

ANA CATARINA MARTINS SERELHA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO
HEMATOLÓGICO DO CAVALO PURO SANGUE
LUSITANO E PESQUISA DE HEMOPARASITAS**

Orientadora: Prof.^a Doutora Joana de Sousa Azevedo Simões

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2022

ANA CATARINA MARTINS SERELHA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO HEMATOLÓGICO
DO CAVALO PURO SANGUE LUSITANO E PESQUISA
DE HEMOPARASITAS**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 02 de Junho de 2022, perante o júri, com o Despacho de Nomeação nº 215/2022, de 20 de Maio, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Pedro Faísca, por delegação da Prof^a. Doutora Laurentina Pedroso;

Arguente: Professora Doutora Clarisse Coelho;

Orientador: Professora Doutora Joana de Sousa Azevedo Simões

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2022

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, ajudaram a que este percurso e dissertação se concretizassem.

Primeiramente gostava de agradecer à minha instituição de ensino - ULHT-FMV - e aos professores, funcionários e colegas, por me transmitirem conhecimentos e valores essenciais para a minha formação pessoal e profissional enquanto Médica Veterinária.

À Dra. Cátia Sofia Candeias Mousinho, um agradecimento especial, por toda a paciência, tempo, companheirismo e conhecimento, durante a realização do estágio. Que para além dos ensinamentos teóricos e da vida profissional, também me transmitiu a sua excelente ética de trabalho e valores pessoais, que irei certamente aplicar na minha futura vida profissional enquanto Médica Veterinária.

Às minha duas amigas e colegas de curso Carolina Brau Canadas e Maria Carolina Oliveira, por todos os momentos de diversão, parvoíce, companheirismo e amizade, mas também por todos os momentos difíceis em que precisei de vocês e sempre estiveram lá.

À minha orientadora Professora Doutora Joana de Sousa Azevedo Simões, por todo o tempo, paciência, conhecimento e apoio, na realização deste projeto.

Ao Professor Doutor David Wilson Russo Ramilo, por disponibilizar do seu tempo para me ajudar na análise estatística e análise dos esfregaços sanguíneos.

Às Doutoras Carolina Guerreiro e Irina Pinheiro, pela disponibilidade e ajuda na recolha das amostras para a realização desta dissertação.

A toda a minha família, mais próxima e mais afastada que me apoiou durante este percurso académico.

À minha prima Patrícia, pela amizade que vai para além de laços de sangue, por os conselhos de vida que me deste e por me acompanhares desde sempre em todos os meus percursos de vida. Ao meu Avô António Martins, pela força incrível e ensinamentos que me transmitiu. Ao meu Tio

Jorge António Martins, por ser o eterno brincalhão e me inspirar a querer atingir sempre mais e superar dificuldades.

Ao Tomás Miguel Fernandes Meneses, namorado e companheiro para a vida, um agradecimento muito especial, por me apoiar incondicionalmente, incentivar e compreender as dificuldades desta profissão e nos dias mais ‘negros’ por me ajudar e impulsionar para a ‘frente’. Por todo o amor, bondade, carinho, e principalmente, ponderação que me transmite.

Aos meus pais, um agradecimento muito especial, por me darem a oportunidade de continuar os estudos. Ao meu Pai por se ter sacrificado, lutado e colocar-se em segundo plano em prol da minha educação e formação. À minha mãe que me transmitiu valores e ensinamentos pessoais que fazem dela a pessoa mais incrível e que um dia tento almejar ser, apesar de ser quase impossível. Por ter lutado tanto na vida e se ter levantado sempre para me ajudar e proporcionar a vida que tive. Por ter incutido a importância da formação académica, disciplina e brio pessoal. Por fim, por todo o seu apoio e carinho, sem tudo isto, claramente, eu não estaria nesta posição em que me encontro na vida.

RESUMO

Esta tese focou-se na caracterização do hemograma e bioquímicas plasmáticas de cavalos Puro Sangue Lusitanos (PSL) e na comparação dos resultados obtidos com os descritos para outras raças. A população estudada incluiu 52 equinos de raça PSL, dos quais 34 machos inteiros (66,7%) e 17 fêmeas (33,3%), com idades compreendidas entre os 2 a 5 anos ($3,19 \pm 1,06$). No hemograma foram analisados os valores de eritrócitos totais, hematócrito (HTC), hemoglobina (Hg), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos totais e respectiva contagem diferencial e plaquetas totais. Nas bioquímicas plasmáticas foram analisados valores de aspartato aminotransferase (AST), compostos azotados da ureia sérica (BUN), gamma glutamiltransferase (GGT), proteínas totais (PT), creatinina quinase (CK), creatina, bilirrubina total e albumina. Ainda, foram observados sistematicamente todos os esfregaços sanguíneos para descartar a presença de hemoparasitas. Os resultados obtidos foram comparados com dados previamente publicados para cavalos PSL, Puro-Sangue Inglês (PSI) e da raça Andaluz. Adicionalmente, foi realizado o teste ‘t-student’ para todos os parâmetros analisados com o objetivo de comparar as médias obtidas da população estudada com as médias previamente descritas nas raças anteriormente referidas.

Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população estudada e as médias reportadas. Comparativamente à população de PSI, apenas as diferenças nas médias de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (HCM) e proteínas totais (PT) não foram significativas ($p > 0,05$). Contudo, o valor médio de bilirrubina total, albumina, compostos azotados da ureia sérica (BUN), creatinina, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e creatinina quinase (CK), na população estudada foi significativamente inferior ao reportado em PSI ($p < 0,05$).

Até à data ainda existem poucos estudos sobre os intervalos de referência de bioquímicas sanguíneas em cavalos PSL, pelo que os valores de referência obtidos neste trabalho podem ajudar o médico veterinário, se forem tomados em consideração aquando da interpretação de hemogramas e bioquímicas plasmáticas de PSL. Os resultados deste estudo poderão contribuir para a padronização de intervalos de referência para os parâmetros descritos em cavalos saudáveis da raça PSL.

Palavras-chave: Hemograma, Bioquímicas Plasmáticas, Puro-Sangue Lusitano, caracterização, teste ‘t-student’.

ABSTRACT

This focused on the characterization of the complete blood count (CBC) and plasma biochemistry of Lusitano Purebred (PSL) horses and aimed to compare the obtained results with those of other breeds. The studied population included 52 PSL horses, namely 34 stallions (66,7%) and 17 mares (33,3%), with ages ranging from 2 to 5 years ($3,19 \pm 1,06$). In the CBC, total erythrocytes, hematocrit (HTC), hemoglobin (Hg), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), total leukocytes and their differential count, and total platelets were analyzed. Plasma biochemistry values of aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), gamma-glutamyltransferase (GGT), total proteins (PT), creatinine kinase (CK), creatine, total bilirubin, and albumin were analyzed. Also, all blood smears were systematically observed to rule out the presence of hemoparasites. The obtained results were compared with previously published data for the PSL, Thoroughbred (PSI) and Andalusian breeds. Additionally, the 't-student' test was performed for all analyzed parameters, in order to compare the sample means of the studied population with those described for the previously mentioned breeds.

Significant differences ($p \leq 0,05$) were observed between the studied population and the reported parameters for PSL, PSI and Andalusian horses. Compared to the PSI population, only the differences in the means of hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin (MCH) and total protein (TPs) were not significant ($p > 0,05$). However, the mean value of total bilirubin, albumin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT) and creatinine kinase (CK), in the study population was significantly lower than that reported in PSI ($p < 0,05$).

To date there are still very few studies on the reference intervals of blood biochemistry parameters in healthy PSL horses. As such, the reference values described in this study may be of help to equine practitioners when interpreting blood counts and plasma biochemistry of PSL horses. Thus, the results of this study may contribute to the standardization of the parameters described for the PSL breed.

Keywords: Complete Blood Count, Serum Biochemistry, Lusitano Purebred, characterization, test t-student.

LISTA DE ABREVIATURAS

%- Percentagem

μL - Microlitro

μm- Micrómetro

AST – Aspartato aminotransferase

ATP - Adenosina trifosfato

BAS - Basófilos

BUN – Compostos azotados da ureia sérica

CBC- ‘Complete blood count’

CFT- ‘Complement fixation test’

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CID - Coagulação intravascular

CK- Creatinina quinase

dL - Decilitro

DNA- ‘Deoxyribonucleic acid’

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- ‘Enzyme-linked immunosorbent assay’

EOS - Eosinófilos

EPO - Eritropoetina

ERT - Eritrócitos

fL - Fentolitro

G - Gauge

g/dL - Grama por decilitro

GGT - Gamma glutamiltransferase

HCM - Hemoglobina corpuscular média

HG- Hemoglobina

HTC - Hematócrito

LEUC - Leucócitos

LINF - Linfócitos

mL - Mililitro

NEU - Neutrófilos

NK - *Natural killers*

PCR- ‘Polymerase chain reaction’

PCT-Plaquetócrito

pg - Picograma

PLQ - Plaquetas

PSI - Puro Sangue Inglês

PSL - Puro Sangue Lusitano

RNA- ‘Ribonucleic acid’

SDH - Sorbitol desidrogenase

TPO - Trombopoetina

VCM - Volume corpuscular médio

VDP - Variação da distribuição das plaquetas

VPM - Volume plaquetário médio

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE GERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE TABELAS.....	10
I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	11
II. INTRODUÇÃO	14
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1. COLHEITA DA AMOSTRA E ACONDICIONAMENTO	15
2. ESFREGAÇO SANGUÍNEO	16
3. INTERPRETAÇÃO DO HEMOGRAMA	17
3.1. <i>Eritrograma</i>	17
3.2. <i>Leucograma</i>	22
3.2.1 <i>Neutrófilos</i>	23
3.2.2 <i>Linfócitos</i>	24
3.2.3 <i>Monócitos</i>	26
3.2.4 <i>Eosinófilos</i>	27
3.2.5 <i>Basófilos</i>	28
4. TROMBOGRAMA.....	29
5. INTERPRETAÇÃO DAS BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS	30
6. PIROPLASMOSE	35
7. LIMITAÇÕES DO HEMOGRAMA E DAS BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS: INFLUÊNCIA DA IDADE, RAÇA E ATIVIDADE FÍSICA.....	37
IV. PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.....	40
1. OBJETIVOS.....	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1. <i>Caracterização da população</i>	40
2.2. <i>Colheita e processamento da amostra para hemograma e bioquímicas plasmáticas</i>	41
2.3. <i>Esfregaço Sanguíneo</i>	43
2.4. <i>Estatística</i>	45
4. RESULTADOS.....	45
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO.....	60
V. BIBLIOGRAFIA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Procedimentos de profilaxia.....	11
Figura 2- Procedimentos de Medicina Reprodutiva.	12
Figura 3- Procedimentos de Identificação Animal.	12
Figura 4- Patologias Observadas.	12
Figura 5- Procedimentos e patologias reportadas em Podologia.....	13
Figura 6- Procedimentos em Feridas e Cirurgia.	13
Figura 7- Outros procedimentos.	13
Figura 8- Esquema técnica esfregaço sanguíneo 'Wedge'	16
Figura 9- Neutrófilo, Eritrócitos, Plaquetas e artefacto	24
Figura 10- Alterações tóxicas do neutrófilo, basofilia citoplasmática e corpos de 'Dohle'. Formação de 'rouleaux'.	24
Figura 11- Linfócito maduro.	25
Figura 12- Linfócito reativo.	25
Figura 13- Linfócito grande granular, com inúmeros grânulos magenta corado com 'Giemsa' de um cavalo com linfoma grande granular.....	25
Figura 14- Monócito com núcleo lobulado, vacúolos citoplasmáticos e pseudofilia.	26
Figura 15-Eosinófilo de cavalo.....	27
Figura 16- Basófilo de cavalo.....	28
Figura 17- Plaquetas	30
Figura 18- Representação esquemática dos possíveis modos de transmissão de piroplasmose equina.	35
Figura 19- Eritrócito de equino contendo merozoítos de <i>B. caballi</i>	36
Figura 20- Eritrócitos de equino, a seta indica quatro merozoítos de <i>T. equi</i> , referido como "cruz de malta".....	36
Figura 21- Colheita de sangue da veia jugular esquerda.....	41
Figura 22-Plasma separado para tubo de 'eppendorf'.....	42
Figura 23- Sangue centrifugado para análises bioquímicas séricas.....	42
Figura 24-Esfregaços sanguíneos corados com solução 'Diff-Quik'.	43
Figura 25- Minipet.	43
Figura 26-Esfregaço sanguíneo com presença de corpos de 'Heinz' e basófilo.....	44
Figura 27-Esfregaço com a presença de plaquetas, neutrófilos segmentados e eosinófilo...	44

Figura 28- Diagrama de extremos e quartis de ERT expresso em $\times 10^{12}$ /L, de HCM expresso em pg e CHCM expresso em g/dL da amostra.....	46
Figura 29-Diagrama de extremos e quartis de Hg expresso em g/dL, de HTC expresso em %, VCM expresso em fL e PLQ expresso em 10^9 /L.	46
Figura 30- Diagrama de extremos e quartis de LEUC, NEU e LINF expressos em 10^9 /L.	47
Figura 31-Diagrama de extremos e quartis de MON, EOS e BAS expressos em 10^9 /L. ...	47
Figura 32-Diagrama de extremos e quartis de Bilirrubina total expressa em mg/dL, Albumina expressa em g/dL, Ureia expresso em mg/dL, PT expresso em g/dL e Creatinina expressa em mg/dL, da amostra PSL.....	48
Figura 33-Diagrama de extremos e quartis de AST expressa em UI/L, GGT expressa em UI/L e CK expresso em mg/dL da amostra PSL.	48
Figura 34-Trofozoítos de <i>B. caballi</i>	51

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1- Tabela resumo dos valores obtidos do hemograma	45
Tabela 2- Tabela resumo dos valores obtidos para as bioquímicas plasmáticas	48
Tabela 3- Resumo das médias dos parâmetros do hemograma para cada população de raça de equinos.	49
Tabela 4 Resultado da aplicação da estatística ‘t-student’ considerando um $p \leq 0,05$	50
Tabela 5- Resumo das médias dos parâmetros de bioquímicas plasmáticas obtidos na população de PSL estudada e descritos em cavalos PSI.	50
Tabela 6- Resultado da aplicação da estatística ‘t-student’ com nível de significância $p \leq 0,05$	51

I. Relatório de Estágio

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado em clínica ambulatória de equinos sob a coorientação da Dra. Cátia Mousinho, no período de estágio compreendido entre 1 de outubro de 2020 e 1 de Abril de 2021.

No estágio foram acompanhadas diferentes áreas da clínica de equinos, incluindo medicina interna, medicina reprodutiva, ortopedia, medicina desportiva e cirurgia.

No total foram observados 285 animais, dos quais foram selecionados alguns procedimentos realizados durante o estágio curricular, para incluir neste relatório de estágio.

Os procedimentos de profilaxia foram realizados com maior frequência (n=219). Destes procedimentos destacaram-se, a vacinação contra o tétano e influenza equina (n= 102) com a vacina ProteqFlu-Te® e desparasitação (n=109), realizada com a administração de produtos à base de Ivermectina e Praziquantel, e à base de moxidectina e praziquantel. Alguns animais também foram vacinados para o Herpes Vírus Equino (n=8) com a vacina Equivac® Innovator EHV-1/4, mas em menor proporção (Figura 1).

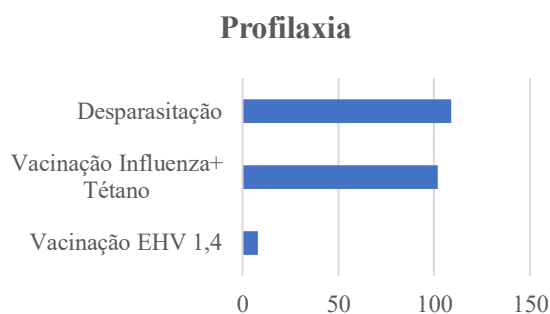


Figura 1- Procedimentos de profilaxia.

Adicionalmente também foram realizados procedimentos de profilaxia a canídeos, nomeadamente, primovacinação multivalente e reforço anual com a vacina Canigen DHPPi/L ® (Virbac). A administração da vacina da raiva, Nobivac® Rabies, foi acompanhada pela colocação do microchip, exigido por lei.

A medicina reprodutiva foi a segunda área de clínica de equinos mais reportada (n=74), o manejo reprodutivo contempla todo o acompanhamento da égua desde que inicia a época reprodutiva até ao diagnóstico de gestação, e inclui, diagnóstico ecográfico do ciclo reprodutivo e acompanhamento do mesmo, diagnóstico de patologias uterinas e vaginais e tratamento das mesmas, como por exemplo, lavagem uterina, tratamento com AB intrauterino e sistémico, injeções com prostaglandina e HCG e inseminações artificiais com sêmen fresco e congelado (Figura 2).

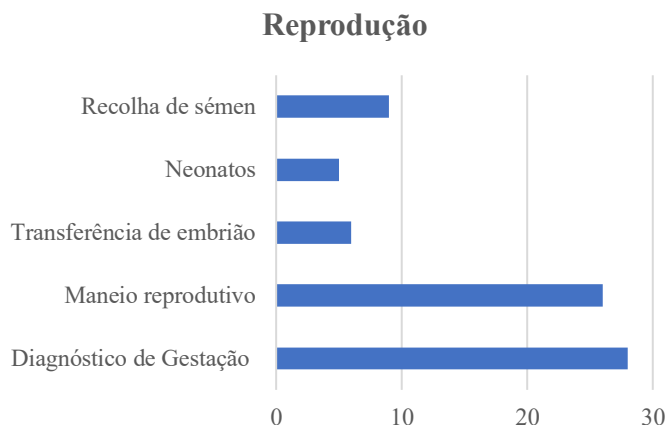


Figura 2- Procedimentos de Medicina Reprodutiva.

