBEREK, J.L., SAULEZ, M.N., HINCHCLIFF, K.W.,
317 GUTHRIE, A.J. Exercise-induced pulmonary haemorrhage impairs racing
318 performance in Thoroughbred racehorses. ***Equine Veterinary Journal***, v.47,
319 n.34, p. 358-365, 2015.
- 320 9) SULLIVAN, S., HINCHCLIFF, K. Update on exercise-induced pulmonary
321 haemorrhage. ***Veterinary Clinics of North America: Equine Practice***, v.31, n.1,
322 p.187-198, 2015a.
- 323 10) HINCHCLIFF, K.W., COUETIL, L.L., KNIGHT, P.K., et al. Exercise Induced
324 Pulmonary Hemorrhage in Horses: American College of Veterinary Internal
325 Medicine Consensus Statement. ***Veterinary Clinical North America: Equine***
326 ***practice***, v. 3, n.12, p. 187-198, 2015
- 327 11) DOSTCH, T.M., DIRKMANN, D., BEZINOVER, D., et al. Assessment of
328 standard laboratory tests and rotational thromboelastometry for the prediction of
329 postoperative bleeding in liver transplantation. ***Brazilian Journal of***
330 ***Anaesthesiology***, v.119, n.3, p. 402-410, 2017.
- 331 12) SIGRIST, N.E., HOFER-INTEEWORN, N., JUDSCHEFER, R.,
332 KEUEMMERLE-FRAUNE, C., SCHNYDER, M., KUTTER, A.P.N.
333 Hyperfibrinolysis and Hypofibrinogenemia Diagnosed With Rotational
334 Thromboelastometry in Dogs Naturally Infected With *Angiostrongylus*
335 *vasorum*. ***Journal of Veterinary Internal Medicine***, v.31, n.4, p. 1091-1099,
336 2017.
- 337 13) MARLY-VOQUER, C., RIOND, B., JUDSCHEFER, R., KUTTER, A.P.
338 Reference values for rotational thromboelastometry (ROTEM) in clinically healthy
339 cats. ***Journal of Veterinary Emergency and Critical Care***, v.27, n.2, p.185-192,
340 2017.

- 341 14) KOL, A., & BORJESSON, D.L. Application of
 342 thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. ***Veterinary***
 343 ***clinical pathology***, v.39, n.4, p. 405-416, 2010.
- 344 15) PASCOE, J.R; FERRARO,G.L; CANNON, J.H; ARTHUR, R.M; WHEAT, J.D.
 345 Exercise-induced pulmonary hemorrhage in racing thoroughbreds: a preliminary
 346 study. ***American Journal Veterinary Research***, v. 42, n.5, p. 703-707, 1981.
- 347 16) DERKSEN, F.J., WILLIAMS, K.J., STACK, A. Exercise Pulmonary,
 348 Hemorrhage in horses: the role of pulmonary veins. ***Compendium Continuing***
 349 ***Education for Veterinarians***. 2011.
- 350 17) HINCHCLIFF, K.W., MORLEY, P.S., GUTHRIE, A.J. Efficacy of furosemide
 351 for prevention of exercise-induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred
 352 racehorses. ***Journal of American Veterinary Medicine Association***, v.235, n. ,
 353 p. 76–82, 2009.
- 354 18) SULLIVAN, S.L., WHITTEN, T., MORLEY, P.S., HINCHCLIFF, K.W. A
 355 systematic review and meta-analysis of furosemide for exercise induced
 356 pulmonary haemorrhage in thoroughbred and standardbred racehorses.
 357 ***Equine Veterinary Journal***, v.47, p.341-349, 2015(b).
- 358 19) PICCIONE, G., FAZIO, F., GIUDICE, E. Nycthemeral change of some
 359 haematological parameters in horses. ***Journal of Applied Biomedicine***, v.3, n.2,
 360 p.123– 128, 2005.
- 361 20) GIORDANO, A., MEAZZA, C., SALVADORI, M., PALTRINIERI.
 362 Thromboelastometric profiles of horses affected by exercise-induced pulmonary
 363 haemorrhages. ***Veterinary Medicine International***, v.30, n.2, p.1-6, 2010.
- 364 21) TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine Ehrlichiosis. In: GREENE, C.E.
 365 Infectious disease of the dog and cat. ***Philadelphia: W.B. Saunders***, v.14, n.2,

- 366 p.404-418, 1990.
- 367 22) HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A. et al. Platelets dysfunction associated
368 with experimental acute canine Ehrlichiosis. **Veterinary Research**, v.139, p.290-
369 293, 1996.
- 370 23) LEIR, H; VORVEG, M; HANKE, A; GORLINGER, K. Thromboelastometry
371 guided therapy bleeding. **Essener Runde algorithm. Hamostaseologie**, v.33, n.
372 1, p. 51-61, 2013.
- 373 24) COSTA,M.F.M.;THOMASSIAN,A.;GOMES,T.S. et al. Estudo da Hemorragia
374 Pulmonar induzida por esforço (HPIE) em cavalos de corrida PSI através da
375 análise de 1889 endoscopias respiratórias após corrida. **Revista Brasileira de**
376 **Ciência Veterinária**, v.11, n.3, p.89- 91, 2004.
- 377 25) HINCHCLIFF, K.W.; JACKSON, M.A.; MORLEY, P.S.; BROWN, J.A.;
378 DREDGE, A.E.; OCALLAGHAN, P.A.; McCAFFREY, J.P.; SLOCOMBE, R.E.;
379 CLARKE, A.E. Association between exercise-induced pulmonary hemorrhage
380 and performance in Thoroughbred racehorses. **Journal of the American**
381 **Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 5, p. 768-774, 2005.
- 382 26) HINCHCLIFF, K.W., MORLEY, P.S., GUTHRIE, A.J. Efficacy of furosemide
383 for prevention of exercise-induced pulmonary hemorrhage in thoroughbred
384 racehorses. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.235,
385 n.12, p. 76-82, 2009.
- 386 27) MENESES, I.D.S., SOUZA, B.M.P., TEIXEIRA, C.M.M., GUIMARÃES, J.E.
387 Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e
388 região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**,
389 v.9, n.4, p. 770-776, 2008.

- 390 28) XAVIER, M.S., ALMOSNY, N.R.P., NASCIMENTO, M.D., SILVA, G.V.O.,
391 BOTELHO, G.G. Avaliação da coagulação plasmática e plaquetometria em cães
392 não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp. **Arquivo**
393 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p. 1049-1053, 2009.
- 394 29) McMICHAEL, M. A., SMITH, S. A. Viscoelastic coagulation testing:
395 technology, applications, and limitations. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40,
396 n.2, p.140–153, 2011.
- 397 30) ABUELKASEM, E; LU, S; PLANINSIC, R; SAKAI, T. Comparison between
398 thrombelastography and thromboelastometry in hyperfibrinolysis detection
399 during adult liver transplantation. **British Journal of Anesthesia**, v.116, n. 4,
400 p.507-512, 2016.

Figure 1 - Graphical representation of TEM, referring to the exTEM®, inTEM® and fibTEM® tests, in racehorses (GC) at the pre and post exercise time.

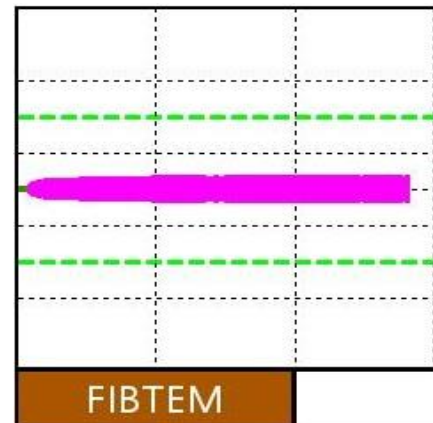
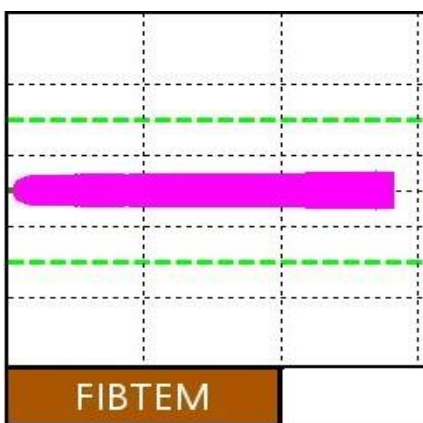
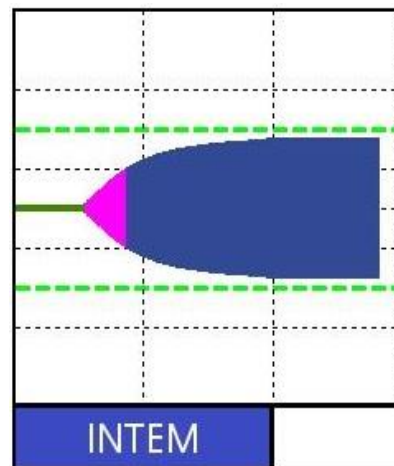
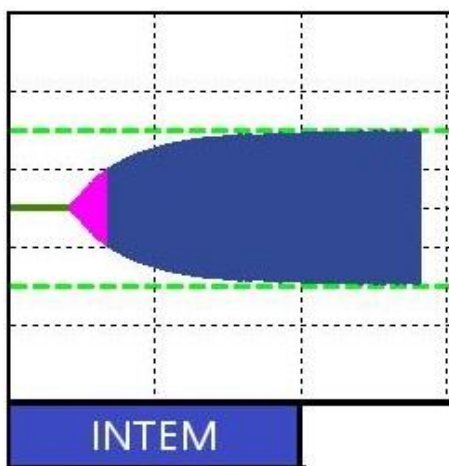
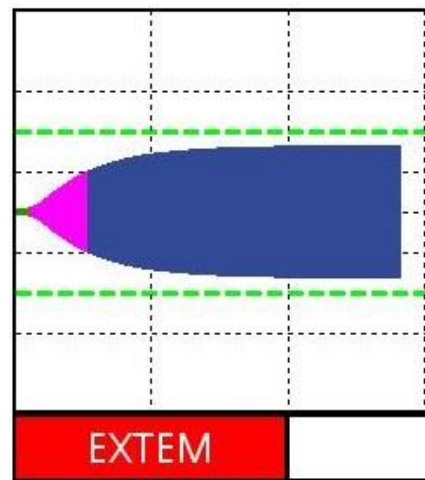
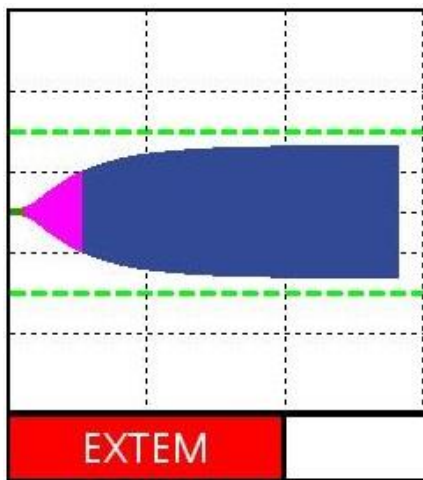
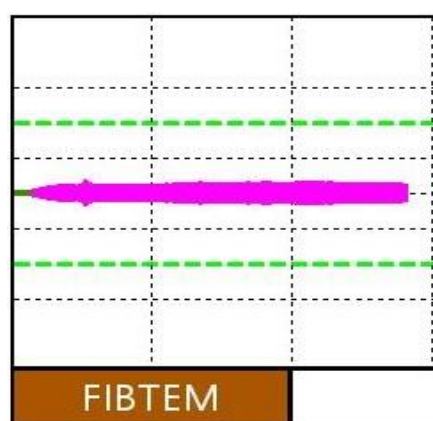
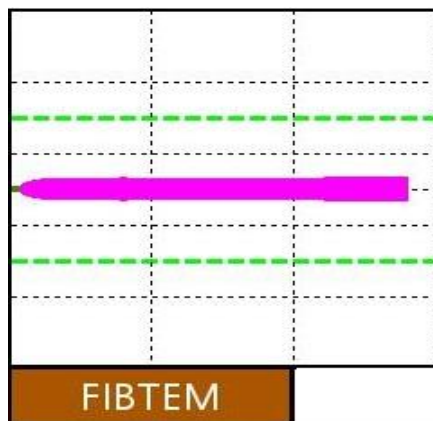
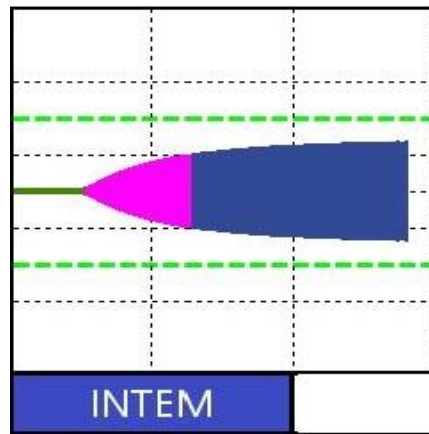
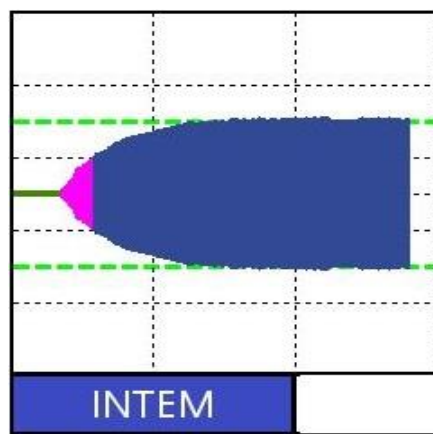
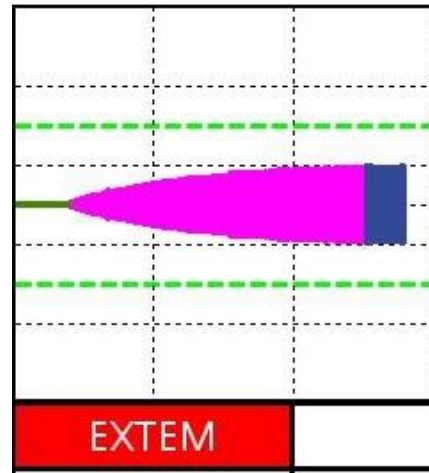
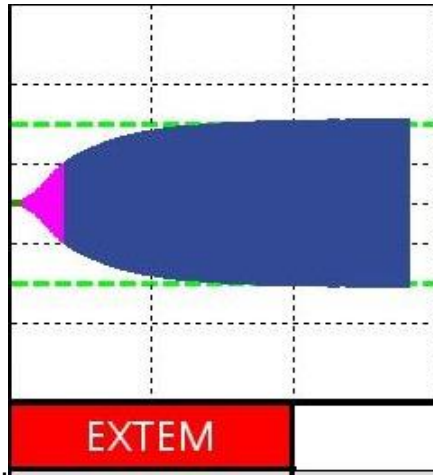