A identificação animal foi o terceiro procedimento mais acompanhado durante o estágio (n=45), que consistiu no preenchimento da folha do resenho que irá constar no livro verde ou azul do cavalo e na colocação do microchip, sempre acompanhado de anestesia local com lidocaína (Figura 3).

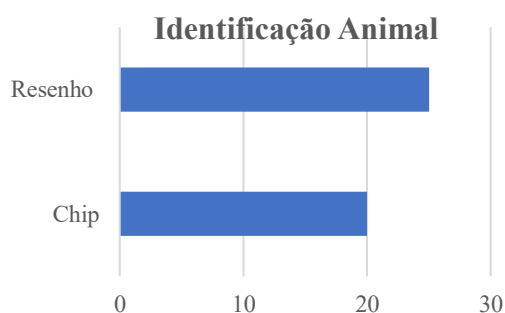


Figura 3- Procedimentos de Identificação Animal.

Das patologias observadas, as patologias oftalmológicas, nomeadamente, úlceras da córnea, lacerações de pálpebra e uveítes, 36%, e as patologias respiratórias, nomeadamente, pneumonia e síndrome de asma equina, 36 %, foram as mais reportadas (Figura 4). Na área da podologia, o procedimento mais reportado foi o exame radiológico (n=13) (Figura 5).

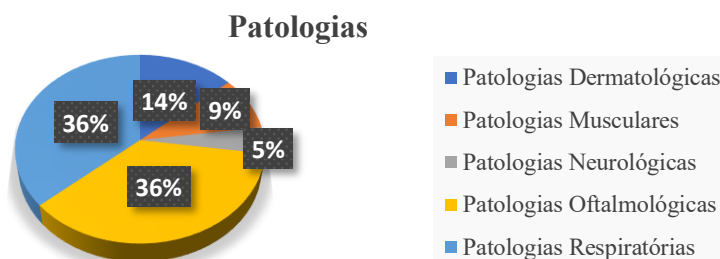


Figura 4- Patologias Observadas.

Na área das feridas e cirurgia, foram realizadas 19 castrações, seguido de 9 limpezas de feridas e pensos e 5 suturas (Figura 6). Por fim, os outros procedimentos incluem procedimentos realizados em menor frequência durante o estágio (Figura 7).

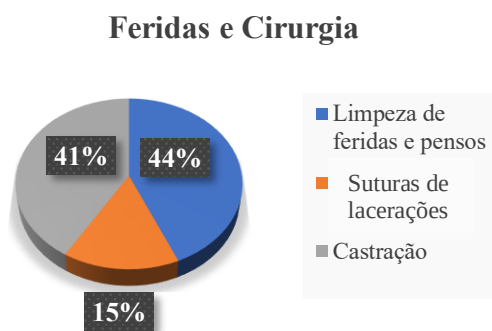


Figura 6- Procedimentos em Feridas e Cirurgia.

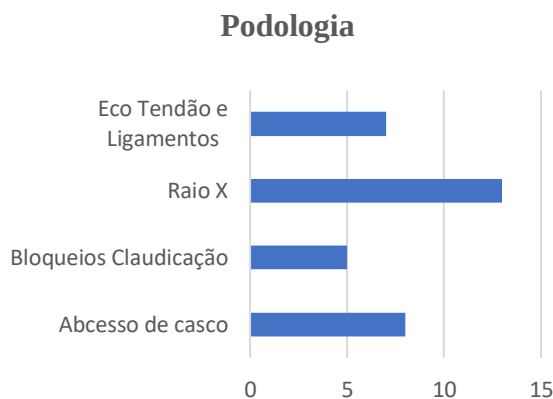


Figura 5- Procedimentos e patologias reportadas em Podologia.

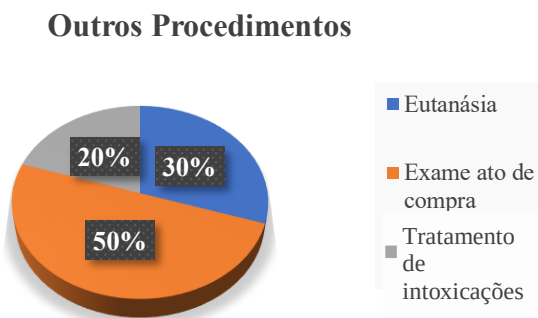


Figura 7- Outros procedimentos.

Em paralelo ao estágio curricular em clínica foi realizado um projeto de mestrado, onde foram processadas 52 amostras recolhidas no decorrer do mesmo. O trabalho de laboratório consistiu na realização de esfregaços sanguíneos com vista a observar em microscópio ótico e identificar morfologia celular, contagem celular e avaliar a presença de hemoparasitas, bem como o processamento das mesmas para obtenção do hemograma e bioquímicas plasmáticas.

II. Introdução

O hemograma e as bioquímicas plasmáticas são um método complementar de diagnóstico relativamente simples e económico, permitindo diagnosticar diversas doenças, as quais muitas vezes ainda se encontram numa fase bastante inicial. Neste sentido, a padronização de intervalos de referência para as várias raças de equinos, é importante para auxiliar o diagnóstico de doenças e alterações fisiológicas, visto que cada raça tem características morfológicas e fisiológicas distintas e também a influência da sua localização e clima. Também, há diferenças em relação ao local de criação, clima e manejo que necessitam de ser explicados. Apesar de os mesmos se encontrarem descritos em outras raças, ainda poucos estudos existem em cavalos Puro Sangue Lusitano (PSL), raça esta que tem ganho crescente popularidade no mercado estrangeiro. O cavalo PSL tem grande expressão no mercado internacional a nível de exportação, assim como o azeite, cortiça e vinho (Vicente, Carolino & Gama, 2011). Existem nascimentos de animais desta raça em 32 países, sendo 4 os principais o Brasil (42,7%), a França (26,6%), a Espanha (11,8%) e o México (9,7%) (Vicente, Carolino & Gama, 2011). Estes dados vêm a reforçar a importância da padronização de intervalos de referência para a raça PSL, que está em crescente expansão no mercado estrangeiro.

Os hemoparasitas equinos, tais como a babesia e a theileria, são uma preocupação para os proprietários e médicos veterinários, pois para além de provocarem doença clínica, incluindo febre e anemia hemolítica, afetam o comércio de animais infetados, assim como a sua participação em provas equestres internacionais (Lopes, 2020). Atualmente, para efetuar a exportação de equídeos para países indenes à piroplasmose, como a América do Norte, é necessário realizar um teste ELISA ou PCR, para detetar se o animal está infetado ou já foi infetado. A elevada prevalência de piroplasmose no território nacional poderá assim impossibilitar a comercialização de PSL para estes países (Lopes, 2020).

O hemograma é um exame complementar de diagnóstico muito praticado na clínica equina. Este método estuda os três constituintes celulares do sangue, nomeadamente, as plaquetas (PLQ), os eritrócitos (ERT) e os leucócitos (LEUC) (Kerr, 2002). O hemograma permite realizar a análise quantitativa e qualitativa dos constituintes do sangue (Cowel & Tyler, 2002).

A maioria dos testes de diagnóstico bioquímicos são baseados num painel de parâmetros, ao invés de um único (Lester, Mollat & Bryant, 2015). Esta abordagem fornece informação sobre vários sistemas, fornecendo pistas sobre a presença de doenças subjacentes. Os parâmetros bioquímicos que podem ser avaliados incluem aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamilttransferase (GGT), sorbitol desidrogenase (SDH), compostos azotados da ureia sérica

(BUN), creatinina, proteínas totais, albumina, bilirrubina, entre outros, tais como marcadores cardíacos específicos, como a troponina I cardíaca (Lester, Mollat & Bryant, 2015).

III. Revisão Bibliográfica

1. Colheita da amostra e acondicionamento

A colheita de sangue venoso em equídeos pode ser realizada em inúmeros locais, sendo a veia jugular externa a mais acessível, pois encontra-se no sulco jugular situado no aspeto ventral do pescoço. A veia pode ser acedida de forma segura na porção cranial do sulco jugular, pelo que caudalmente pode correr-se o risco de colher sangue arterial, porque a veia jugular externa e a artéria carótida comum não têm o músculo omohioideu a separá-las. Outro local opcional para a colheita de sangue venoso, é o seio venoso transversal, usado em adultos, podendo ser possível colher até 35 mL de sangue (Reed, Bayly & Sellon, 2018).

Após a colheita de sangue, a amostra é colocada em tubos de colheita de sangue que contêm anticoagulantes diferentes, sendo que, de forma padronizada, cada anticoagulante corresponde a uma determinada cor da tampa do tubo (Duncan & Prasse, 2011).

O tubo com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o qual atua por remoção do cálcio presente no sangue, possui tampa de cor violeta. O tubo de EDTA é indicado para realização de hemograma, pois não altera a morfologia celular mantendo-a até 24 horas, desde que devidamente acondicionado, sendo o tempo ideal de processamento até 2-3 horas para obter um esfregaço de melhor qualidade (Thrall, Baker, Campbell, et al., 2004).

O tubo com heparina lítio, o qual atua como inibidor da trombina e tromboplastina, que por sua vez promove a separação do plasma, possui tampa de cor verde. O tubo com heparina está indicado na realização de imunologia (mensuração de imunoglobulinas), bioquímicas plasmáticas e medição de chumbo (Thrall et al., 2004).

Existem outros tubos de colheita de sangue, como, tubo sem anticoagulante/seco, tubo de citrato de sódio com tampa azul, tubo com fluoreto de sódio com tampa cinzenta, mas usados com menor frequência do que os tubos de EDTA e heparina, dependendo dos parâmetros a analisar (Reed, Bayly & Sellon, 2018).

O ideal é processar as amostras logo após a sua colheita para preservar os constituintes celulares e enzimas plasmáticas, mas até serem processadas podem ser conservadas a temperaturas baixas, 4° C, à exceção do tubo seco que deve -se manter primeiro em temperatura ambiente para acelerar a formação de coágulo. Mesmo que estas se mantenham à temperatura ótima deterioram-se em 36 horas, pelo que após este período já não são aptas de utilização. Para

obter resultados fidedignos o processamento das amostras deve ser feito no mesmo dia da colheita de sangue (Kerr, 2002, Reed, Bayly & Sellon, 2018).

2. Esfregaço sanguíneo

A observação do esfregaço sanguíneo, assume uma importância relevante quando as amostras apresentam morfologias alteradas, auxiliando na detecção e monitorização de doenças que não são detetadas utilizando apenas a quantificação dos constituintes celulares. Existem alterações morfológicas que só podem ser avaliadas com precisão se for realizado e observado um esfregaço sanguíneo, como, por exemplo, anisocitose, hipocromasia, poiquilocitose, e aglutinação (Weiss & Wardrop, 2010).

A realização de esfregaços sanguíneos tem um tempo adequado de até 2 horas após a colheita, pois minimiza a agregação plaquetária e leucocitária (Harvey, 2001). Existem várias técnicas de realização de esfregaço sanguíneo, mas a técnica ‘wedge’ é a mais comum (Figura 8) (Weiss & Wardrop, 2010). Segundo a técnica ‘wedge’, a lâmina usada para espalhar é colocada a 45°, e movida ligeiramente até tocar na gota de sangue permitindo que esta se espalhe por todo o bordo da lâmina e em seguida movida para a frente com um movimento contínuo e uniforme (Latimer & Rakich, 2002; Willard & Tvedten, 2004).

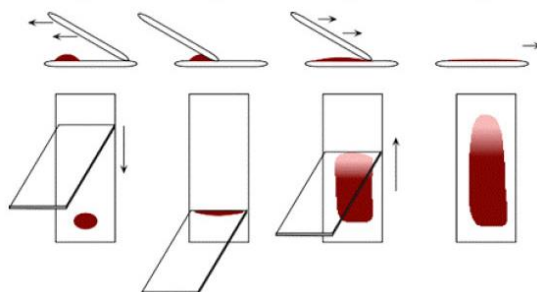


Figura 8- Esquema técnica esfregaço sanguíneo 'Wedge'

Adaptado de: <http://mt-lectures.blogspot.com/2017/08/lecture-13-morphological-examination-of.html>

Os esfregaços sanguíneos normalmente são corados para identificar estruturas e microorganismos, de modo a facilitar a sua identificação e visualização.

As colorações mais usadas na clínica veterinária para corar esfregaços sanguíneos são do tipo ‘Romanowsky’, nomeadamente ‘Wright-Giemsa’, ‘Leishman’ e ‘Diff-Quick’. As características destas colorações dependem do pH das células e da água de enxaguamento, bem como da natureza das células presentes. Assim, estes tipos de colorações são compostas por eosina, que cora as bases de vermelho e por azul metileno, que cora os ácidos de azul (Harvey,

2001). A coloração ‘Diff-quick’ apresenta a vantagem do seu tempo de realização ser de apenas 15 segundos (Cowel & Tyler, 2002).

3. Interpretação do hemograma

Na clínica equina, o exame complementar de diagnóstico mais realizado é o hemograma e este está generalizado em medicina veterinária devido à sua elevada fiabilidade, ao facto de ser económico, e à rapidez de execução e de obtenção de resultados.

A partir deste exame são obtidos parâmetros qualitativos e quantitativos, relativamente aos diferentes constituintes celulares. Deste modo, as informações obtidas através da observação de um esfregaço sanguíneo são fundamentalmente qualitativas, enquanto que as analisadoras automáticas dão informações quantitativas (Reed, Bayly & Sellon, 2018).

3.1. Eritrograma

É de referir que anteriormente à utilização das analisadoras automáticas modernas, o cálculo dos parâmetros do hemograma era realizado manualmente através de três parâmetros, HTC, Hg e PCM, a partir daí as fórmulas foram usadas nos cálculos de VCM, HCM e CHCM, com as analisadoras automáticas modernas o caminho é inverso.

As analisadoras automáticas modernas, usadas na medicina veterinária, realizam a contagem numérica dos ERT e a medição da concentração da hemoglobina (Hg), do valor do hematócrito (HTC), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e do volume corpuscular médio (VCM). No entanto, os analisadores apenas medem diretamente os ERT, a concentração de Hg e o VCM, e através destes parâmetros calculam os valores do HTC, do HCM e do CHCM (Kerr, 2002; Brooks, 2008; Lording, 2008; Reed et al., 2018).

O HTC é a percentagem de eritrócitos no sangue. Pode ser medido manualmente através do microhematócrito ou automaticamente através da equação abaixo (Thrall, Weiser, Allison et al., 2012; Reed, Bayly & Sellon, 2018).

$$HTC = \frac{VCM * [ERT]}{10}$$

A concentração de Hg (g/L) reflete os gramas de hemoglobina por 100 mL de sangue. É uma medida mais direta da capacidade de transporte do O₂ no sangue do que o hematócrito ou [ERT] e é calculada através da seguinte equação: (Thrall, et al., 2012).

$$HTC = 3 * [Hg]$$

A concentração de eritrócitos no sangue [ERT] ($\times 10^{12}/L$) representa o número de eritrócitos por unidade de volume de sangue (Thrall, et al., 2012).

O VCM (fL) indica o volume médio de eritrócitos numa amostra e permite classificar as anemias em normocíticas, macrocíticas e microcíticas (Weiss & Wardrop, 2010; Tagesu, 2018). O VCM é obtido através da seguinte da fórmula:

$$VCM = \frac{HTC}{[ERT]} * 10$$

A CHCM (g/L) é a concentração celular de Hg por eritrócito médio e este parâmetro classifica as anemias em normocrómicas e hipocrómicas (Weiss & Wardrop, 2010; Tagesu, 2018). A fórmula para calcular este parâmetro é a seguinte:

$$CHCM = \frac{HCM}{VCM}$$

O HCM (pg) representa a quantidade média de hemoglobina por eritrócito, este valor é pouco útil, pois não tem em conta o volume celular (Weiss & Wardrop, 2010; Tagesu, 2018). Este pode ser calculado através da equação:

$$HCM = \frac{Hg}{RBC} * 10$$

Os ERT são células com formato discoide bicôncavo, com uma zona central pálida, não têm núcleo nem organelos e nos equinos medem cerca de 5,7 μm de diâmetro (Reed et al., 2004; Lording, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Os eritrócitos equinos são muito propensos à formação de ‘rouleaux’, tendo tendência para se agregarem (Brockus & Andreasen, 2003; Lording, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Os corpos de ‘Howell-Jolly’ também podem ser observados em cavalos saudáveis.

Os reticulócitos, são detetados em pequeno número em circulação em cavalos saudáveis ($0,5-85 \times 10^3/\mu L$), valor muito baixo para ser utilizado com precisão (Balan, McCullough, O’Brien, 2019). Segundo Balan et al. (2019), os reticulócitos em cavalos anémicos encontravam-se aumentados em 36%.

As alterações da morfologia dos ERT podem ter como etiologia, intoxicações, parasitas, alterações vasculares, doenças sistémicas ou por erro no processamento da amostra (Reed et al., 2018). Na circulação periférica estão presentes cerca de 6,8 a 12,9 $\times 10^6$ ERT/ μL e a vida dos ERT nos cavalos varia entre os 140 e os 150 dias.