Figure 3 - Graphical representation of TEM, referring to the exTEM®,
 inTEM® and fibTEM® tests, in racehorses infected with *Ehrlichia* sp.
 (GE) in the pre and post exercise time.



418 Table 1. Distribution of mean, first and third percentile in relation to degree of
419 bleeding (EIPH) post exercise (n=26).

420		Group E	Grupo C	p-value
421	Median	5,000	2,000	**
422	25%	5,000	2,000	**
423	75%	5,000	3,000	**

424 Test t: $p \leq 0,05$: statistical difference. **: $p < 0,001$.

425

Table 2. Distribution of mean and standard deviation of thromboelastometry (TEM) variables in groups E and C pre exercise (n=14).

	Grupo E	GrupoC	p-valor
inTEM			
CT (s)	232,714±7,088	230,143±13,704	*
CFT (s)	141,000±133,250	114,000±102,500	*
A° α	64,429±8,243	72,286±4,461	*
MCF (mm)	61,286±3,450	45,286±9,160	**
A10	37,000±36,250	42,000±42,000	*
A20	40,000±40,000	49,000±46,500	*
exTEM			
CT (s)	61,000±3,651	53,429±4,429	**
CFT (s)	167,714±27,986	174,286±17,867	NS
A° α	62,000±59,750	72,000±68,250	NS
MCF (mm)	58,714±4,923	67,143±6,939	*
A10	36,571±1,134	41,143±6,939	NS
A20	40,571±0,976	44,714±8,200	NS
fibTEM			
CT (s)	79,000±76,000	82,000±60,750	NS
A10	6,000±6,000	17,000±13,000	**
A20	6,000±5,250	16,000±13,000	**

inTEM®: Contact activator. exTEM®: Tissue factor activator. fibTEM®: Activated tissue factor (exTEM®) + cytochalasin. CT: coagulation time. CFT: Clot formation time. A° α: Angle α; MCF: Maximum clot firmness. ML: Lise maxima. Test t: p≤0,05: statistical difference. * p≤0,05; ** p <0.001. NS: not significant.

Table 3. Distribution of mean and standard deviation of thromboelastometry (TEM) variables in groups E and C post exercise (n=14).

	Grupo E	Grupo C	p-valor
inTEM			
CT (s)	309,571±7,413	296,429±28,389	NS
CFT (s)	341,857±33,588	171,429±54,052	**
MCF (mm)	40,571±3,690	38,714±9,569	*
A20	32,714±1,799	46,143±6,094	**
exTEM			
CT (s)	65,000±13,952	77,571±15,219	NS
CFT (s)	298,286±14,919	162,286±13,817	**
A° α	51,857±5,014	62,571±10,706	*
MCF (mm)	43,429±3,599	42,857±12,720	NS
fibTEM			
CT (s)	65,00±13,952	77,571±15,219	NS
MCF (mm)	6,571±3,994	24,571±20,173	*
A20	7,571±0,787	15,571±3,259	**

inTEM®: Contact activator. exTEM®: Tissue factor activator.

fibTEM®: Activated tissue factor (exTEM®) + cytochalasin. CT:

coagulation time. CFT: Clot formation time. A° α: Angle α; MCF:

Maximum clot firmness. ML: Lise maxima. Test t: p≤0,05: statistical

difference. * p≤0,05; ** p <0.001. NS: not significant.