3.1.1. Alterações morfológicas

São várias as alterações morfológicas passíveis de serem observadas no esfregaço sanguíneo de um equino. De uma forma geral estas compreendem essencialmente alterações da cor, do tamanho e do formato dos eritrócitos ou a presença de inclusões intraeritrocitárias.

3.1.1.1. Alterações na cor

A hipocromasia é a diminuição de CHCM caracterizada por aumento da palidez central nos ERT. Esta alteração na cor está associada a deficiência em ferro, que resulta na diminuição da concentração de Hg nos mesmos. A hipocromasia está descrita em anemias por deficiência em ferro (Jain, 1993).

3.1.1.2. Alterações do tamanho

A anisocitose é um termo geral que descreve a variação de tamanho. Os cavalos têm um ligeiro grau de anisocitose, possivelmente devido ao facto de existirem poucos reticulócitos em circulação (Harry, 2001; Weiss & Wardrop, 2010).

3.1.1.3. Alterações do formato

A poiquilocitose descreve a presença de ERT com formato alterado (Weiss, 1984) e pode estar associada a fragmentação eritrocitária.

Os equinócitos são ERT espiculados, cujas espículas são uniformemente espaçadas e de tamanho similar (Weiss, Kristensen, Papenfuss et al., 1990), os mais velhos perdem a maioria das espículas e quase que se tornam em esferócitos (Weiss & Wardrop, 2010). Formam-se em situações de desidratação, aumento de pH, depleção da ATP eritrocitária (ex., hipofosfatémia) e aumento de cálcio intraeritrocitário (Harvey, 1997)

Os acantócitos são ERT com espículos de tamanho variado e espaçados de forma irregular, presentes em animais com doença hepática (Rebar et al., 1981; Christopher & Lee, 1994).

Define-se como queratócitos os ERT que contêm uma ou múltiplas vesículas intactas ou roturadas, estas quando roturadas formam uma ou duas projeções associadas a doenças, como, anemia devido a deficiência de ferro, doenças hepáticas e síndrome mielodisplásico (Weiss, Kristensen & Papenfuss, 1990; O'Keefe & Schaeffer, 1992; Weiss & Lulich, 1999; Harvey, 2001).

Os esferócitos são ERT esféricos que resultam de inchaço celular e/ou perda de membrana celular e morfologicamente, têm ausência de palidez central e diâmetro inferior aos eritrócitos normais (Rebar et al., 1981; Klag, Giger & Shoffer, 1993; Cowel & Tyler, 2002; Weiss & Wardrop, 2010; Reed et al., 2018).

Os leptócitos ou ‘wafer cell’s’ são células finas e achatadas com hemoglobina na periferia da célula. A sua formação, nos equinos, está associada a doenças hepáticas ou outros distúrbios metabólicos e deficiência em ferro tipicamente devido a perda de sangue crónica. Os codócitos ou ‘target cell’s’ são ERT que têm um “alto” de citoplasma hemoglobinizado formando uma zona central densa e uma área ao redor pálida, que dá à célula um aspeto de alvo. A capacidade de assumirem este formato deve-se a um aumento do rácio superfície/volume. OS codócitos foram reportados em anemia hipocrómica e doença hepática (Harvey, 2001; Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2018).

Os exentrócitos são ERT caracterizados pela existência de uma zona da célula que tem mais concentração de hemoglobina, que deixa uma parte pálida ou clara do outro lado (Jain, 1993), foram reportados em cavalos acidentalmente ingeriram folhas de bordo vermelho, *Acer rubrum* (Reagen, Carter & Turek, 1994), num cavalo com deficiência em glucose-6- fosfato desidrogenase (Stockham, Harvey & Kinden, 1994) e noutro com deficiência de glutathione-redutase (Harvey, Stockam, Scott, et al., 2003).

3.1.1.4. Inclusões nos eritrócitos

Os corpos de ‘Howell-Jolly’ são pequenas remanescentes nucleares basofílicos no citoplasma dos ERT, que se formam na medula óssea e são removidos no baço. Manifestam-se em anemias regenerativas ou após esplenectomia e também podem estar aumentados em animais em terapia com glucocorticoides. Apenas 10 em 10000 ERT contêm corpos de ‘Howell-Jolly’, ou seja, só 0,1% é observado nos esfregaços sanguíneos de cavalos saudáveis (Jain, 1993).

Os corpos de ‘Heinz’ são grandes agregados de hemoglobina precipitada e oxidada, que estão aderentes às membranas internas dos eritrócitos e coram de azul escuro (Jain, 1993). Estas alterações foram reportadas em cavalos que consumiram folhas *Acer rubrum* e num cavalo com anemia hemolítica associada à administração de fenotiazinas (Harvey, 1995; Harvey, 1997; Harvey, 2001; Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2018).

3.1.1.5. Hemoparasitas

Através do esfregaço sanguíneo é possível identificar a ausência ou presença de hemoprotozoários intra-eritrocitários, como a *Babesia caballi* e a *Theileria equi*. A *Theileria equi* tem a representação típica de “cruz de malta” e a *Babesia caballi* tem uma forma piriforme de grandes dimensões e geralmente encontram-se aos pares (Laha, Das & Sem, 2015).

O *Anaplasma phagocytophilum* é um hemoparasita presente no citoplasma dos neutrófilos, com a aparência de uma mórula, responsável pela transmissão da anemia infecciosa equina (Rikihisa, 1991; Bjöersdorff et al., 2002). A anemia infecciosa equina é uma doença infecciosa, causada por um RNA vírus do género Lentivirus, da família Retrovírus, transmitida por mosquitos hematófagos. Esta doença é uma doença de declaração obrigatória, e o seu diagnóstico é efetuado através do teste de ‘Coggins’. Os animais com anemia infecciosa equina são portadores para a vida, sendo que o destino destes animais é o isolamento ou a eutanásia (OIE, 2018).

3.1.1.6. ‘Rouleaux’

Os ERT dos cavalos têm uma forte tendência para formar ‘rouleaux’, provavelmente devido à composição característica da glicoproteína do glicocálice nos equinos (Baumler, Neu, Mitlohner et al., 2001). Esta alteração deve ser distinguida de aglutinação, que também ocorre em cavalos e tem sido associado a anemia hemolítica imunomediada, terapia em heparina não fracionada e intoxicação por *Acer rubrum* (Moore, Mahaffrey & Zboran, 1987; Jain, 1993; Rebar, 1998; Harvey, 1997).

3.1.1.7. Aglutinação

A aglutinação resulta da ligação de anticorpos ou moléculas do complemento, C3, à membrana celular dos ERT, promovendo a aderência entre os mesmos (Meyer & Harvey, 1998; Cowell, 2004). Na observação ao microscópio ótico têm a aparência de um cacho de uva ou, tendo como possível causa anemia hemolítica imunomediada ou resultado de terapia intravenosa com heparina não fracionada (Monreal, Villatoro, Monreal et al., 1995). A aglutinação deve ser diferenciada do fenómeno de ‘rouleaux’, através do teste de ‘Coomb’s’, o qual é considerado o teste de diagnóstico ‘gold-standart’ para este problema (Willard & Tvedten, 2004; Weiss & Wardrop, 2010).

3.1.1.8. Anemia

A anemia é uma diminuição da massa de RBC que resulta numa diminuição da oxigenação dos tecidos (Harvey, 2001). Para o médico veterinário poder realizar um diagnóstico correto e completo da anemia, primeiramente necessita de obter a história clínica, realizar de um exame clínico e interpretar os achados laboratoriais que surgirem. (Carrick & Begg, 2008).

Para classificar uma anemia nesta espécie de forma correta, é necessário avaliar a resposta da medula óssea, por observação de um esfregaço da mesma (Carrick & Begg, 2008).

A anemia pode ser classificada com base na força da eritropoiese, podendo ser anemia regenerativa ou anemia não regenerativa, com base no volume de eritrócitos e com base na concentração de hemoglobina (Tvedten, 2010).

Outra forma de classificar a anemia tem por base a morfologia celular observada no esfregaço sanguíneo. Este procedimento é essencial na classificação de anemias, especialmente nas anemias hemolíticas e alguns exemplos incluem identificação de parasitas sanguíneos, esferócitos, auto-aglutinação, corpos de 'Heinz', hipocromasia, ecentrócitos, pinócitos, fragmentação eritrocitária, cor castanha da hemoglobina e agregados de plaquetas ou leucócitos (Tvedten, 2010).

3.1.1.9. Policitemia

A policitemia ou eritrocitose é um aumento relativo ou absoluto dos valores de RBC no sangue periférico (Lording, 2008; Carrick & Begg, 2008). A policitemia relativa não existe um aumento real dos ERT, é causado por desidratação ou contração esplénica. A policitemia absoluta subdivide-se ainda em primária 'policitemia vera' ou secundária (McFarlane, Sellon & Gibbs, 1998; Lording, 2008; Tvedten, 2010). A policitemia primária divide-se em apropriada e inapropriada, segundo a existência ou não de hipóxia tecidual (Roby, Beech, Bloom et al., 1990, citado por, Beeler- Marfisi, Arroyo, Caswell, et al., 2010; Lennox, Wilson, Hayden et al., 2000; Carrick & Begg, 2008; Lording, 2008; Reed et al., 2018).

3.2 Leucograma

Quando se procede ao estudo do leucograma, o hemograma fornece a contagem total dos leucócitos, neutrófilos totais, neutrófilos segmentados, neutrófilos em banda, contagem de monócitos, eosinófilos, basófilos e a de linfócitos, bem como a observação do esfregaço sanguíneo ao microscópio para avaliar morfologia. Muitas analisadoras automáticas não fazem a distinção dos neutrófilos segmentados dos não segmentados, pelo que a observação do esfregaço

sanguíneo é muito importante para averiguar existência dos neutrófilos banda (Weiss & Wardrop, 2010).

Embora os elementos celulares observáveis neste tipo de exame laboratorial sejam originados na medula óssea, estes apresentam morfologia e funções distintas, uma vez, que são gerados por estruturas celulares diferentes e após a sua libertação percorrem trajetos diferentes. Algumas destas células que são libertadas para a corrente sanguínea periférica podem ser consideradas como proliferativas, e têm como função e características dar origem a outras células. As células que formam o grupo dos LEUC são os neutrófilos, os monócitos, os eosinófilos, os basófilos e os linfócitos. Os LEUC desempenham um papel importante na defesa imunitária do organismo e muitos destes constituintes celulares possuem funções paralelas (Carrick & Begg, 2008; Tizard, 2016).

Os LEUC são uma parte integrante da imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata (não específica) é constituída pelo complemento e células fagocitárias maiores, neutrófilos, monócitos e macrófagos. O sistema imune adaptativo é orquestrado primariamente através da resposta específica dos linfócitos a antígenos individuais. Os monócitos e macrófagos têm o papel importante de ligar a imunidade inata à adaptativa enquanto células apresentadoras de antígeno (Carrick & Begg, 2008, Tizard, 2016).

3.2.1 Neutrófilos

Os NEU são as células mais abundantes no sangue periférico dos equinos saudáveis, compreendem 50% a 70 % da contagem total de leucócitos (Stockham & Scott, 2002; Latimer & Prasse, 2003; Carrick & Begg, 2008; Tizard, 2016). Os NEU são a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, trauma tecidual ou qualquer sinal inflamatório (Appelberg, 2006).

Os NEU podem adquirir duas morfologias diferentes, segmentados ou em banda, dependendo do seu estado de maturação. Normalmente, os NEU banda estão em quantidades reduzidas no sangue periférico, 0 a 1000/ μ L ou 0 a 8% dos LEUC totais, e antecedem os NEU segmentados (Cowel & Tyler, 2002; Carrick & Begg, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

Os NEU maduros segmentados têm aproximadamente 10 – 12 μ m em diâmetro (Bochsler & Slauson, 2002), núcleo com 3 a 5 lóbulos composto maioritariamente por heterocromatina com um pequeno filamento de eucromatina no centro, citoplasma de cor rosa pálida e com leves granulações (Figura 9) (Stockham & Scott, 2002; Carrick & Begg, 2008). Podem existir alterações tóxicas e são identificadas pelo aumento da basofilia citoplasmática, aparência

espumosa do citoplasma, corpos de 'Dohle' e raramente, granulação tóxica e aumento do tamanho celular (Figura 10) (Carrick & Begg, 2008; Overmann, 2018).

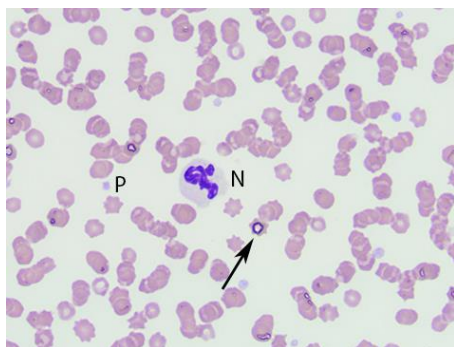


Figura 10- Neutrófilo (N), Eritrócitos, Plaquetas (P) e artefacto (Seta). Adaptado de: <https://eclinpath.com/atlas/hematology/equine-blood/nggallery/page/1>

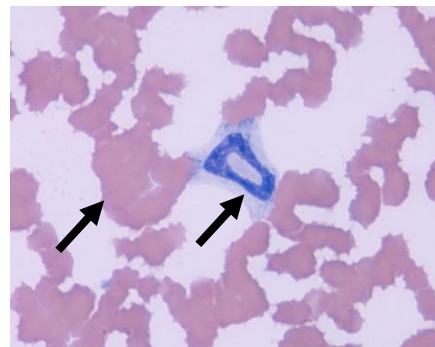


Figura 9- Alterações tóxicas do neutrófilo, basofilia citoplasmática e corpos de 'Dohle' (seta). Formação de 'rouleaux' (seta). Adaptado de: <https://eclinpath.com/atlas/hematology/equine-blood/nggallery/page/1>

Os valores normais de NEU segmentados em circulação são, 2260 a 8580 μL , constituindo 22 a 72% dos LEUC totais (Weiss & Wardrop, 2010).

Os NEU maduros encontram-se na medula óssea e quando libertados para a corrente sanguínea, a sua semi-vida é de aproximadamente seis a dez horas (Carakostas, 1981, citado por, Satué, Hernandez & Muñoz, 2012; Brown, Brain, Pearson et al., 2006; Christopher & Link, 2007; Serhan & Savill, 2007).

A neutropenia é caracterizada por uma diminuição do número absoluto de NEU em circulação no sangue periférico. Pode ser uma situação aguda (manifestando-se em 24-48h) ou crónica (durando dias a meses). A neutrófila corresponde a um aumento do número de neutrófilos no sangue. Esta condição pode ser um indicador de doença inflamatória ou apenas uma resposta fisiológica relacionada com o exercício físico ou stress, como o aumento de glucocorticoides, epinefrina, excitação, exercício ou stress, inflamatórias, infecciosas ou neoplásicas (Cowel & Tyler, 2002; Kerr, 2002; Reed et al., 2018).

3.2.2 Linfócitos

As células linfóides são componentes chave do sistema imunitário. Embora algumas participem na resposta imune inata, como as células NK (natural killer) e Células T expressando o $\gamma\delta$ T e o recetor celular TCR, a maioria é responsável por mediar a imunidade adaptativa. Posteriormente estas células regulam a produção de anticorpos (imunidade humoral) ou são responsáveis por efeitos imunes mediados por células, como a citotoxicidade ou

hipersensibilidade do tipo tardia (Shin, Perryman & Meek, 1997; Suter, Gouthro, O'Malley et al., 2007).

OS LINF são os segundos LEUC mais numerosos, a seguir aos NEU, tendo uma média de cerca de 1500 a 7700 LINF/ μ L, representando 17 a 68% dos leucócitos totais (Weiss & Wardrop, 2010).

Dependendo das espécie e variabilidade individual, 50% a 75% dos linfócitos sanguíneos são linfócitos T e cerca de 20-30% são linfócitos B (Satué, Hernandez, Lorente et al., 2009), sendo que os linfócitos B e T não podem ser diferenciados com base na morfologia observada no esfregaço sanguíneo (Harvey, 2001). As células NK constituem cerca de 5 % dos linfócitos (Satué, Hernandez, Lorente et al., 2009).

Os LINF maduros têm 7 a 9 μ m de diâmetro e são morfologicamente caracterizados por terem um rácio núcleo:cromatina elevado (Harvey, 2001; Carrick & Begg, 2008). Os linfócitos não reativos possuem núcleo redondo, oval e ligeiramente segmentado, citoplasma azul pálido, e cromatina condensada (Figura 11) (Harvey, 2001; Walton, 2014; Overman, 2018; Reagan, Rovira & DeNicola, 2019). Os linfócitos grandes, 12 a 14 μ m de diâmetro, têm finos grânulos de cor magenta com cromatina granular menos condensada, a presença destes é anormal e sugere um processo linfoproliferativo (Figura 13).

Os linfócitos reativos são caracterizados pelo aumento da quantidade de citoplasma, aumento de basofilia citoplasmática, zonas mais claras junto ao núcleo e forma nuclear irregular. A presença destes linfócitos sugere estimulação antigénica (Figura 12) (Walton, 2014; Overman, 2018).