Table 4. Distribution of mean and standard deviation obtained by coagulometry for PT (prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time) and fibrinogen pre exercise (n =14).

	Group E	Group C	p-value
PT (s)	26,56±1,83	19,43±1,99	**
aPTT (s)	69,41±2,82	60,22±1,43	NS
FIB (mg/dL)	198,33±2,33	182,92±1,34	**

Test t: $p \leq 0,05$: statistical difference. **: $p < 0,001$. *: $p < 0,05$. NS: not significant.

(s): seconds. PT: prothrombin time. aPTT: activated partial thromboplastin time.

FIB: fibrinogen.

Table 5. Distribution of mean and standard deviation obtained by coagulometry for PT (prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time) and FIB (fibrinogen) post exercise (n=14).

	Group E	Group C	p-value
PT (s)	37,100±1,275	37,443±0,655	NS
aPTT (s)	73,300±2,982	88,300±2,345	*
FIB (mg/dL)	113,12±2,33	177,62±1,34	**

Test t: $p \leq 0,05$: statistical difference. **: $p < 0,001$. *: $p < 0,05$. NS: not

significant. (s): seconds. PT: prothrombin time. aPTT: activated

partial thromboplastin time. FIB: fibrinogen.

Table 6. Distribution of mean and standard deviation of hematocrit, total plasma proteins and platelets of group E and C pre exercise (n=14).

	Hematocrit (%)	TPP (g/dL)	Platelets (μ L)
Group E pre	35,14 $\pm$ 2,41	9,71 $\pm$ 0,47	137.064,3 $\pm$ 58.441,5
Group C pre	46,29 $\pm$ 2,63	6,86 $\pm$ 0,43	209.721,4 $\pm$ 85950,7
p-value	<0,01	<0,01	0,089

Test t: $p \leq 0,05$: statistical difference. TPP: total plasm protein.

Table 7. Distribution of mean and standard deviation of hematocrit, total plasma proteins and platelets of group E and C post exercise (n=14).

	Hematocrit (%)	TPP (g/dL)	Platelets (μ L)
Group E post	59,71 $\pm$ 1,25	12,0 $\pm$ 0,31	75.575,0 $\pm$ 38.974,6
Group C post	67,71 $\pm$ 2,06	8,57 $\pm$ 0,44	225.800,0 $\pm$ 59.670,6
p-value	<0,01	<0,01	<0,01

Test t: $p \leq 0,05$: statistical difference. Total plasm protein: TTP.

Table 8. Distribution of mean and standard deviation of hematocrit, total plasma proteins and platelets of pre and post exercise group E (n=7).

	Hematocrit (%)	TPP (g/dL)	Platelets (μ L)
Group E pre	35,14 $\pm$ 2,41	9,71 $\pm$ 0,47	137.064,3 $\pm$ 58.441,5
Group E post	59,71 $\pm$ 1,25	12,0 $\pm$ 0,45	75.575,0 $\pm$ 38.974,6
p-value	<0,01	<0,01	<0,01

Test t: $p \leq 0,05$: statistical difference. TTP: total plasma protein.

Table 9. Distribution of mean and standard deviation of hematocrit, total plasma proteins and platelets of pre and post exercise group C (n=7).

	Hematocrit (%)	TPP (g/dL)	Platelets (μ L)
Group C pre	46,29 $\pm$ 2,63	6,86 $\pm$ 0,43	209.721,4 $\pm$ 85950,7
Group C post	67,71 $\pm$ 2,06	8,57 $\pm$ 0,44	225.800,0 $\pm$ 59.670,6
p-value	<0,01	<0,01	0,216

Test t: $p \leq 0,05$: statistical difference. TPP: total plasma protein.

Table 10. Distribution of mean and standard deviation of time (s) from beginning to end of the pareo (n=14).

	Group E	Group C	p-value
Time (s)	57,429 $\pm$ 2,149	49,143 $\pm$ 1,574	$p < 0,001$
Distance	1.000 m	1.000 m	-

Mann-Whitney: $p \leq 0,05$: statistical difference. m: meters.

13. ANEXOS

Figura 2 - Avaliação do sistema cardiorespiratório pós corrida.



Figura 3 - Realização do exame traqueobrônquico, com visualização da bifurcação da traqueia (carina) pré exercício. Animal sem alterações visíveis, mucosa normocorada e sem presença de muco.



Figura 4 - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício pós corrida. Presença de traços de sangue no lúmen traqueal (seta), compatível com HPIE grau I.