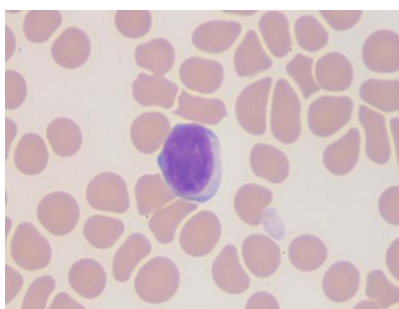


Figura 12- Linfócito maduro.

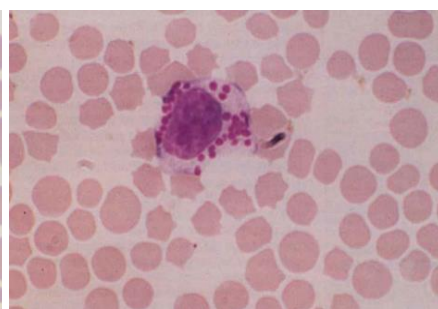


Figura 11- Linfócito grande granular, com inúmeros grânulos magenta corado com 'Giemsa' de um cavalo com linfoma grande granular. Adaptado de: Kramer, Torquist, Erfle & Sloejan, 1993.

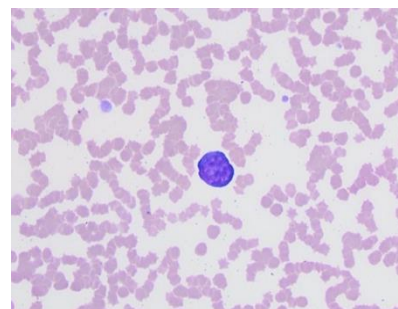


Figura 13- Linfócito reativo.

A linfocitose representa um aumento no valor absoluto de linfócitos e esta pode ser devido ao exercício físico extenuante, a uma resposta ao aumento de catecolaminas, fisiológica em poldros e ganhanhos ou presença de agentes infecciosos (Rose, Allen, Hodgeson et al., 1993;

Cowell & Tyler, 2002; Batlivala, Bacon, Avery et al., 2010; Weiss & Wardrop, 2010; Walton, 2013; Burton, Borjesson & Vernau, 2014; Rodrigues, Figuera, Souza et al., 2015; Tang, Hosgood, Labruyère et al., 2015; Wikander, Knights, Coffee et al., 2020). A linfopénia é a diminuição do número de linfócitos circulantes, está descrita em situações de reposta a um aumento de glucocorticóides endógenos e exógenos, endotoxémia, infecções virais e na imunodeficiência combinada dos poldros árabes (Kerr, 2002; Carrick & Begg, 2008; Crisman & Scarratt, 2008; Flaminio, Tallmadge, Salles-Gomes et al., 2009; Walton, 2013; Reed et al., 2018). Ainda, é de notar que com o avanço da idade, pode ocorrer imunossenescência (McFarlene et al., 1998; McFarlene, Sellon & Gibbs, 2001).

3.2.3 Monócitos

Os MON são um grupo de células do sistema imunológico que tem a função de defender o organismo de vírus e bactérias, representam menos de 10% dos LEUC circulantes no sangue periférico, com valores de cerca de 0 a 1000/ μ L. O tempo de produção dos MON é de 24-36 horas, sendo depois libertados na corrente sanguínea e posteriormente irão migrar para os tecidos, onde maturam e se transformam em macrófagos (Stockham & Scott, 2002; Carrick & Begg, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

Os MON são as células mais confundidas quando observadas ao microscópio em esfregaços sanguíneos e são, também, os leucócitos de maiores dimensões com cerca de 15 a 20 μ m. O núcleo dos MON tem a cromatina dispersa e algumas áreas de condensação, podendo apresentar vários formatos, desde bi-lobado, tri-lobado, oval, forma de ferradura ou irregular. O citoplasma é abundante, de cor azul-acinzentado e contém pequenos grânulos azurofílicos e poucos vacúolos (Overman, 2018). De forma ocasional, podem ser observado pseudopodia, que são pequenas projeções citoplasmáticas (Figura 14) (Cowel & Tyler, 2002; Carrick & Begg, 2008).

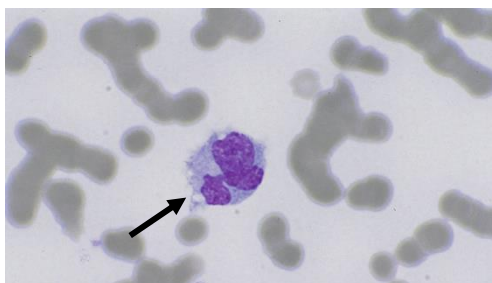


Figura 14- Monócito com núcleo lobulado, vacúolos citoplasmáticos e pseudopodia (seta). Adaptado de: <https://eclinpath.com/atlas/hematology/equine-blood/nggallery/page/1>.

A monocitopenia tem pouca relevância em equinos, pois estes têm números relativamente baixos de monócitos, menos de 1000/ μ L (Weiss & Wardrop, 2010).

Por outro lado, a monocitose, o aumento do número de MON em circulação (Carrick & Begg, 2008), é o resultado da estimulação de citocinas e normalmente coexiste com a neutrofilia (Walton, 2013). As causas de monocitose incluem, processos crónicos supurativos, hemólise, administração de corticoesteroides, inflamação piogranulomatosa, neoplasia não-hematopoiética, fases de recuperação após infeções virais e raramente leucemia monocítica/mielomonocítica (Cowel & Tyler, 2002; Barralet & Ricketts, 2002; Carrick & Begg, 2008).

3.2.4 Eosinófilos

Os EOS são um tipo de LEU que circula em menor quantidade no sangue periférico, representando entre 0% a 3% da contagem total de LEUC e cerca de 0 a 1000 EOS/ μ L num cavalo saudável (Stockham & Scott, 2002; Weiss & Wardrop, 2010).

Os EOS dos cavalos têm uma aparência característica com grandes grânulos citoplasmáticos vermelho-alaranjados, que podem distorcer as fronteiras celulares e de certa forma esconder o núcleo lobulado (Figura 15) (Overman, 2018).

A produção destas células na medula óssea tem a duração de 2 a 6 dias. A semi-vida dos EOS em circulação é de dias e depois migram para a pele, trato gastrointestinal e pulmões (Wilkie, Yager, Nation et al., 1985; Walton, 2014).

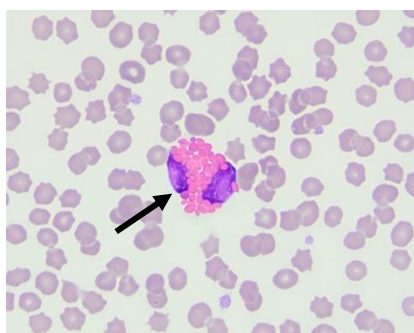


Figura 15-Eosinófilo de cavalo (seta).
Adaptado de:
<https://eclinpath.com/atlas/hematology/equine-blood/nggallery/page/2>.

A eosinofilia em cavalos não é comum e quando presente tende a ser relativamente ligeira (Weiss & Wardrop, 2010). A eosinofilia periférica é induzida por parasitas, nomeadamente durante a migração larvar tecidual (*larva migrans*), por reações de hipersensibilidade e devido a causas idiopáticas (Schumacher, Edwards & Cohen, 2000; Bell, Drew, Wilson et al, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

A eosinopenia é uma diminuição do número de eosinófilos e pode ter como causas infecções agudas (qualquer origem), podendo também estar associada a concentrações sistémicas elevadas de glucocorticoides sintéticos e endógenos (Cowell & Tyler, 2002). Contudo, esta alteração é difícil de identificar em cavalos, já que a concentração de EOS em animais saudáveis é baixa (Overman, 2018).

3.2.5 **Basófilos**

Estas células são os granulócitos presentes em menor quantidade no sangue dos mamíferos domésticos e constituem cerca de 0,5 % dos LEU sanguíneos. No sangue periférico têm uma semi-vida breve de aproximadamente 6 horas, mas podem viver até 2 semanas nos tecidos (Hirai, Miyamasu, Takaishi et al., 1997).

Os BAS têm um núcleo lobulado e um citoplasma transparente a azul claro que contém vários grânulos roxos. Os núcleos são de certa forma hiposegmentados, quando comparados com os dos neutrófilos (Figura 16) (Overman, 2018).

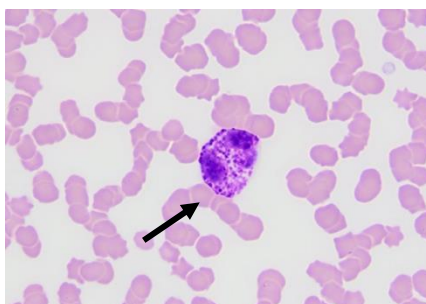


Figura 16- Basófilo de cavalo (seta).
Adaptado de:
<https://eclinpath.com/atlas/hematology/equine-blood/nggallery/page/3>

A basofilia é rara em cavalos e quando presente está, por exemplo, associada a reações de hipersensibilidade não específica (Overman, 2018), tais como a resposta a fármacos, alérgenos alimentares ou aerógenos, assim como à picada ou mordida de parasitas (Cross, Klesius, Hanvahan et al., 1987). A basopénia é considerada clinicamente irrelevante e é difícil de identificar em animais saudáveis, pois estes têm poucos basófilos em circulação (Stockham & Scott, 2002; Overman, 2018).

4. Trombograma

A avaliação inicial de plaquetas geralmente começa com a contagem plaquetária, que efetivamente é uma concentração de plaquetas e representa o número de plaquetas por unidade de volume de sangue. Este valor é normalmente determinado por um analisador automático de hematologia como parte de um hemograma completo, mas podem ser usados métodos manuais. A contagem plaquetária, especialmente caso as plaquetas se encontrem diminuídas, deve ser sempre confirmada através da avaliação do esfregaço de sangue periférico (Stockham & Scott, 2002; Overmann, 2018).

É importante ter em conta que se existir um aglomerado de plaquetas, o analisador poderá não ser preciso na contagem e a interpretação da amostra. Ainda, o atraso no processamento da amostra sanguínea poderá resultar na presença de artefactos, tal como o aumento do volume plaquetário (Stockham & Scott, 2002; Overmann, 2018).

As PLQ ou trombócitos são as células segundas células mais numerosas no que diz respeito à sua quantidade na circulação periférica, mas nos equinos estas células existem em menor quantidade quando comparando com os restantes mamíferos (Bordreaux & Ebbe, 1998). A contagem média de PLQ em cavalos saudáveis é de 100 a 350,000 PLQ/ μ L (Boudreaux & Ebbe, 1998; Brooks, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

As PLQ dos cavalos são células de pequenas dimensões comparativamente a outras espécies, medem apenas 2,5 a 3,5 μ m de diâmetro, morfologicamente possuem forma discoide quando circulam no sangue, forma esférica quando realizam a sua função, e não possuem núcleo tendo o citoplasma de cor azul claro e múltiplos grânulos azurofílicos no citoplasma (Figura 17) (McLellan, 2011; Satué, Gardón & Muñoz, 2017; Overman, 2018). O tempo normal de sobrevivência das PLQ dos cavalos é de 5 a 9 dias, após os quais serão removidas pelos macrófagos no baço e fígado (McLellan, 2011; Overman, 2018).

As PLQ dos cavalos coram muito claro com os corantes usados de rotineiramente ‘Wright-Giemsa’ e torna-se difícil de observar em ampliações inferiores, no entanto coram muito bem com ‘Diff-quick’ (Bajpai, Rajak & Poonia, 2015; Overman, 2018). Por vezes é possível observarem-se projeções citoplasmáticas, denominadas de pseudopodia, em plaquetas ativadas (Grondin & Dewitt, 2010; Overman, 2018).

Os agregados plaquetários são observados regularmente em esfregaços sanguíneos e ocorrem devido a problemas na coagulação ou na colheita e processamento da amostra, resultando em pseudotrombocitopenia. Outra hipótese descrita por outros autores é a ativação plaquetária por reação ao EDTA (Hinchcliff, Kociba & Mitten, 1993).

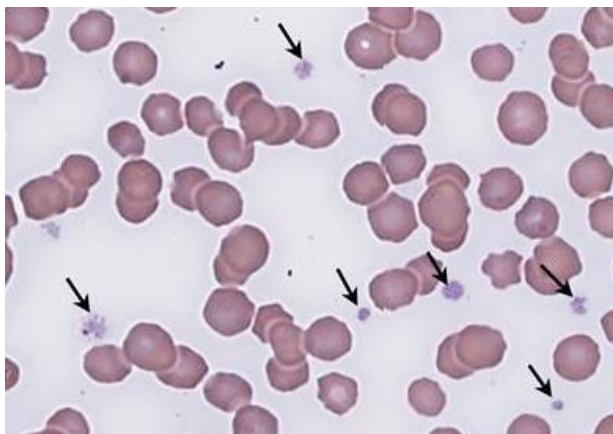


Figura 17- Plaquetas (Setas). Adaptado de: https://undergraduate.vetmed.wsu.edu/courses/vph-308/histology/lab-2-histology-epithelia-connective-tissue/equine-blood-slide-wsu_1_007/equine-blood-platelets

Quando se verifica uma redução do número de PLQ na circulação sanguínea periférica denomina-se de trombocitopenia, que só tem expressão se a contagem das mesmas for inferior a $10^3/\mu\text{L}$ (Satué, Gardón & Muñoz, 2017; Reed et al., 2018). Como a agregação de PLQ é comum em cavalos, o esfregaço sanguíneo deve ser sempre avaliado para confirmar a diminuição da contagem de PLQ, permitindo assim o diagnóstico de uma pseudotrombocitopenia. Também pode optar-se por colocar a amostra em tudo de citrato sódico (Sellon & Grindem, 1994). A trombocitopenia pode ocorrer por redução da trombopoiese, aumento da destruição periférica de plaquetas, por sequestro no baço e aumento do consumo ou perda de plaquetas (Brooks, 2008; Satué, Gardón & Muñoz, 2017; Reed et al., 2018). Por outro lado, a trombocitose é o aumento do número de PLQ circulantes e pode ocorrer devido a situações patológicas ou fisiológicas. (Morris, 1998 ; Divers, 2003; Sellon & Wise, 2009; Epstein, Brainard, Gomez-Ibanez et al. 2011). A trombocitose também pode ocorrer associada a infeções por *Rhodococcus equi* or herpesvirus tipo 1 em resposta a hemorragias agudas (Sellon & Wise, 2009; Stokol, Yeo, Burnett et al., 2015).

5. Interpretação das bioquímicas plasmáticas

As bioquímicas plasmáticas são um grupo de ensaios químicos que utilizados para analisar os constituintes bioquímicos do plasma. A interpretação dos resultados requer conhecimento acerca do parâmetro medido, assim como de fisiologia e de patologia médica equina. Alguns dos parâmetros que podem ser inseridos nestes constituintes incluem as proteínas totais, a albumina, a bilirrubina total, a aspartato aminotransferase, a gamma-glutamilttransferase, a creatinina, os compostos azotados de ureia sérica (BUN), a creatinina quinase, entre outros (Stockham, 1995).

5.1 Proteínas totais

As proteínas do soro e do plasma, consistem na albumina e nas globulinas, e a sua concentração é expressa em g/dL. A albumina e a maioria das globulinas são produzidas nos hepatócitos, com a grande exceção das imunoglobulinas produzidas pelas células B e células do plasma presentes em órgãos e tecidos linfóides. O plasma difere do soro, pois este contém fibrinogénio e fatores de coagulação (Weiss & Wardrop, 2010). As proteínas plasmáticas são clinicamente úteis para averiguar o estado geral de saúde do animal e fornecem ainda informação sobre a resposta inflamatória associada, por exemplo, a infeções (Barralet, 2002). Estas podem encontrar-se aumentadas, em casos de desidratação, inflamação e em neoplasias B-linfocitárias, situação denominada por hiperproteinémia. A diminuição das proteínas denomina-se de hipoproteinémia, e tem origem em doenças que causem a perda de proteínas ou que causem a diminuição da síntese proteica (Stockham, 1995).

5.2 Albumina

A albumina é sintetizada exclusivamente no fígado, e é a proteína plasmática mais abundante (Kaneko, Harvey & Bruss, 2008), sendo a sua concentração medida em d/dL. Ela é fundamental para a manutenção da pressão oncótica e para o transporte de compostos lipofílicos (Weiss & Wardrop, 2010), tal como o transporte de ácidos gordos livres, de ácidos biliares, de bilirrubina, do cálcio, de hormonas e de alguns fármacos (Rothschild, Oratz & Schereiber, 1988). A degradação da albumina ocorre no fígado, e noutros tecidos incluindo, o músculo, o rim e a pele (Kaneko, Harvey & Bruss, 2008). A hipoalbuminemia pode ter origem num defeito na síntese da albumina, associada a doença hepatocelular grave, ou devido a perda de albumina por doenças renais, pleuropneumonia e doenças gastrointestinais, como, colite, doença inflamatória intestinal e enterite proliferativa devido a *Lawsonia intracellularis* (Stockham, 1995; Kaneko, Harvey & Bruss, 2008; Reed, Bayly & Sellon, 2018).

A semi-vida da albumina em circulação varia entre espécies, e nos equinos é de aproximadamente 20 dias (Maheemus, Kaneko, Loy, et al, 1966, citado por, Smith, Van Metre & Pusterla, 2020).