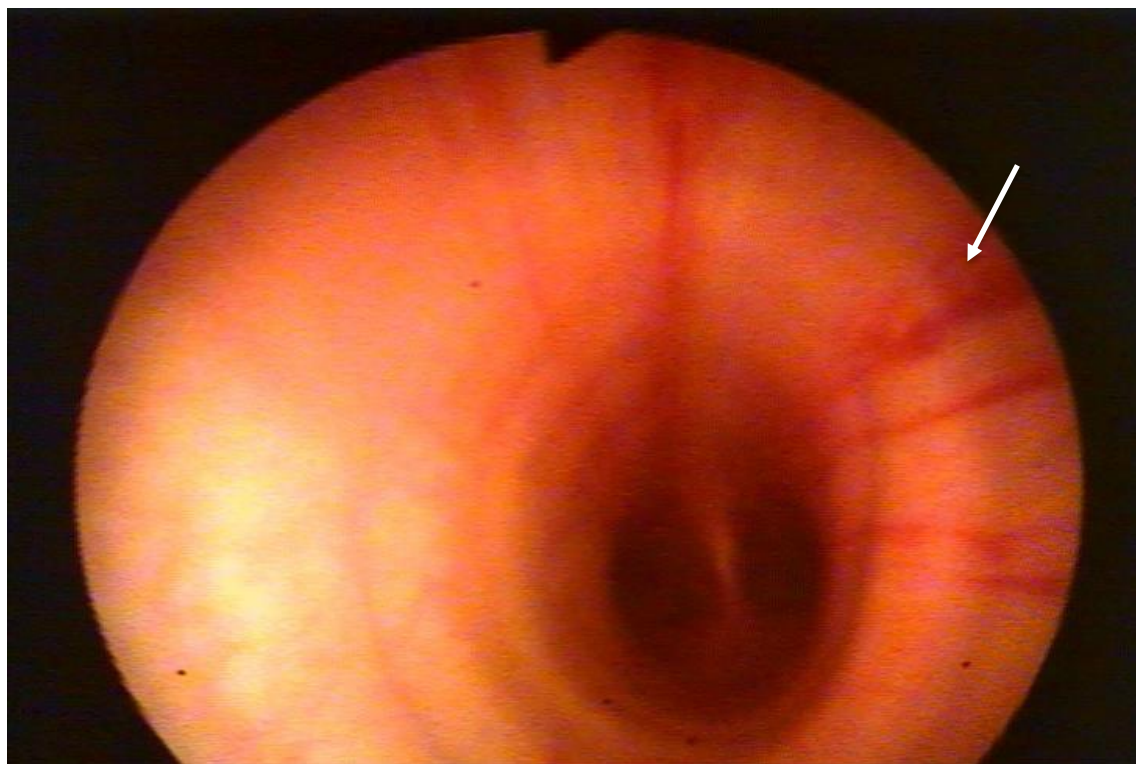


Figura 5 - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício pós corrida. Presença de filetes de sangue no lúmen traqueal (seta), compatível com HPIE grau II.

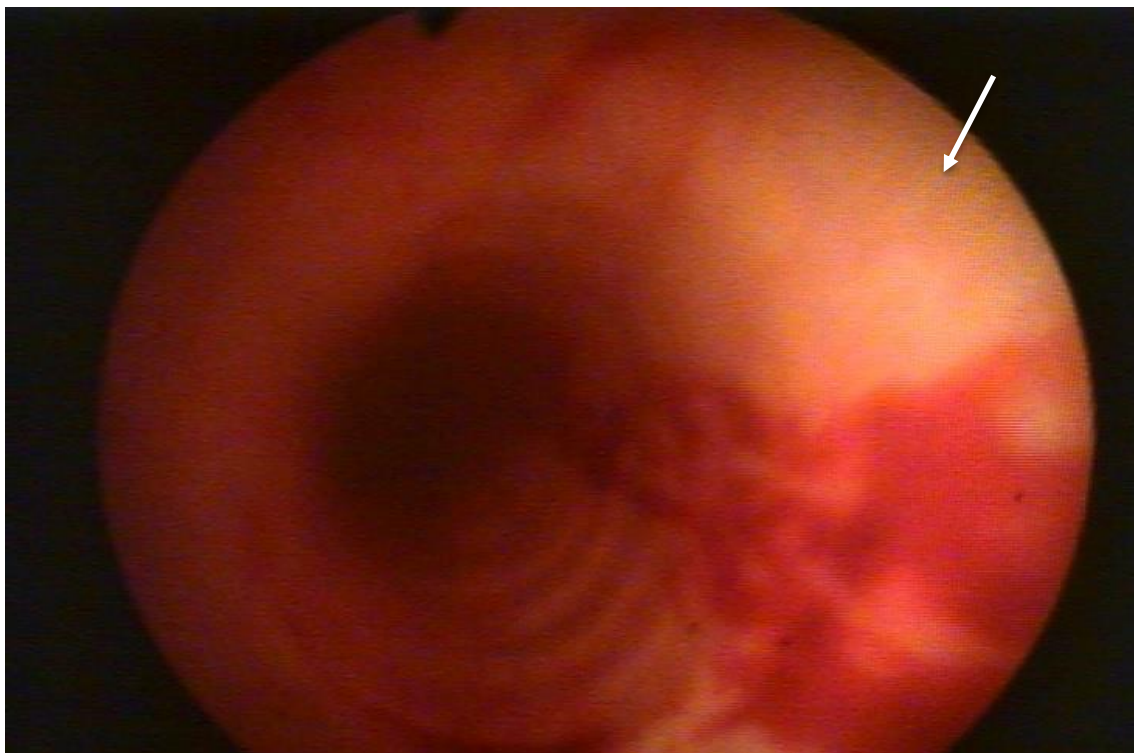


Figura 6- Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, pós corrida. Presença de de sangue em todo lumém tranqueal (seta), compatível com HPIE grau III.