5.3 Bilirrubina total

A bilirrubina é primariamente formada a partir da degradação da hemoglobina e mioglobina pelos macrófagos, com uma pequena contribuição de outras moléculas não-heme, como, citocromos, peroxidase e catalase (Reed, Bayly & Sellon, 2018). Os macrófagos no baço, medula óssea, e fígado (células de Kupffer), fagocitam os pigmentos, transformam-nos em biliverdina e depois convertem-nos em bilirrubina, a qual é libertada na forma de bilirrubina insolúvel livre (bilirrubina não conjugada). A bilirrubina não conjugada liga-se à albumina presente no plasma para diminuir a sua hidrofobicidade e é transportada para o fígado. Na superfície dos hepatócitos, a bilirrubina é transferida da albumina para a ligandina, uma proteína intrahepática de armazenamento e transporte (Engelking, 1989, citado por Barton & LeRoy, 2007; Reed, Bayly & Sellon, 2018). Uma vez dentro do hepatócito a bilirrubina é conjugada com glucuronido, formando-se então a bilirrubina conjugada, a qual é solúvel em água, sendo então excretada pelos canais biliares. A bilirrubina total é a junção da bilirrubina conjugada com a bilirrubina não conjugada (Reed, Bayly & Sellon, 2018), e a sua concentração é expressa em mg/dL. No cavalo saudável a bilirrubina total sérica é muito superior às outras espécies domésticas, e valores como 4,0 mg/dL foram observados em animais saudáveis (Gronwall & Mia, 1972, citado por, Engelking, 1993).

A hiperbilirrubinémia em cavalos, como em todos os mamíferos, manifesta-se em estados patológicos, onde a taxa de formação de bilirrubina excede a sua excreção. Adicionalmente, nos equinos, a anorexia resulta também em hiperbilirrubinémia. Outras causas de hiperbilirrubinémia incluem, hemólise, necrose hepática e colestase (Stockham, 1995).

5.4 Aspartato aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AST), anteriormente denominada por GOT, é uma enzima citosólica e mitocondrial, que catalisa a reação responsável pela biossíntese do aspartato a partir dos carboidratos (Duncan & Prasse, 2011). Esta enzima encontra-se presente em todas as células, mas em maiores concentrações nos hepatócitos, e células musculares cardíacas e esqueléticas. A AST também pode estar presente em menores concentrações no rim, eritrócitos e células intestinais (Duncan & Prasse, 2011).

O aumento desta enzima ocorre por lesão dos hepatócitos ou das fibras musculares, e pode ter como causas, hipoxia, cirrose, neoplasia, lipidose, infeções, intoxicação por ferro, intoxicação por tetracloreto de carbono, intoxicação por *Senecio*, trauma e rabdomiólise induzida por esforço (Thomson, Wilson, Hall et al., 1977; Murray, 1985; Lessard, Wilson, Olander et al.,

1986; Bernard & Divers, 1989; West, 1989; Valberg, Jonsson, Lindholm et al., 1993).

A semi-vida da AST é longa, cerca de duas semanas, sendo o seu valor expresso em UI/L. Contudo, o valor de AST analisado por si só não é muito útil, pelo que esta enzima é sempre analisada em conjunto com outras enzimas específicas hepáticas ou musculares (Maheemus, Kaneko, Loy, et al, 1966, citado por, Smith, Van Metre & Pusterla, 2020).

5.5 Gamma- Glutamyltransferase

A Gamma-Glutamyltransferase (GGT) está envolvida no metabolismo da glutatona e transferência de grupos glutamyl (Duncan & Prasse, 2011), estando primariamente associada às membranas microssomais do epitélio biliar (Meyer & Walton, 2013). Contudo, esta enzima existe também em elevadas concentrações no rim, fígado e pâncreas (Lavóie, 2020). A GGT é o marcador primário para doenças do sistema hepatobiliar, estando principalmente associada a colestase, embora também possa estar aumentada em casos de necrose dos hepatócitos, cirrose, hemocromatose, amiloidose e colelitíase (Stockham, 1995; Walton, 2013).

A semi-vida da GGT é de 3 dias (Coles, 1988; Hoffman & Solter, 2008), sendo o seu valor expresso em UI/L.

5.6 Creatinina

A creatinina é produzida através de uma reação não enzimática – a ciclização irreversível e a desidratação da creatina. Existem três aminoácidos, glicina, metionina e arginina, no fígado, pâncreas e rim, que estão indiretamente ligados a esta produção. Uma vez produzida a creatinina é transportada para outros órgãos, como, o músculo e o cérebro, onde é fosforilada para guardar energia sob a forma de fosfocreatina através da reação química mediada pela CK e ATP (Narayanan & Appleton, 1980; Kaneko, Harvey & Bruss, 2008; Brosnan, Silva & Brosnan, 2011).

A creatinina é excretada principalmente pela urina e secundariamente pelo suor e trato gastrointestinal (Kaneko, Harvey & Bruss, 2008).

A creatinina está intimamente ligada à função renal, já que é filtrada livremente no glomérulo renal, local onde é também concentrada. A urina equina possui uma concentração de creatinina que varia entre 100 a 300 mg/dL, resultando numa total excreção diária de 15 a 25 g de creatinina (Kohn & Strasser, 1986, citado por, Brewer, Clement, Lotz, et al., 1991; Walton, 2013; Morris, Divers & Whitlock, 1984, citado por, Reed et al., 2018).

A creatinina pode variar consoante a idade, o nível de atividade e a função renal do animal (Reed, Bayly & Sellon 2018). O aumento deste parâmetro indica azotémia, a qual poderá ser

classificada como pré-renal, renal e pós-renal, quando interpretada em conjunto com o quadro clínico e resultados da urinálise (Stockham, 1995). Analiticamente, a concentração deste parâmetro é expressa em mg/dL.

5.7 Compostos azotados da ureia sérica

A ureia é sintetizada no fígado através do metabolismo de amónia e do bicarbonato (Barralet & Rickets, 2002; Pusterla & Higgins, 2018).

A ureia é a principal via de excreção de azoto, por isso, o catabolismo proteico contribui para as concentrações de BUN. A sua eliminação é primariamente renal, onde é livremente filtrada nos glomérulos e é sujeita a reabsorção tubular passiva (Pusterla & Higgins, 2018).

Deste modo, as taxas reduzidas de fluxo tubular vão aumentar a reabsorção, aumentando as concentrações no sangue. Uma proporção de ureia é excretada no intestino, onde pode sofrer uma digestão microbiana, podendo esta via de eliminação estar aumentada em cavalos com doenças renais (Pusterla & Higgins, 2018).

Em conjunto com o valor da creatinina, o aumento de BUN indicam azotémia, que pode ser, pré-renal, renal e pós-renal (Durham, Smith & Newton, 2003; Pusterla & Higgins, 2018). As concentrações de BUN são expressas em mg/dL, tal como a creatinina.

5.8 Creatina quinase

A creatinina quinase (CK) é uma enzima citoplasmática responsável pela conversão reversível do fosfato creatina e adenosina difosfato em creatina e adenosina trifosfato, a qual é usada para a contração muscular. Esta fornece a principal fonte de energia no músculo no início do exercício (Pulugurtha, 2011; Lavóie, 2020).

A creatina cinase encontra-se em maior quantidade no músculo esquelético, musculo cardíaco e cérebro, e menores quantidades em vários órgãos como o musculo liso, intestino, fígado e baço (Boyd, 1983). Assim, esta enzima está presente em concentrações elevadas no citoplasma das células musculares, pelo que quando ocorre lesão destas células, há libertação de CK para o espaço extracelular (Walton, 2013).

A CK é sensível e específica para lesão do músculo esquelético ou cardíaco (Reed, Bayly & Sellon, 2018; Pusterla & Higgins, 2018), tendo uma semivida de 2 horas e a sua concentração é usualmente expressa em UI/L (Cardinet, Littrell & Freeland, 1967, citado por, Reed e al., 2018).

O aumento da CK tem como etiologias miopatia por esforço, miopatia pós-anestésica, administração de succinilcolina, recumbência prolongada, trauma, injeções intramusculares,

exercício extenuante, doenças cardíacas e má colheita da amostra por punção inadvertida do musculo aquando da veinopunção (Benson & Thurmon, 1980; Cornick & Seahorn, 1990; Steffey, Woliner & Dunlop, 1990; McKellar, Bogan, von Fellenberg, et al., 1991; Fayolle, LeFebure & Braun, 1992; Steffey, Gri, Dunlop et al., 1993; Valberg, Jonsson, Lindholm et al., 1993; Valberg, Haggendal & Lindholm, 1993; Stockham, 1995).

6. Piroplasmose

A piroplasmose é uma doença parasitária intra-eritrocitária transmitida por carrças da família Ixodidae do género *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor*, específicas para equídeos (cavalo, burro, mula e zebra) (Waal, 1992; Qablan et al, 2013; Laha, Das & Sen, 2015). Os agentes etiológicos são parasitas hematozoários, nomeadamente, a *Theileria equi* e a *Babesia caballi* (Sellon & Long, 2007). A transmissão do parasita ocorre quando o ixodídeo se alimenta, mas também pode ocorrer por via transplacentária ou iatrogénicamente (De Wall & Van Heerden, 2004; Allsopp, Lewis & Penzhorn, 2007).

Os animais infetados são portadores destes patogénicos durante um longo período de tempo e servem de fonte de infeção para os vetores (carrças), que por sua vez transmitem os parasitas a outros hospedeiros equídeos (Figura 18) (Sumbria, Singla & Sharma, 2016).

A parasitose ocorre em três formas, podendo ser aguda, subaguda ou crónica. Os sinais clínicos da babesiose e teileriose equina são similares, e incluem febre, anemia hemolítica, inaptência, edema, icterícia, trombocitopenia, coagulopatias, petéquias, hemoglobínúria, hepatomegália, esplenomegália, podendo ocorrer ainda cólica, sinais respiratórios e neurológicos e até mesmo morte (Reed, Bayly & Sellon, 2018).

O sinais clínicos de *B. caballi* tendem a ser mais ligeiros que os de *T. equi* e estes desenvolvem-se 10-30 dias e 2-19 dias, respetivamente, após infeção (Reed, Bayly & Sellon, 2018).

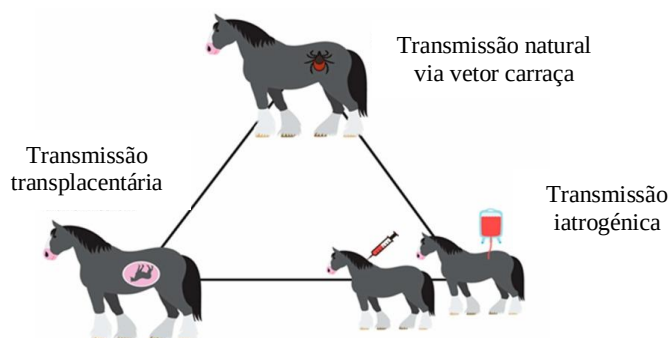


Figura 18- Representação esquemática dos possíveis modos de transmissão de piroplasmose equina. Adaptado de: Onyche, 2019.

As formas parasitárias de *Theileria equi* são de pequenas dimensões, 1,5 μm de comprimento, e são redondas ou ovais, e formando uma “cruz de malta” importante característica deste agente, que facilita a sua identificação microscópica em esfregaços sanguíneos (Navarrete & Serrano, 1999; Zaugg, 2002; De Wall & Van Heerden, 2004). A *Babesia caballi* tem forma piriforme de grandes dimensões, encontrando-se geralmente em pares. As formas piriformes medem 2,5–4 μm de comprimento e as formas redondas ou ovais medem 1,5–3,0 μm em diâmetro (Laha, Das & Sem, 2015).

O diagnóstico de piroplasmose pode ser feito através da observação ao microscópio do esfregaço sanguíneo periférico (Figuras 19 e 20). Contudo, os hematozoários só são observados em maior número na fase aguda da doença, associada à apresentação clínica de pirexia, pelo que na fase crónica estes não são observados no esfregaço sanguíneo (Friedhoff & Soule, 1996; Reed, Bayly & Sellon, 2018).

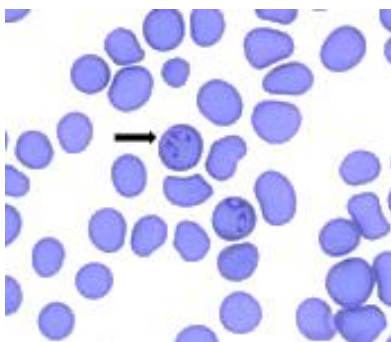


Figura 20- Eritrócito de equino contendo merozoítos de *B. caballi*. Adaptado de: Wise et al., 2013.

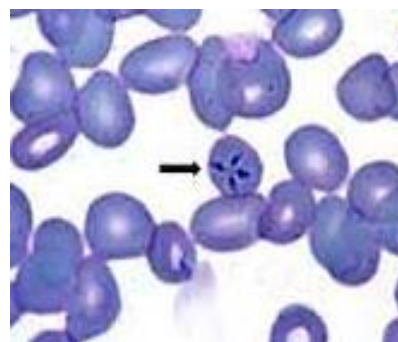


Figura 19- Eritrócitos de equino, a seta indica quatro merozoítos e *T. equi*, referido como "cruz de malta". Adaptado de: Wise et al., 2013.

Alternativamente, podem ser efetuados testes serológicos como, ELISA, teste fixação do complemento (CFT), ‘Western Blot’ e teste de imunofluorescência indireto (Ybañes et al, 2018).

Cada uma destas técnicas serológicas tem as suas vantagens e desvantagens, e o seu uso vai depender dos custos associados, sensibilidade, especificidade e simplicidade de execução. Adicionalmente, é recomendado que sejam utilizados pelo menos dois testes serológicos diferentes (Ali, Sugimoto & Onuma, 1996). Atualmente, o teste de imunofluorescência indireta e o ELISA são os testes serológicos primários usados para qualificar cavalos para exportação. Estes testes provaram ser mais eficazes na deteção de animais infetados a longo prazo e animais tratados com medicamentos antiparasitários (OIE, 2018).

Dos testes serológicos descritos o teste ELISA é o mais sensível para o diagnóstico de piroplasmose causada por *T. equi* (Knowles, Kappmeyer, Stiller et al., 1992). Este teste de diagnóstico tem como desvantagens, o facto de apenas detetar a presença de resposta imunitária (presença de anticorpos), ou seja, não identifica o tipo de agente presente e pode dar resultados falso-negativos ou falso-positivos (Tenter & Freidhoff, 1986; OIE, 2018). O teste de fixação do complemento tem como desvantagens não detetar uma infeção latente e é incapaz de discriminar entre animais negativos e portadores, pelo caiu em desuso na rotina clínica (Tenter & Friedhoff, 1986). No teste de imunofluorescência indireta, a padronização é difícil, considerando a interpretação subjetiva do leitor e é um método moroso (Bose et al., 1995; Bruning, 1996).

Por fim, existem técnicas de diagnóstico baseadas no DNA, como o PCR (Polymerase chain reaction), que é mais sensível e específico, que os outros métodos abordados. Este é preferível para o diagnóstico de animais com infeção crónica por piroplasmose equina. O PCR para a piroplasmose, tem como alvo os genes 18S rRNA e BC48 (*B. caballi*) e genes EMA-1 (*T. equi*). Existem três tipos de variação de PCR, PCR em tempo real, ‘nested’ PCR e ‘nested’ PCR com hibridização (Bashiruddin, Cammà & Rebêlo, 1999; Battsetseg, Xuan, Ikadai, et al., 2001; Schwint, Ueti, Palmer, et al., 2009; Bhoora, Quan, Franssen, et al., 2010).

Devido à sua simplicidade e por ser economicamente acessível, a técnica de PCR, sendo é a mais utilizada em clínica equina, sendo preferível à técnica de ELISA, já que permite identificar a presença do antigénio (Cantú-Martinez, Segura-Correa, Silva-Páex et al., 2012; Ros-García, M’ghirri, Hurtado et al., 2013; Hall, Busch, Scoles et al., 2013).

7. Limitações do hemograma e das bioquímicas plasmáticas: influência da idade, raça e atividade física.

A interpretação do hemograma deve ser feita sempre com a informação dos dados clínicos dos animais e nunca de forma isolada. Também, é fundamental interpretá-lo considerando os diferentes fatores de variação individuais, tais como, a idade, a raça, o género, o estado nutricional, o nível de treino e a forma física, o tempo de repouso após último esforço físico, o grau de excitação, a hidratação do animal, as condições de colheita e transporte da amostra, eventuais tratamentos administrados, assim como o equipamento e a metodologia utilizados na análise das amostras (Amory, 2006; Weiss & Wardrop, 2010).

A integração desta informação irá prevenir erros na interpretação do hemograma, por vezes frequentes na prática clínica (Amory, 2006).

7.1. Influência da raça

Os cavalos tendem a ser classificados de acordo com as características temperamentais das raças. Assim, podem pertencer ao grupo ‘warm-blood’, que compreende cavalos de descendência árabe, incluindo o Puro-Sangue Espanhol, o Puro-Sangue Inglês, (PSI) e o Puro-Sangue Lusitano, (PSL), ou ao grupo ‘cool-blood’ que compreende os cavalos de tiro, os pôneis e os burros. Adicionalmente, está descrito na literatura uma terceira categoria denominada de ‘hot-blood’, a qual compreende cruzamentos entre cavalos ‘warm-blood’ e ‘cool-blood’, incluindo as raças Standardbreds e Quarto de Milha. Estas características comportamentais refletem também a seleção das diferentes raças de acordo com a sua fisiologia e aptidão desportiva (Lording, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Ainda, considerando a aptidão desportiva e o impacto económico da raça PSI, a padronização dos valores de hemograma e bioquímicas plasmáticas tende a ter por base estes animais, não refletindo necessariamente outras raças equinas.

Os cavalos de sangue quente têm uma contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina (Hg), hematócrito (HCT), e volume de sangue mais elevado em comparação com os cavalos de sangue frio (Weiss & Wardrop, 2010). Os mesmos autores reportaram que cavalos de tiro e pôneis saudáveis apresentavam um valor médio de HCT de 24 %, o qual era inferior ao observado nos cavalos PSI. Os PSI apresentavam ainda um volume corpuscular médio (VCM) inferior aos cavalos de tiro/tração (Weiss & Wardrop, 2010).

Similarmente, os cavalos miniatura americanos possuem também contagens de HCT, Hg, e RBC inferiores, mas possuíam valores de VCM, HCM e CHCM superiores do que as outras raças (Harvey, Hambright & Rowe, 1984, citado por: Lawrie, 2012).

No que diz respeito às limitações do leucograma, foram encontradas pequenas diferenças entre as várias raças em relação à contagem de leucócitos. Contudo, os cavalos de sangue quente tendem a apresentar contagens de leucócitos ligeiramente mais elevadas em comparação com cavalos de sangue frio (Weiss & Wardrop, 2010). Os PSI e Puro Sangue Árabe têm rácio médio N: L de 1,0, enquanto que os cavalos de sangue frio têm um rácio médio de N:L de 1,7 (Weiss & Wardrop, 2010) e os cavalos miniatura têm uma relação N:L de 0,67 (Harvey, Hambright & Rowe, 1984, citado por, Lawrie, 2012).

7.2. Influência da idade

A idade pode também ser uma limitação dos valores do hemograma, pelo que os cavalos com mais de 20 anos de idade podem possuir aumento de tamanho de ERT e valores de VCM normais (Ralston, Nockels & Squires, 1988, citado por, Chikhaoui, Smail & Adda, 2018). No entanto, o parâmetro CHCM mantém-se contante após o nascimento e é similar aos valores de adulto (Harvey, 1990).

Por outro lado, valores de linfócitos continuam a diminuir com a idade ao contrário dos neutrófilos que se mantêm exatamente igual, resultando num rácio N:L superior em cavalos velhos comparando com poldros (Weiss & Wardrop, 2010). Os EOS não são detetados de forma rotineira à nascença e atingem uma média de 400/ μ L aos 4 meses de idade (Harvey, 1990). Em contraste, o número de monócitos mantém-se constantes e não mudam com a idade (Harvey, 1990). Em equinos até aos 3 anos de idade foi reportado um aumento da contagem média de PLQ (Finocchio, Coffman & Osbaldiston, 1960, citado por, Reed et al., 2018).

7.3. Influência da atividade física

No que diz respeito à influência do exercício físico nos valores do hemograma, deve-se ter em consideração as diferentes variáveis que condicionam o fator exercício, nomeadamente idade, o género, raça, quantidade de exercício efetuada, intensidade e modalidade a exercer (Rose & Hogdson, 1982; Rose & Allen, 1983; Bayly, 1987).

Apesar destas variáveis, o exercício físico intenso está associado a aumento de Hg até 23 g/dL, HTC até 65% e contagem de ERT (Bayly, 1987). Estas alterações eritrocitárias estão associadas à libertação de epinefrina, aumento do tónus simpático, contração esplénica (Rose & Allen, 1983; Bayly, 1987). O exercício físico induz algumas alterações leucocitárias variáveis em resposta ao cortisol e à epinefrina, sendo descrita leucocitose por neutrofilia com linfocitose ou linfopénia (Carlson, 1975; Rose & Hogdson, 1982; Bayly, 1987). Conseguimos nos dias de hoje quantificar a resposta ao exercício físico e tempo de recuperação nos equinos, que de facto pode influenciar os valores de hemograma e bioquímicas plasmáticas (Násko, Domino, Jasinski & Witkowska-Pilaszewick, 2021).

IV. Projeto de investigação

1. Objetivos

Uma vez que a definição de intervalos de referência para os parâmetros do eritrograma, leucograma, trombograma e bioquímicas plasmáticas são essenciais para um correto diagnóstico e para o exercício de uma medicina personalizada, torna-se, assim, fundamental que os mesmos se encontrem padronizados para equinos da raça PSL, a qual possui características fisiológicas individuais e distintas de outras raças de equinos.

Deste modo, o presente estudo teve como principais objetivos:

1. Contribuir para a padronização dos valores de referência do hemograma e de bioquímicas plasmáticas em equinos saudáveis da raça PSL.
2. Comparar os resultados obtidos com os valores de referência previamente publicados para cavalos da raça PSI, Andaluz e da própria raça PSL, com intuito de averiguar possíveis diferenças entre as populações.
3. Averiguar a presença de hemoparasitas, nomeadamente *Babesia caballi* e *Theileria equi*, no esfregaço sanguíneo de cavalos PSL assintomáticos, residentes em Portugal.

2. Materiais e métodos

2.1. Caracterização da população

Na elaboração deste estudo foram incluídos 52 equinos de raça PSL, dos quais 34 machos inteiros (65,4%) e 18 fêmeas (34,6%), com idades compreendidas entre os 2 e os 5 anos ($3,19 \pm 1,06$). Os cavalos habitavam nas regiões do Alentejo, Ribatejo e Lisboa e Vale do Tejo em centros hípicas, coudelarias ou propriedades privadas.

Todos os animais se encontravam saudáveis, não possuindo historial de doença e apresentavam um exame físico sem alterações dignas de registo. Previamente à sua inclusão no estudo foi realizado um exame de estado geral para detetar possíveis alterações de saúde, tais como problemas respiratórios e cardiovasculares, sinais de anemia ou de infeção e realizou-se ainda um breve exame músculo-esquelético, com intuito de descartar a presença de claudicação e de possíveis alterações neurológicas.

A colheita de sangue foi realizada no âmbito da rotina clínica, sendo que por este motivo, os animais incluídos na população do estudo foram escolhidos de forma aleatória, dependendo da casuística clínica acompanhada durante o período de estágio.

Adicionalmente, as colheitas foram realizadas em animais em repouso, e caso o cavalo se apresentasse excitado no ato de consulta, a colheita de sangue era adiada até que este se acalmasse.

Apesar de todos os animais se encontrarem clinicamente saudáveis, não foi possível obter uma história vacinal e de desparasitação de todos os animais.

Posteriormente um dos animais avaliados foi excluído do estudo, pois foram detetados hemoparasitas na observação do esfregaço sanguíneo, pelo que os resultados apresentados são referentes a 51 animais.

2.2. Colheita e processamento da amostra para hemograma e bioquímicas plasmáticas

Para a colheita de sangue procedeu-se à venipunctura da jugular de 52 equinos clinicamente saudáveis (Figura 21). Previamente à colheita de sangue realizou-se a assepsia do local escolhido com álcool a 90% e com o auxílio de uma agulha de 18 gauge e uma seringa de 10 mL foram colhidos 6mL de sangue. O volume de sangue colhido foi transferido de seguida para um tubo de EDTA K2 E de 2 mL (BD Vacutainer® spray-coated K2EDTA Tubes) e para um tubo de heparina de lítio de 4 mL (BD Vacutainer® spray-coated LH tubes), os quais foram invertidos cuidadosamente para homogeneizar a amostra. Posteriormente os tubos foram acondicionados numa caixa térmica para serem transportados até ao laboratório.



Figura 21- Venipunctura da veia jugular esquerda.

Após a colheita de sangue, as amostras foram processadas até 2 a 6 horas, utilizando a analisadora hematológica automática Mindray BC-5300 Vet, e realizados os esfregaços sanguíneos. Os parâmetros hematológicos obtidos resultaram ou da análise direta da analisadora hematológica, ou do cálculo indireto realizado automaticamente pela analisadora, ou por estimativa da contagem total e diferencial de LEUC e estimativa da contagem total PLQ através observação dos esfregaços preparados ao microscópio ótico. Para cada equino foram obtidos os valores de ERT, HTC, Hg, HCM, CHCM, VCM, PLQ, LEUC, LINF, NEU, MON, EOS e BAS.

Para as análises bioquímicas, o sangue foi primeiramente centrifugado na centrífuga Hettich® Universal 320R a 2000 rotações durante 4 minutos, sendo posteriormente o plasma separado para um tubo de 'eppendorf' devidamente identificado (Figura 22 e 23). O plasma obtido foi então colocado na analisadora de bioquímicas Arkray Spotchem™ EZ SP-4430 e para cada parâmetro foram usados kits com tiras de reagente específico, nomeadamente Akray Spotchem™ II Creatinine, Ref: 33922', Akray Spotchem™ II Albumin, Ref: 33913', Akray Spotchem™ II Total Billirrubin, Ref: 33910', Akray Spotchem™ II GOT/AST, Ref: 33914, Akray Spotchem™ II GGT, Ref: 33920, Akray Spotchem™ II Blood Urea Nitrogen, Ref: 33909', Akray Spotchem™ II Total Protein, Ref: 77167 e Akray Spotchem™ II CK, Ref: 77172. Assim, para cada animal foram obtidos os valores de AST, GGT, PT, Albumina, Bilirrubina total, creatinina, CK e BUN.



Figura 23- Sangue centrifugado para análises bioquímicas séricas.



Figura 22-Plasma separado para tubo de 'eppendorf'.

2.3. Esfregaço Sanguíneo

O esfregaço sanguíneo foi efetuado através de técnica de 'wedge'. Para a sua realização foram utilizadas duas lâminas, onde foi colocada gota de sangue na extremidade de uma das lâminas com auxílio de uma micropipeta mecânica (Minipet) (figura 24). A lamina utilizada para estender a gota de sangue foi posicionada a um ângulo de 30° a 45°, sendo movida para trás até tocar na gota de sangue, permitindo que esta se espalhe no bordo da lâmina. De seguida, com movimento uniforme e rápido a lâmina que espalha foi avançada no sentido contrário da gota, levando a amostra consigo, formando um esfregaço em monocamada. Após a secagem dos esfregaços ao ar todas as amostras foram identificadas com um código de amostra.

Após este processo as lâminas foram coradas com a solução 'diff-quick', sendo o primeiro passo a imersão do esfregaço na solução fixadora de cor azul, contendo metanol e corante triarilmetano, seguido da solução 1 eosinofílica e de cor laranja, composta por corantes xantenos, azida de sódio e tampão de pH, e por fim na solução 2, basofílica de cor azul púrpura, composta por corante de tiazina e tampão de pH. O esfregaço é mergulhado sequencialmente 5 vezes em cada solução, sendo posteriormente lavado sob água corrente e seco ao ar ou com auxílio de um secador (Figura 25).



Figura 25- Minipet.

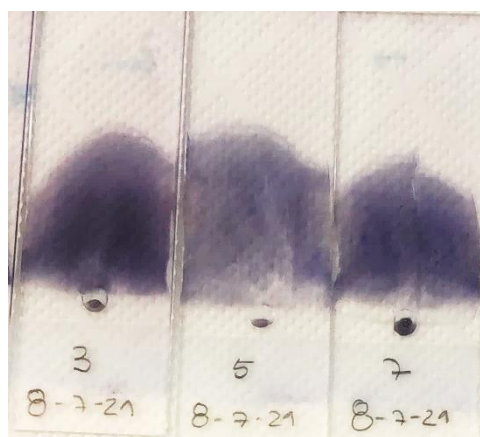


Figura 24-Esfregaços sanguíneos corados com solução 'Diff-Quik'.

Seguidamente, procedeu-se à contagem estimativa diferencial de LEUC e à contagem estimativa total de PLQ. A zona ideal para realizar a contagem estimativa diferencial de LEUC, ao microscópio ótico, sob ampliação de 400x é a zona de monocamada. Para a estimativa diferencial de LEUC, procedeu-se à contagem de 100 LEUC em cada lâmina de esfregaço sanguíneo amostrada, identificando individualmente cada subtipo de

LEUC enumerado, nomeadamente se se tratavam de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos ou basófilos. A percentagem de cada subtipo de LEUC presente na amostra, corresponde à soma das células obtidas por cada subtipo de LEUC enumerado. O produto das percentagens pelo valor total de LEUC estimado gera o valor absoluto correspondente a cada subtipo de LEUC. Para todas as lâminas foi feita a pesquisa de modo a detetar a presença de agregados plaquetários, para obtenção da contagem estimada total de PLQ. Foi realizada a contagem estimativa do número total de PLQ por observação ao microscópio ótico da zona de monocamada dos esfregaços sanguíneos, sob a ampliação de 1000x (objetiva de imersão), que consiste na contagem de PLQ presentes em 10 campos de visualização distintos. O número de PLQ por litro é obtido através da multiplicação da soma das PLQ presentes nos 10 campos observados por 15000.

Nos esfregaços sanguíneos foi ainda observada a morfologia celular, registando-se entre outros a presença de corpos de 'Heinz', a formação de 'rouleaux', a presença de agregados plaquetários e a presença de hemoparasitas (Figura 26 e 27).

Todos os esfregaços sanguíneos foram analisados por dois observadores independentes, sem conhecimento da identificação do animal.

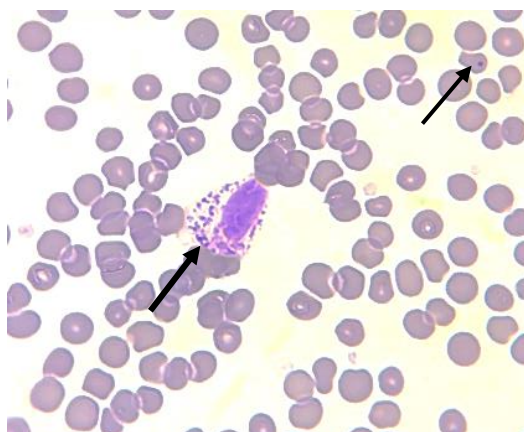


Figura 27-Esfregaço sanguíneo com presença de corpos de 'Heinz' (seta) e basófilo (seta).

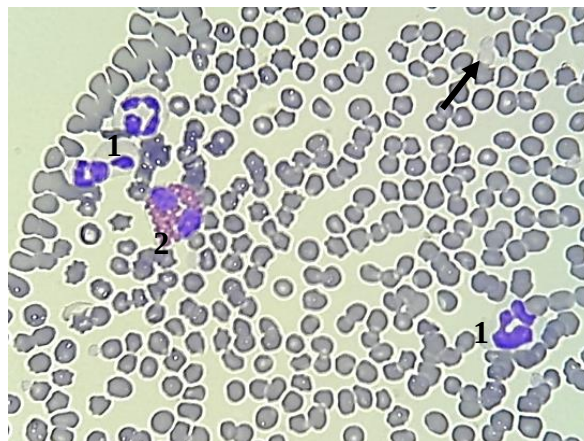


Figura 26-Esfregaço com a presença de plaquetas (seta), neutrófilos segmentados (1) e eosinófilo (2).

2.4. Estatística

Os resultados obtidos foram processados com auxílio do programa estatístico SPSS 28.0.0.0 IBM Corporation®, tendo sido obtidas as médias, desvio padrão, intervalos de confiança 95% para os parâmetros estudados na população descrita. As médias obtidas foram comparadas com as de outras raças de cavalos através do teste ‘t-student’ ($p \leq 0,05$). Para os parâmetros hematológicos, os resultados obtidos foram comparados com valores de referência publicados no ‘The Beaufort Cottage Laboratories Guide to Equine Clinical Pathology’ por Ricketts (2006), disponível online (<https://www.rossdales.com/laboratories>), com os reportados por Silva (2011) e por Satué, Hernández, Lorente, Fazio, Medica (2020), para as raças PSI, PSL e Andaluz, respetivamente. Para os parâmetros bioquímicos, AST, GGT, PT, bilirrubina total, Albumina, CK, creatinina e compostos azotados da ureia sérica, os resultados obtidos foram processados e comparados com valores de referência publicados ‘The Beaufort Cottage Laboratories Guide to Equine Clinical Pathology’ apenas com a raça PSI.

4. Resultados

4.1. Hemograma e bioquímicas plasmáticas da população estudada

4.1.1. Hemograma

Na tabela 1 encontra-se apresentada a média, desvio padrão e intervalo de confiança a 95 % dos parâmetros analisados referentes ao hemograma da população de equinos estudada (n=51).