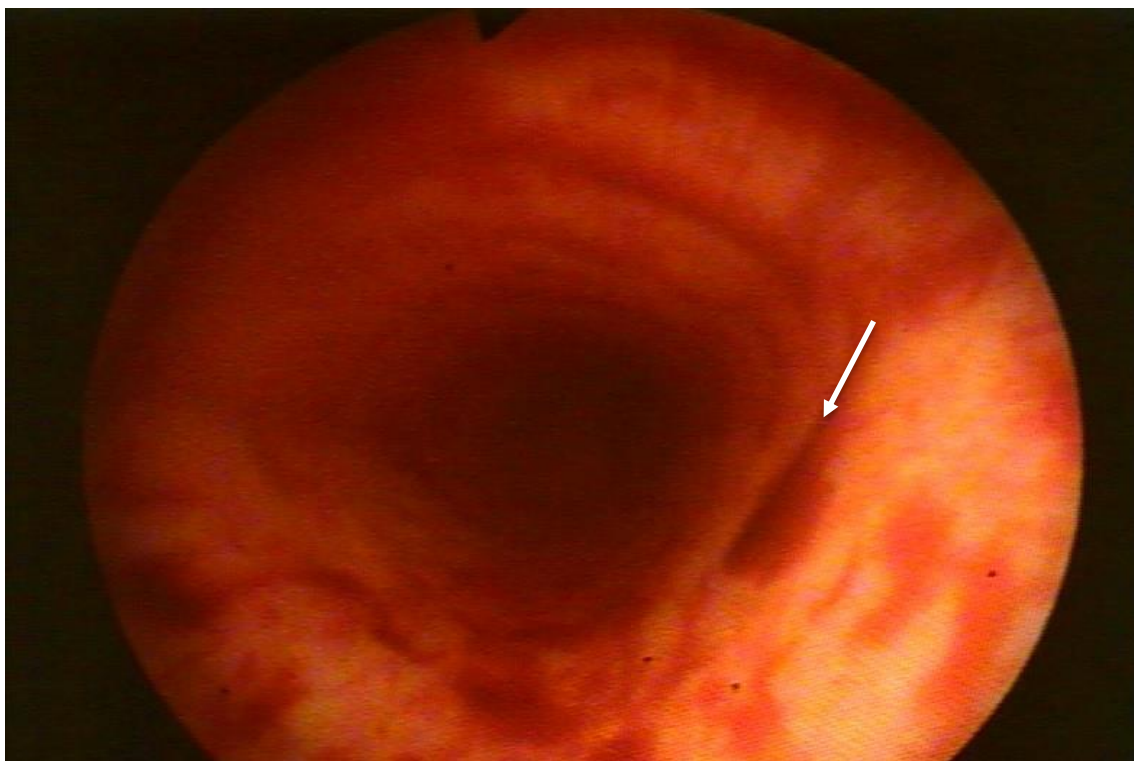


Figura 7 - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício pós corrida. Presença de quantidade abundante de sangue em todo lúmen traqueal (seta), compatível com HPIE grau IV.

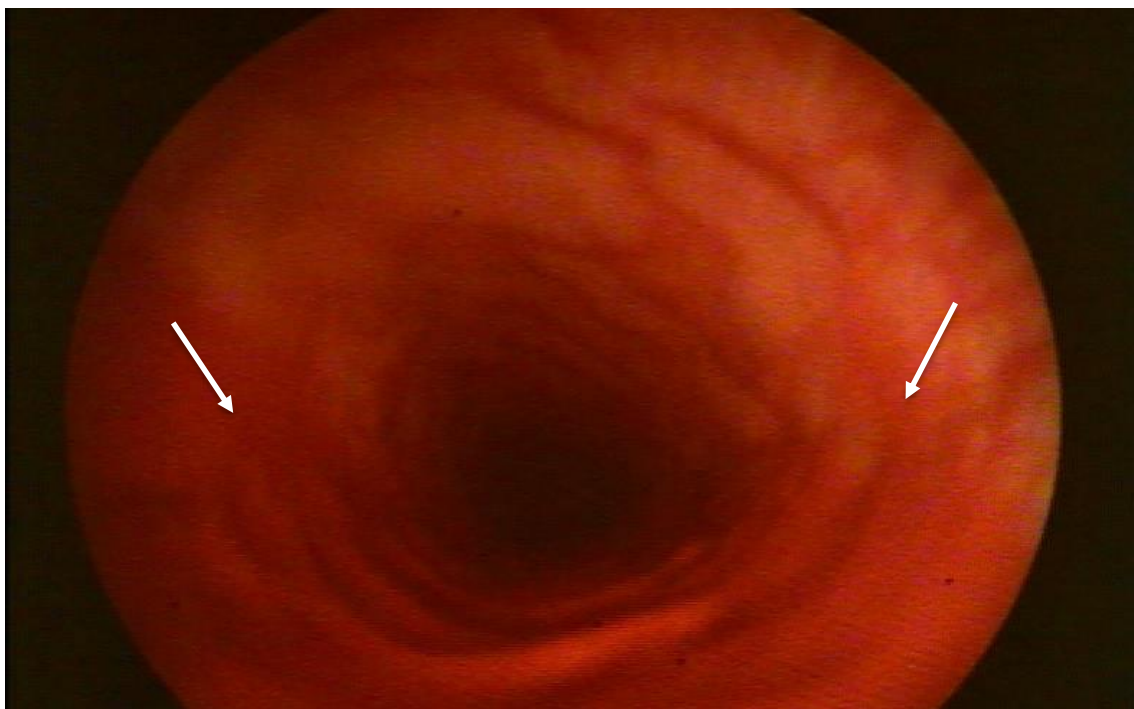


Figura 8 - Animal com hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, com manifestação de epistaxe pós corrida. Na imagem, presença de grande quantidade de sangue visualizada em região de glote (seta), compatível com HPIE grau V.