Tabela 1- Tabela resumo dos valores obtidos do hemograma

Parâmetro*	Unidades	Estatística Descritiva		Intervalo de confiança 95%
		Média	Desvio padrão	
ERT	$\times 10^{12}/L$	9,15	0,98	8,88-9,42
HTC	%	42,01	4,31	40,80-43,22
HG	g/dL	16,28	16,59	11,61-20,95
VCM	fL	46,01	3,32	45,08-46,95
HCM	pg	15,26	1,07	14,97-15,56
CHCM	g/dL	33,21	0,70	33,02-33,41
PLQ	$\times 10^9/L$	127,41	30,21	118,91-135,90
LEUC	$\times 10^9/L$	10,60	2,54	9,89-11,31
NEU	$\times 10^9/L$	5,07	1,73	4,58-5,56
LINF	$\times 10^9/L$	5,03	1,39	4,64-5,42
MON	$\times 10^9/L$	0,12	0,09	0,09-0,14
EOS	$\times 10^9/L$	0,34	0,28	0,26-0,42
BAS	$\times 10^9/L$	0,02	0,03	0,01-0,03

*

ERT- Eritrócitos
HTC- Hematócrito
HG-Hemoglobina
VCM- Volume corpuscular médio
HCM- Hemoglobina corpuscular média
CHCM-Contagem de hemoglobina corpuscular média

PLQ- Plaquetas
LEUC- Leucócitos
NEU-Neutrófilos
LINF-Linfócitos
MON-Monócitos
EOS-Eosinófilos
BAS-Basófilos

A figura 28 e 29 encontram-se respetivamente representados, através de diagramas de extremos e quartis, os parâmetros ERT, HCM e CHCM e os parâmetros de HTC, HG, VCM, PLQ, da população estudada.

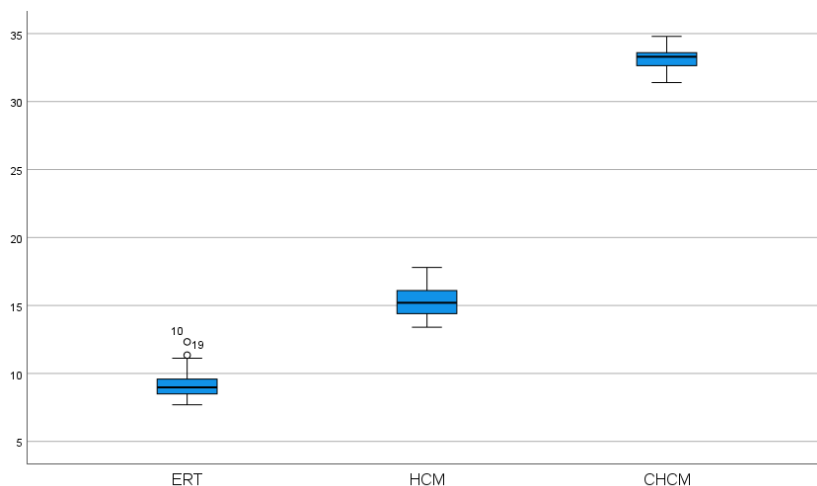


Figura 28- Diagrama de extremos e quartis de ERT expresso em $\times 10^{12}$ /L, de HCM expresso em pg e CHCM expresso em g/dL da amostra.

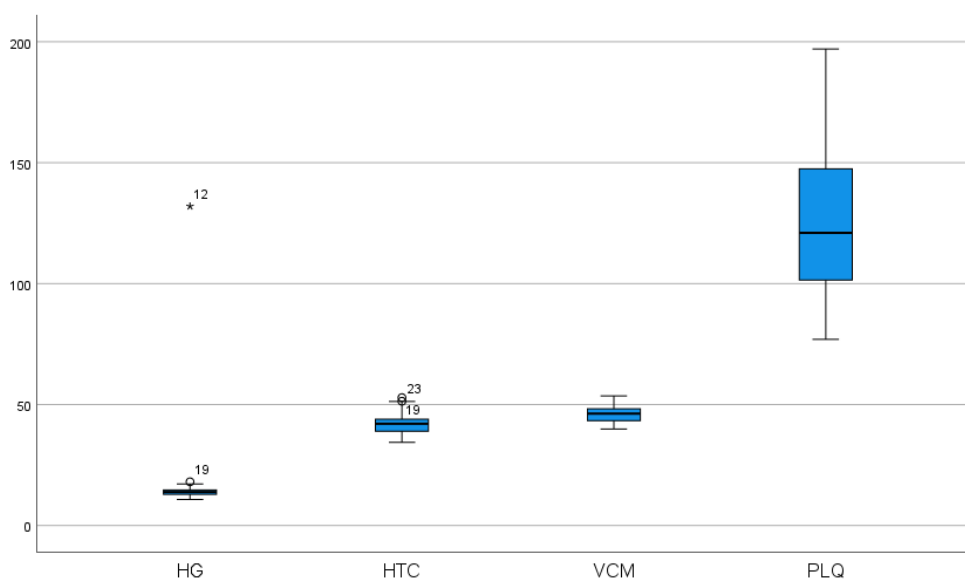


Figura 29-Diagrama de extremos e quartis de Hg expresso em g/dL, de HTC expresso em %, VCM expresso em fL e PLQ expresso em 10^9 /L.

A figura 30 e 31 representam através de diagramas de extremos e quartis os valores obtidos referentes aos parâmetros LEUC, NEU e LINF e aos parâmetros de MON, EOS e BAS da população estudada, respetivamente.

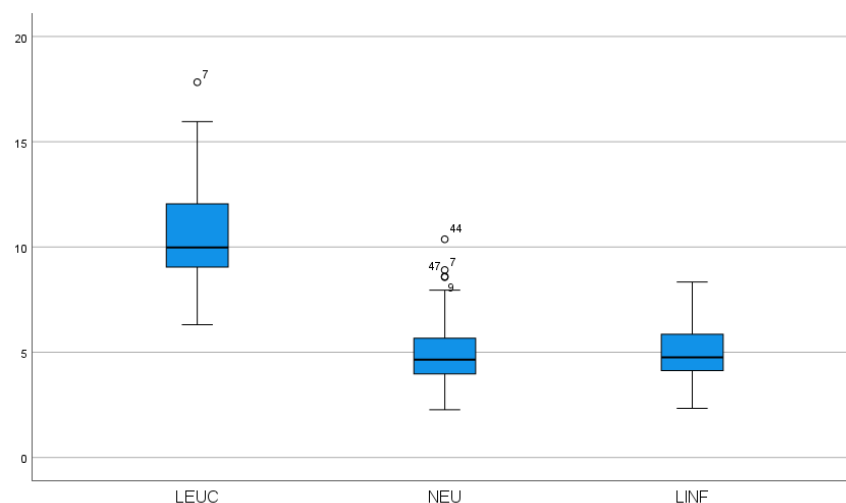


Figura 30- Diagrama de extremos e quartis de LEUC, NEU e LINF expressos em $10^9/L$.

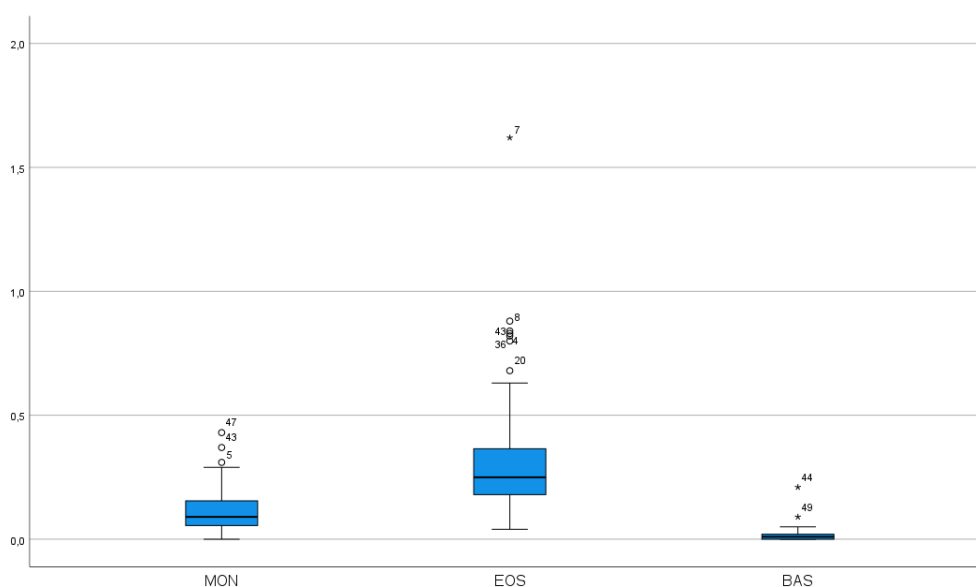


Figura 31-Diagrama de extremos e quartis de MON, EOS e BAS expressos em $10^9/L$.

4.1.2. Análises Bioquímicas

Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros bioquímicos plasmáticos analisados encontram-se apresentados na tabela 2, onde se encontram descritas a média, o desvio padrão e o intervalo de confiança a 95 % de cada parâmetro, e nas figuras 32 e 33, onde sob a forma de diagramas de extremos e de quartis é possível observar a distribuição dos valores obtidos para os parâmetros de bilirrubina total, albumina, BUN, PT e creatinina da amostra e para os valores de AST, GGT e CK da população de equinos estudada.

Tabela 2- Tabela resumo dos valores obtidos para as bioquímicas plasmáticas

Parâmetro	Unidades	Estatística Descritiva		Intervalo de confiança 95%
		Média	Desvio padrão	
Bil Total	mg/dL	1,32	0,72	1,12-1,52
Albumina	g/dL	3,06	0,35	2,96-3,15
BUN	mg/dL	16,28	16,59	11,61-20,95
PT	g/dL	46,01	3,32	45,08-46,95
Creatinina	mg/dL	15,26	1,07	14,97-15,56
AST	UI/L	326,75	65,29	308,38-345,11
GGT	UI/L	44,27	21,57	38,21-50,34
CK	UI/L	201,88	22,12	178,79-224,98

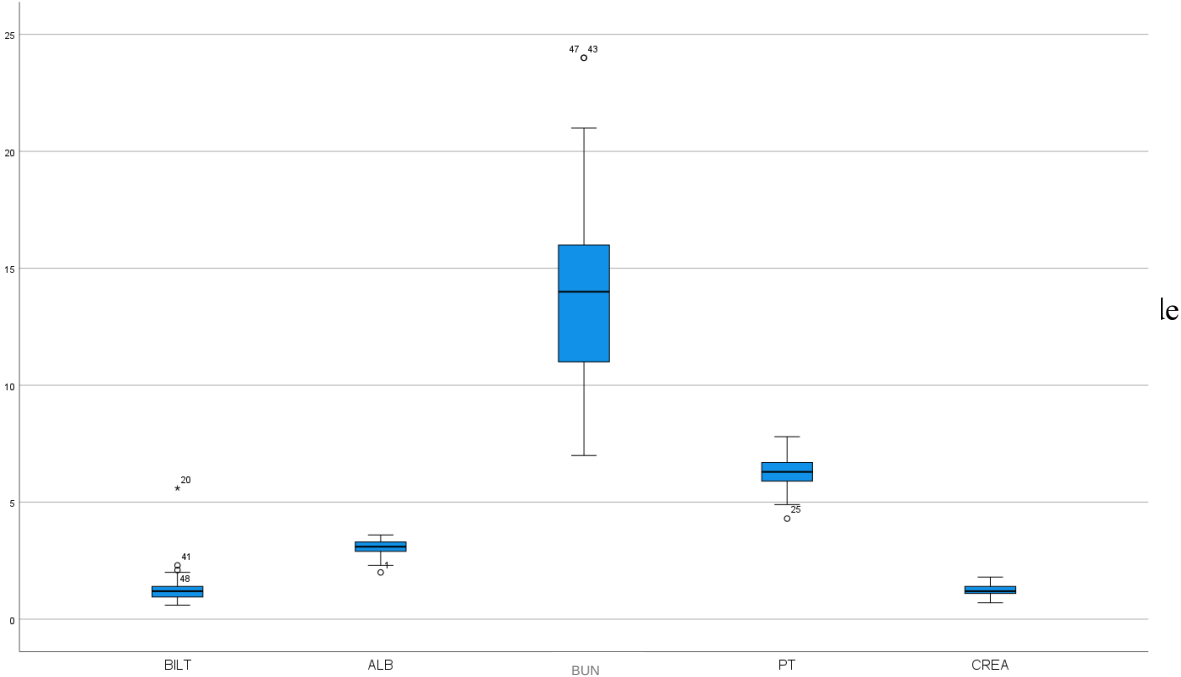


Figura 32-Diagrama de extremos e quartis de Bilirrubina total expressa em mg/dL, Albumina expressa em g/dL, BUN expresso em mg/dL, PT expresso em g/dL e Creatinina expressa em mg/dL, da amostra PSL.

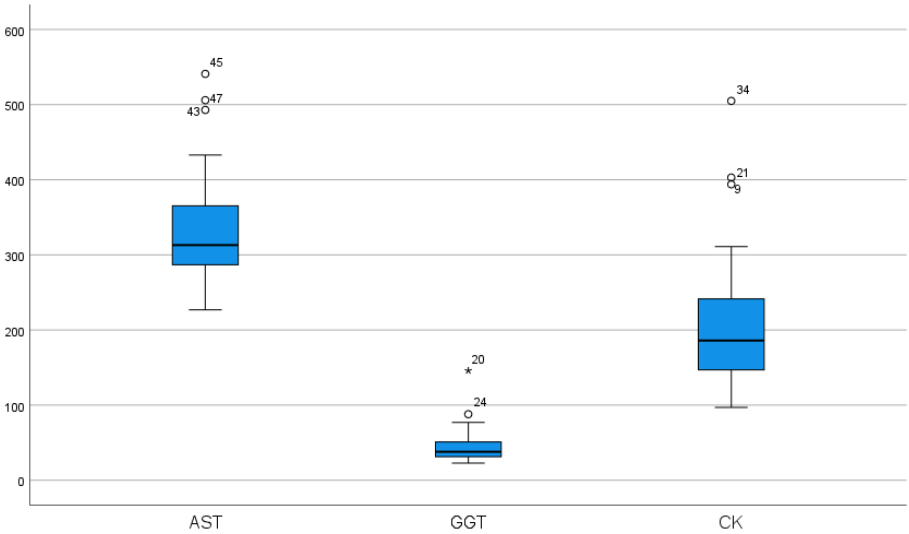


Figura 33-Diagrama de extremos e quartis de AST expressa em UI/L, GGT expressa em UI/L e CK expresso em UI/L da amostra PSL.

4.2. Comparação com outras raças

4.2.1. Hemograma

A tabela 3 representa os valores médios dos parâmetros do hemograma referentes à população estudada (amostra PSL), e os previamente reportados para esta raça (descrito PSL) (Silva, 2011), assim como as médias reportadas na população de cavalos PSI (Rickett, 2006) e de cavalos da raça Andaluz (Satué, Hernández, Lorente, Fazio & Medica, 2020). Na tabela encontram-se ainda apresentadas as respetivas as unidades de medição de cada parâmetro. Apenas foi possível comparar os valores do parâmetro BAS entre a amostra PSL e a raça Andaluz (Satué, Hernández, Lorente, Fazio & Medica, 2020), já que este valor não se encontrava descrito em PSL nem em PSI nas fontes consultadas.

Tabela 3- Resumo das médias dos parâmetros do hemograma para cada população de raça de equinos.

Parâmetro*	Unidades	Amostra PSL	Descrito PSL	PSI	Andaluz
ERT	$\times 10^{12}/L$	9,15	8,04	9,7	8,3
HTC	%	42,01	43,60	40	38,9
HG	g/dL	16,28	13,21	14,9	13,6
VCM	fL	46,01	54,05	40,79	48,70
HCM	pg	15,26	16,48	15,40	17,20
CHCM	g/dL	33,21	30,50	37,80	35,30
PLQ	$\times 10^9/L$	127,41	82,58	170	166,80
LEUC	$\times 10^9/L$	10,60	9,06	8,2	9,55
NEU	$\times 10^9/L$	5,07	4,67	4,6	4,19
LINF	$\times 10^9/L$	5,03	3,63	2,8	4,42
MON	$\times 10^9/L$	0,12	0,29	0,36	0,20
EOS	$\times 10^9/L$	0,34	0,45	0,1	0,26
BAS	$\times 10^9/L$	0,02	-	-	0,01

*
ERT- Eritrócitos
HTC- Hematócrito
HG- Hemoglobina
VCM- Volume corpuscular médio
HCM- Hemoglobina corpuscular média
CHCM- Contagem de hemoglobina corpuscular média

PLQ- Plaquetas
LEUC- Leucócitos
NEU- Neutrófilos
LINF- Linfócitos
MON- Monócitos
EOS- Eosinófilos
BAS- Basófilos

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos após a comparação das médias entre as populações utilizando o teste ‘t-student’, com nível de significância $p \leq 0,05$. Na grande maioria dos parâmetros verificaram-se diferenças significativas entre a média da população estudada quando comparada com as previamente reportadas para cavalos PSL, PSI e Andaluz ($p \leq 0,05$), sendo que estas diferenças se estenderam à comparação efetuada entre a população de PSL estudada e a valores previamente reportados para a raça (Silva, 2011).

Tabela 4 Resultado da aplicação da estatística 't-student' considerando um $p \leq 0,05$.