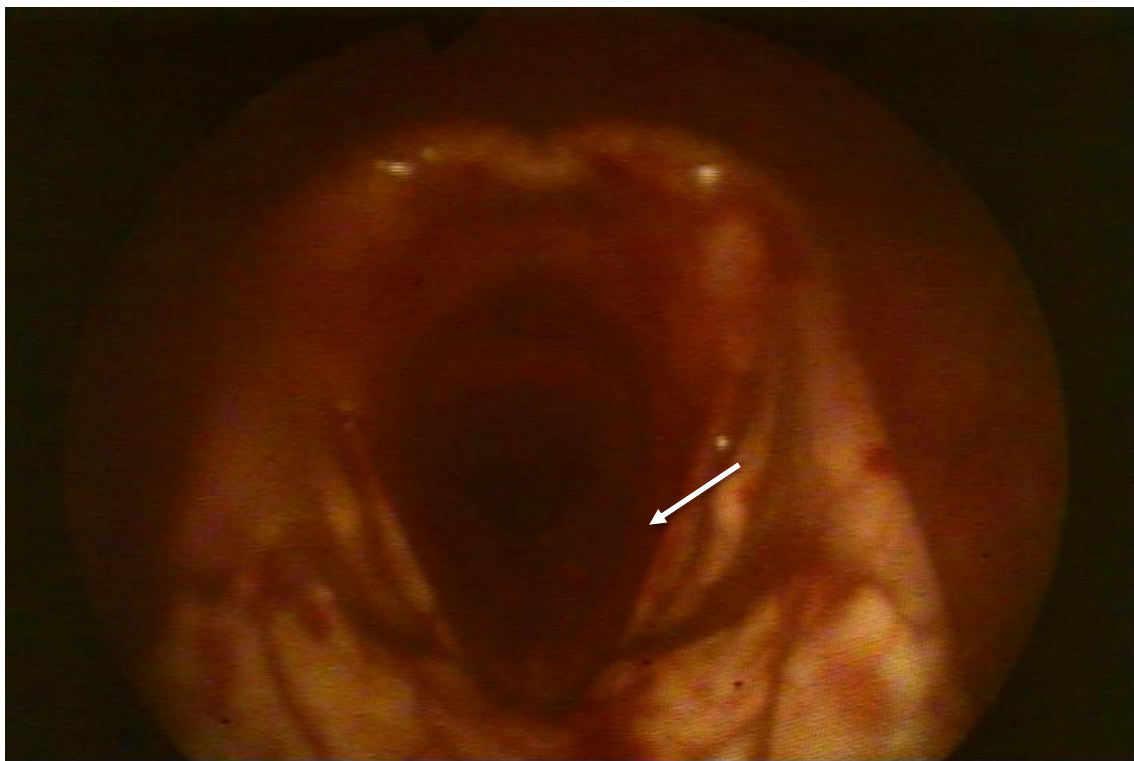
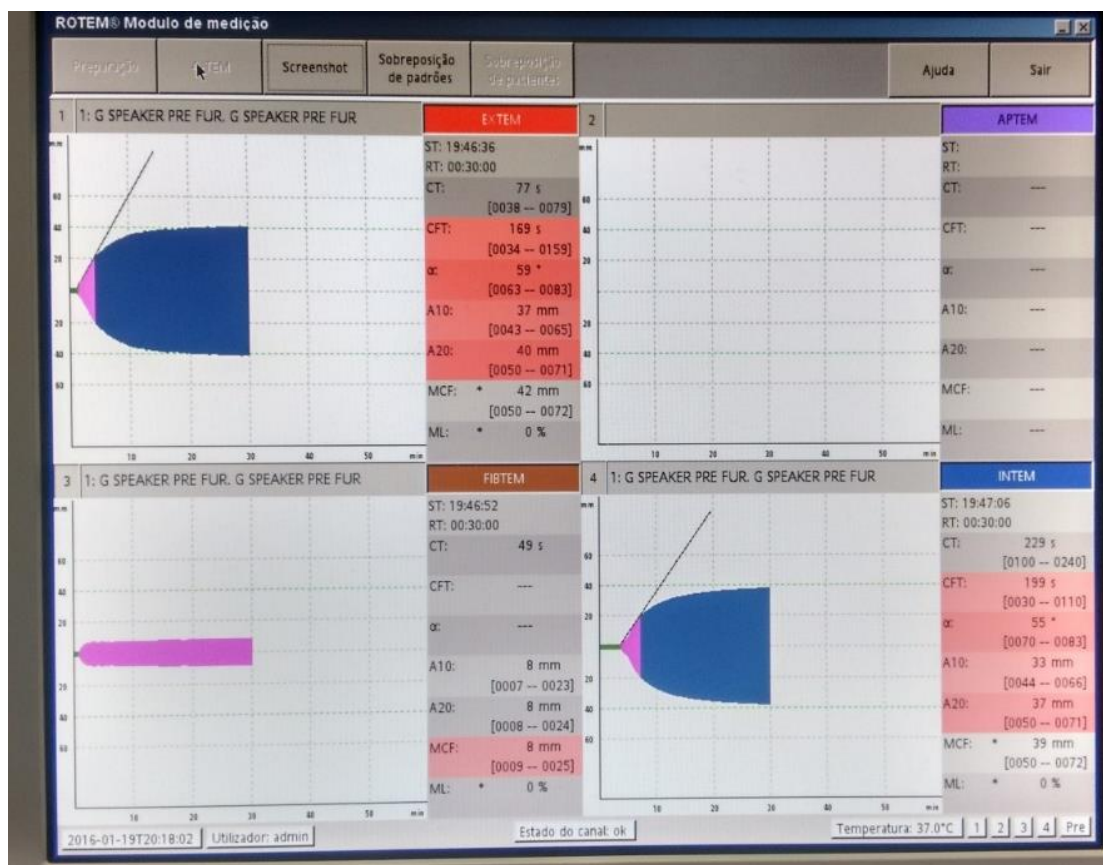


Figura 9 - Avaliação do sistema hemostático utilizando o aparelho de tromboelastometria (ROTEM® Delta). Na imagem, a formação dos gráficos obtidos através da avaliação das três principais vias da coagulação extrínseca (exTEM), intrínseca (inTEM) e fibrinolítica (fibTEM).



TABELAS

Tabela 1 - Fatores de coagulação, síntese e meia vida plásmatica (corpo texto).

Tabela 2 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% do grau de sangramento pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE não tratados (GC) ou tratados com furosemida (n=26).

TRATAMENTO	PRÉ	PÓS	p-valor
Controle	0,0 [0-0]	3,0 [3-4]	<0,01
Furosemida	0,0 [0-0]	3,0 [2-3]	<0,01

Teste de Wilcoxon $p < 0,05$.

Tabela 3 - Distribuição de médias e desvio padrão das variáveis tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), Ângulo α ($A^\circ \alpha$), firmeza máxima do coágulo (MCF) e lise máxima (ML) obtidos através da avaliação da tromboelastometria (ROTEM® Delta).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-valor
inTEM (Via intrínseca)			
$A^\circ \alpha$ (%)	57,3 $\pm$ 7,5	56,9 $\pm$ 7,3	NS
MCF (mm)	35,4 $\pm$ 0,9	34,9 $\pm$ 0,8	0,03
A10 (mm)	31,7 $\pm$ 4,4	35,1 $\pm$ 11,1	NS
A20 (mm)	34,7 $\pm$ 6,3	36,4 $\pm$ 9,4	NS
exTEM (Via extrínseca)			
CT (s)	67,2 $\pm$ 25,2	75,5 $\pm$ 23,9	0,03
CFT (s)	180,3 $\pm$ 44,1	199,4 $\pm$ 58,9	NS
$A^\circ \alpha$ (%)	57,9 $\pm$ 9,8	57,0 $\pm$ 8,4	0,01
MCF (mm)	37,8 $\pm$ 6,9	38,0 $\pm$ 8,1	NS
A10 (mm)	35,1 $\pm$ 6,6	36,0 $\pm$ 6,0	NS
A20 (mm)	37,5 $\pm$ 6,7	38,0 $\pm$ 6,4	NS
fibTEM (Fibrinólise)			
A10 (mm)	10,0 $\pm$ 4,4	12,1 $\pm$ 6,6	NS
A20 (mm)	13,6 $\pm$ 6,3	14,6 $\pm$ 5,5	NS

Teste t pareado ($p < 0,05$). (s): Segundos. CT: Tempo de coagulação. CFT: Tempo de formação do coágulo. α : Ângulo α . MCF: Firmeza máxima do coágulo. ML: Lise máxima.

Tabela 4 - Distribuição das Medianas e percentis 25 e 75% das variáveis tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), Ângulo α ($A^\circ \alpha$), firmeza máxima do coágulo (MCF) e lise máxima (ML) obtidos através da avaliação da tromboelastometria (ROTEM® Delta) pós exercício nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-valor
inTEM (Via intrínseca)			
CT (s)	276,5 [243,0-308,0]	282,5 [265,0-312,0]	0,03
CFT (s)	188,5 [172,0-222,0]	206,5 [157,0-242,0]	NS
$A^\circ \alpha$ (%)	64,0 [61,0-67,0]	68,0 [64,0-71,0]	0,04
ML (%)	0,0 [0,0-4,0]	0,0 [0,0-0,0]	NS
exTEM (Via extrínseca)			
LM (%)	0,0 [0,0-1,0]	1,0 [0,0-2,0]	NS
fibTEM (Fibrinólise)			
CT (s)	62,5 [54,0-78,0]	72,5 [57,0-83,0]	NS
CFT (s)	0,0 [0,0-0,0]	0,0 [0,0-0,0]	NS
$A^\circ \alpha$ (%)	62,0 [0,0-66,0]	0,0 [0,0-65,0]	0,02
A20 (mm)	9,5 [8,0-12,0]	10,5 [9,0-15,0]	NS
MCF (mm)	9,0 [8,0-12,0]	10,0 [8,0-13,0]	NS
ML (%)	0,5 [0,0-5,0]	0,0 [0,0-0,0]	NS

Teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). (s): Segundos. CT: Tempo de coagulação. CFT: Tempo de formação do coágulo. α : Ângulo α . MCF: Firmeza máxima do coágulo. ML: Lise máxima.

Tabela 5 - Distribuição de média e desvio padrão de hemácias pré e pós exercício em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-valor
Hemácias pré (μL)	7,559 $\pm$ 0,22	9,453 $\pm$ 0,14	<0,001
Hemácias pós (μL)	13,152 $\pm$ 0,67	12,564 $\pm$ 0,53	0,002

Teste t pareado ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Distribuição de média e desvio padrão do hematócrito pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-value
Hematócrito pré (%)	43,7 $\pm$ 1,485	46,9 $\pm$ 2,208	<0,001
Hematócrito pós (%)	67,0 $\pm$ 1,918	68,6 $\pm$ 1,416	<0,001

Teste t pareado ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% de proteína total sérica (PTS) pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-valor
PTS pré (g/dL)	7,1 [7,0-7,2]	8,2 [8,0-8,2]	<0,001
PTS pós (g/dL)	7,8 [7,8-8,0]	10,0 [9,6-11,0]	<0,001

Teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). PTS: Proteína total sérica.

Tabela 8 - Distribuição de média e desvio padrão para contagem de plaquetas pré e pós exercício, em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle	Furosemida	p-valor
Plaquetas pré (μL)	257089±39091	262352±55554	NS
Plaquetas pós (μL)	185087± 57040	191768±76171	<0,001

Teste de Wilcoxon (p<0,05). NS: Não significativo.

Tabela 9 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% dos testes de hemostasia obtidos através de coagulometria para TP (tempo de protrombina), TTPa (tempo de tromboplastina parcial ativada) e fibrinogênio pré exercício nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle	Furosemida	p-valor
TP (s)	12,2 [12,2-12,4]	12,3 [12,2-12,6]	NS
TTPa (s)	44,7 [44,7-45,8]	45,7 [45,7-46,8]	0,04
Fibrinogênio (mg/dL)	183 [176-186]	182,5 [166-185]	NS

Teste t pareado. NS: não significativo. (s): Segundos. TP: Tempo de protrombina. TTPa: Tempo de tromboplastina parcial ativada.

Tabela 10 - Distribuição de média e desvio padrão das variáveis obtidas através de coagulometria para TP (tempo de protrombina), TTPa (tempo de tromboplastina parcial ativada) e fibrinogênio pós exercício nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-valor
TP (s)	22,557±1,831	18,757±1,049	0,001
TTPa (s)	65,643±2,766	64,186±1,613	NS
Fibrinogênio (mg/dL)	38,843±1,630	34,971±1,855	0,001

Teste t pareado (p=0,05). NS: não significativo. (s): Segundos. TP: Tempo de protrombina. TTPa: Tempo de tromboplastina parcial ativada.

Tabela 11 - Distribuição de média e desvio padrão do exame bioquímico (ureia, creatinina, FA, GGT e albumina) pós exercício em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-valor
Ureia (mg/dL)	35,4±2,9	36,3±1,8	NS
Creatinina (mg/dL)	1,5±0,2	1,37 ±0,1	0,026
FA (UI/L)	224,3±61,1	232,7±66,1	NS
Albumina (g/dL)	3,8±0,25	3,8±0,21	NS

Teste t pareado (p<0,05). FA: fosfatase alcalina. GGT: gama glutamil transferase.

Tabela 12 - Distribuição das medianas e percentis 25 e 75% dos exames bioquímicos (ALT, AST e PTS) pós exercício em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle	Furosemida	p-valor
ALT (UI/L)	30,2±13,2	36,6±9,6	0,03
AST (UI/L)	401,1±145,8	498,6±96,0	0,01
PTS (g/dL)	7,3±0,4	9,0±0,3	NS

Teste t pareado ($p < 0,05$). ALT: alanina amino transferase. AST: Aspartato amino transferase. PTS: Proteína total sérica.

Tabela 13 - Distribuição de média e desvio padrão do lactato plasmático pré (0), imediatamente após (i) e 30 minutos pós exercício (ii), em cavalos PSI com HPIE nos grupos controle (GC) e tratado (GF) (n=26).

	Controle (GC)	Furosemida (GF)	p-valor
Lactato (0) g/dL	8,827±0,758	8,673±0,773	NS
Lactato (i) g/dL	246,173±16,135	255,215 ±13,843	0,02
Lactato pós (ii) g/dL	157,185±15,607	174,885±13,848	0,001

Teste t pareado ($p < 0,05$). NS = não significativo. (i): Imediatamente após corrida.