Parâmetro*	Amostra PSL vs Descrito PSL	Amostra PSL vs PSI	Amostra PSL vs Andaluz
ERT	$t=8,033$; ($p=0,000$)	$t=-3,921$; ($p=0,000$)	$t=6,161$; ($p=0,000$)
HTC	$t=-2,631$; ($p=0,006$)	$t=3,340$; ($p=0,001$)	$t=5,165$; ($p=0,000$)
HG	$t=1,322$; ($p=0,096$)	$t=0,595$; ($p=0,277$)	$t=1,154$; ($p=0,127$)
VCM	$t=17,272$; ($p=0,000$)	$t=11,227$; ($p=0,000$)	$t=-5,774$; ($p=0,000$)
HCM	$t=-8,012$; ($p=0,000$)	$t=-0,857$; ($p=0,198$)	$t=-12,782$; ($p=0,000$)
CHCM	$t=27,562$; ($p=0,000$)	$t=-46,580$; ($p=0,000$)	$t=-21,189$; ($p=0,000$)
PLQ	$t=10,596$; ($p=0,000$)	$t=-10,066$; ($p=0,000$)	$t=-9,310$; ($p=0,000$)
LEUC	$t=4,342$; ($p=0,053$)	$t=6,764$; ($p=0,000$)	$t=2,962$; ($p=0,002$)
NEU	$t=1,646$; ($p=0,000$)	$t=1,935$; ($p=0,029$)	$t=3,626$; ($p=0,000$)
LINF	$t=7,195$; ($p=0,000$)	$t=11,457$; ($p=0,000$)	$t=3,138$; ($p=0,001$)
MON	$t=-13,275$; ($p=0,004$)	$t=-18,654$; ($p=0,000$)	$t=-6,359$; ($p=0,000$)
EOS	$t=-2,807$; ($p=0,004$)	$t=6,077$; ($p=0,025$)	$t=2,016$; ($p=0,000$)
BAS	-	-	$t=1,755$; ($p=0,043$)

*

ERT- Eritrócitos

HTC- Hematócrito

HG- Hemoglobina

VCM- Volume corpuscular médio

HCM- Hemoglobina corpuscular média

CHCM- Contagem de hemoglobina corpuscular média

PLQ- Plaquetas

LEUC- Leucócitos

NEU- Neutrófilos

LINF- Linfócitos

MON- Monócitos

EOS- Eosinófilos

BAS- Basófilos

Apenas em três parâmetros não foram observadas diferenças estatísticas. O valor médio de Hg não diferiu entre as várias raças. De igual modo, não se registou diferença na média de HCM entre a população PSL estudada e a raça PSI ($p=0,198$), nem no valor médio LEUC referente a ambos os estudos realizados em cavalos PSL ($p=0,053$). Contudo, o valor de p obtido na comparação das médias deste último parâmetro poderá indicar que o mesmo tende para a significância.

4.2.2. Bioquímicas Plasmáticas

Seguidamente, na tabela 5 estão representados os valores médios dos parâmetros das bioquímicas plasmáticas da amostra de cavalos PSL estudada e os valores reportados para cavalos da raça PSI (Ricketts, 2006), assim como as respetivas unidades de medida.

Tabela 5- Resumo das médias dos parâmetros de bioquímicas plasmáticas obtidos na população de PSL estudada e descritos em cavalos PSI.

Parâmetro	Unidades	Amostra PSL	PSI
Bil Total	mg/dL	1,32	1,52
Albumina	g/dL	3,05	3,8
BUN	mg/dL	13,80	32,43
PT	g/dL	6,30	6,20
Creatinina	mg/dL	1,24	1,62
AST	UI/L	326,75	467
GGT	UI/L	44,27	27
CK	UI/L	201,88	390

A tabela 6 apresenta o resultado da aplicação do teste estatístico ‘t-sudent’, considerando um $p \leq 0,05$, que visa a comparação dos valores médios dos parâmetros de bioquímicas plasmáticas obtidos na população de cavalos PSL estudada com os reportados para cavalos da raça PSI.

Tabela 6- Resultado da aplicação da estatística ‘t-student’ com nível de significância $p \leq 0,05$.

Parâmetro	Amostra PSL vs PSI
<i>Bil Total</i>	$t=-1,967$; ($p=0,027$)
<i>Albumina</i>	$t=-15,263$; ($p=0,000$)
<i>BUN</i>	$t=-35,543$; ($p=0,000$)
<i>PT</i>	$t=1,072$; ($p=0,144$)
<i>Creatinina</i>	$t=-10,918$; ($p=0,000$)
<i>AST</i>	$t=-15,342$; ($p=0,000$)
<i>GGT</i>	$t=5,719$; ($p=0,000$)
<i>CK</i>	$t=-16,359$; ($p=0,000$)

Para todos os parâmetros, exceto as PT ($p=0,144$), observaram-se diferenças significativas entre as médias das duas populações ($p \leq 0,05$).

4.3. Pesquisa de *Babesia caballi* e *Theileria equi*

Da amostra de animais estudados, 52 animais, apenas uma fêmea de cinco anos de idade apresentou trofozoítos de *Babesia caballi* aquando da observação do esfregaço sanguíneo (Figura 34). Deste modo, como previamente referido, este animal, apesar de aparentemente saudável, foi excluído do estudo dos valores de hemograma e bioquímicas plasmáticas devido a possíveis alterações induzidas pela presença de hemoparasitas, tendo sido considerados apenas 51 animais.

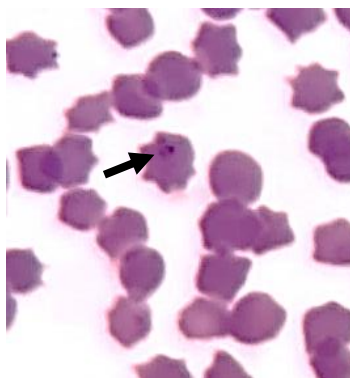


Figura 34-Trofozoítos de *Babesia caballi* (seta).

5. Discussão

A realização de hemograma e bioquímicas plasmáticas no ato de consulta, é importante, pois com um simples exame é possível obter dados sobre os diferentes tipos de células e enzimas presentes no sangue e plasma, permitindo o diagnóstico de doenças, que muitas vezes pode ser subclínica ou crónica. O hemograma permite ainda obter informações sobre a origem das células sanguíneas e a atividade das mesmas (Williams, Ruotsalo & Margo, 2021).

Por outro lado, os intervalos de referência usados nos dias de hoje para a interpretação do hemograma em cavalos são muito abrangentes tornando-se pouco representativos da raça PSL, porque devido a vários motivos, para a sua caracterização foram usados valores obtidos em diferentes raças (Latimer & Prasse, 2003).

No que diz respeito ao hemograma do cavalo PSL, apesar de já existir um estudo e dissertação de mestrado publicados com vista a contribuir para a caracterização do hemograma desta população (Silva, 2011; Silvestre-Ferreira, Cotovio, Maia, et al., 2018), estes não reúnem um consenso no que respeita à padronização de intervalos de confiança (intervalos de referência), pois os dados obtidos em ambos apresentam muitas diferenças, sendo usados intervalos de confiança diferentes, 95% e 90%, respetivamente. Adicionalmente, ambos os estudos não reportam valores referentes à população de basófilos. Assim, o presente trabalho visa contribuir para o estudo destes parâmetros, procurando colmatar algumas lacunas presentes na informação atualmente disponível e, utilizando para o efeito intervalos de confiança de 95%.

A população estudada compreende cavalos da raça PSL com idades compreendidas entre os 2 e 5 anos, ou seja, uma população jovem/jovem adulta. Será importante considerar que os resultados obtidos poderão não ser aplicáveis a cavalos de outras faixas etárias, tais como, neonatos e geriátricos. O estudo de Silva (2011), utilizou uma faixa etária maior entre os 4 e 18 anos, pelo as diferenças observadas entre os valores obtidos no presente estudo e os previamente reportados poderão ser devido às diferenças etárias. Contudo, ao focar-se exclusivamente em animais dos 2 a 5 anos este trabalho constitui uma mais valia para a clínica de equinos, visto que os resultados obtidos representam estatisticamente uma população bem definida. Deste modo, é tido como objetivo facultar informação adicional e contribuir para a caracterização e padronização de intervalos de confiança do hemograma para a raça PSL, incluindo informação sobre a população de basófilos nestes animais a qual ainda não havia sido descrita em cavalos PSL.

Adicionalmente, o nível de atividade física da população estudada, foi reportado como sendo heterogénea, pelo que alguns animais já tinham começado o desbaste e outros ainda se encontravam a campo.

A vasta maioria dos trabalhos publicados sobre a padronização de valores de hemograma e bioquímicas plasmáticas têm por base a raça PSI, a qual apresenta características fisiológicas e aptidões desportivas diferentes do cavalo PSL e do seu vizinho geográfico cavalo Andaluz (Lumsden, Rowe & Mullen, 1980; White, Estrada, Walker, et al., 2001; Anhold, Candonga, Chan, et al., 2014; Miglio, Falcinelli, Mezzasoma, et al., 2021).

O cavalo PSL da atualidade é o resultado de uma seleção de milhares de anos, sendo este integrante da família do cavalo Ibérico, que origina do Sorraia, com raízes do Tarpan da Ásia, e do Árabe, localizado no Berbere do norte da África. Primordialmente, o cavalo PSL foi utilizado para o combate, pois tem como característica a concentração. Nos dias de hoje, o PSL é considerado um cavalo bastante versátil em várias disciplinas, como equitação de trabalho, *dressage*, salto, volteio e toureio (ABPSL, 2012; APSL, 2012).

O cavalo de raça Andaluz é uma das raças de cavalo mais antigas do mundo moderno, tendo contribuído para a formação de outras raças, e é considerada uma raça bastante versátil, pois tem excelentes qualidades, como, inteligência, mobilidade, agilidade e resistência estas características fazem do cavalo Andaluz um cavalo muito apreciado para *dressage*, touradas, trabalho, lazer, atrelagem e entre outros desportos (Koenen et al., 1995).

Os PSI foram selecionados pelo Homem durante séculos para fenótipos de performance atlética (McGivney, Han, Gorduff et al., 2020). Por este motivo, os cavalos da raça PSI possuem um conjunto de características fisiológicas, que lhes conferem capacidades elevadas de metabolismo aeróbico, assim como de metabolismo anaeróbico.

Neste estudo, a amostra PSL apresentou um valor médio de contagem de ERT de $9,15 \times 10^{12}/L$, o qual era significativamente diferente das restantes raças, sendo inferior ao dos PSI ($9,7 \times 10^{12}/L$; $p=0,000$) e superior ao descrito para PSL ($8,04 \times 10^{12}/L$; $p=0,000$) e Andaluz ($8,3 \times 10^{12}/L$; $p=0,000$). A capacidade aeróbica ou o VO_2 Máx dos PSI é superior quando comparada com a de outras raças atléticas de tamanho similar, registando-se valores $>200 \text{ mL O}_2/\text{Kg}/\text{Min}$ (Jones, Longworth, Lindhalm et al., 1989; Jones & Lindstedt, 1994; Yong, Marlin, Deaton et al., 2002). Estes valores são possíveis devido a adaptações estruturais e funcionais dos sistemas respiratório e cardiovascular, assim como à afinidade e capacidade de transporte de O_2 (Constantinopol, Jones, Weibel et al., 1989). Algumas destas

adaptações incluem, o aumento do volume pulmonar, da concentração de Hg e do ‘output’ cardíaco. Está comprovado que os PSI têm um aumento do volume pulmonar e ‘output’ cardíaco, o que leva a adaptações fisiológicas como, o aumento da contagem de eritrócitos sanguíneos, como resposta à demanda de trocas gasosas e transporte de oxigénio, sendo superior aos PSL e outras raças comparadas (Essen-Gustavsson & Lindholm, 1985; Poso, Essengustavsson e Persson, 1993; Hyypä, Rasanen & Poso, 1997; Hinchcliff & Geor, 2008).

Para a raça Andaluz está descrito que esta tem uma capacidade aeróbica reduzida quando comparada com a sua raça ancestral, Puro Sangue Árabe. Este facto deve-se a uma limitação na adaptação da ventilação ao exercício, podendo estar associado ao padrão locomotor e diferenças genéticas entre a raça Andaluz e o seu ancestral (Castejón, Rubio, Tovar, Vinuesa & Riber, 1994; Muñoz, Santisteban, Rubio, Agüera, Escribano & Castejón, 1998; Muñoz, Santisteban, Rubio, Riber, Agüera & Castejón, 1999). O Puro Sangue Árabe foi tradicionalmente selecionado para eventos de endurance e deste modo é esperado que estes tenham uma elevada capacidade aeróbia. Foi então comprovado que o Andaluz tem volumes respiratórios superiores, no entanto a eficiência do uso metabólico do O₂ é baixa, ao contrário do Puro Sangue Árabe. Este facto vem justificar valores inferiores na contagem de ERT para a raça Andaluz (Castejón-Riber, Muñoz, Trigo, et al., 2012).

Assim, considerando que estas três raças foram selecionadas para aptidões desportivas distintas, será espetável que se verifiquem diferenças nos valores do eritrograma.

A média dos valores de HTC da amostra PSL, 42,01%, é similar ao previamente descrito por Silva (2011) para esta raça, 43,60%, esta similaridade entre as médias indica coerência de resultados contribuindo para a padronização intervalos de confiança para o HTC da raça PSL. Apesar das duas médias serem semelhantes em valor absoluto, as duas são estatisticamente diferentes, $p=0,006$, pelo que a média descrita para PSL é superior.

O valor médio de VCM da amostra PSL, 46,01 fL é similar ao da raça Andaluz (48,70 fL; $p=0,000$), superior ao PSI (40,79 fL; $p=0,000$) e substancialmente inferior ao descrito para PSL (54,05 fL; $p=0,000$). Apesar das duas médias serem semelhantes em valor absoluto, as duas são estatisticamente diferentes pelo que a média descrita para Andaluz é superior, esta semelhança baseia-se na similaridade genética entre os PSL e Andaluz. O aumento de VCM pode justificar o aumento do HTC nos PSL, pois estes parâmetros são diretamente proporcionais. É necessário ter em conta que podem existir erros no analisador automático de hemograma, pelo que para confirmar se estes dados estão efetivamente

corretos, teria sido interessante medi-los por microcentrifugação. A policitemia relativa é uma causa comum de aumento do HTC, que pode ser devido a desidratação ou à contração esplénica, induzida por stress durante a colheita (Reed et al., 2018). Como fora descrito previamente, os cavalos utilizados para este estudo estavam todos aparentemente saudáveis e o não foram detetadas alterações clínicas que indicassem que os animais estavam desidratados, no entanto a colheita foi realizada num ambiente familiar ao animal, afastando a hipótese de contração esplénica devido ao stress. Segundo Kerr (2002), o aumento de HTC e VCM pode estar associado ao processamento tardio das amostras, mas neste trabalho, todos os hemogramas foram realizados até, no máximo, 6 horas após a colheita do sangue, afastando assim esta hipótese.

O valor médio de Hg da amostra PSL, 16,28 g/dL, foi superior a todas as raças comparadas neste estudo, descrito PSL (13,21 g/dL; $p=0,096$), PSI (14,9 g/dL; $p=0,277$) e Andaluz (13,6 g/dL; $p=0,127$), no entanto o valor médio de HCM 15,26 pg foi inferior, descrito PSL (16,48 pg; $p=0,000$), PSI (15,40 pg; $p=0,198$) e Andaluz (17,20 pg; $p=0,000$). O esperado entre as raças comparadas seria os PSI terem uma concentração média de Hg superior às outras raças devido às suas características genéticas, descritas anteriormente (Essen-Gustavsson & Lindholm, 1985; Poso, Essengustavsson e Persson, 1993; Hyyppa, Rasanen & Poso, 1997; Hinchcliff & Geor, 2008).

O valor médio de CHCM 33,21 g/dL foi inferior aos PSI (37,80 g/dL; $p=0,000$) e encontrava-se entre os Andaluz (35,30 g/dL; $p=0,000$) e o descrito para PSL (30,50 g/dL; $p=0,000$). O facto do valor médio de CHCM da amostra PSL encontrar-se entre o valor médio para raça Andaluz e PSL, pode ser explicado pelas similaridades genéticas que partilha com a raça Andaluz.

O valor médio da contagem de plaquetas $127,41 \times 10^9 /L$ foi inferior na amostra estudada, tanto relativamente aos PSI ($170 \times 10^9 /L$; $p=0,000$), como, Andaluz ($166,80 \times 10^9 /L$; $p=0,000$), mas superior ao descrito para PSL ($82,58 \times 10^9 /L$; $p=0,000$).

A contagem média de LEUC, $10,60 \times 10^9 /L$ é substancialmente superior na amostra, estudada, tanto comparativamente ao descrito para PSL ($9,06 \times 10^9 /L$; $p=0,000$), PSI ($8,2 \times 10^9 /L$; $p=0,000$) e Andaluz ($9,55 \times 10^9 /L$; $p=0,002$), mas mais próximo aos valores médios de LEUC da raça Andaluz. Relativamente à contagem diferencial de LEUC, a média dos NEU, LINF e EOS, é superior nos PSL, comparativamente a todas as raças comparadas, ao contrário dos MON, $0,12 \times 10^9 /L$, que são significativamente inferiores em valor absoluto na população estudada, relativamente a todas as raças, PSL ($0,29 \times 10^9 /L$; $p=0,000$), PSI (0,36

$\times 10^9/L$; $p=0,000$) e Andaluz ($0,20 \times 10^9/L$; $p=0,000$). A média de EOS da amostra, $0,34 \times 10^9/L$, é superior em valor absoluto aos PSI ($0,1 \times 10^9/L$; $p=0,000$) e Andaluz ($0,26 \times 10^9/L$; $p=0,025$), mas inferiores ao descrito para PSL ($0,45 \times 10^9/L$; $p=0,004$). No que diz respeito à contagem média de BAS, só existiam dados bibliográficos referentes à raça Andaluz, pelo que a amostra PSL estudada, $0,02 \times 10^9/L$, era superior em valor absoluto a esta ($0,01 \times 10^9/L$; $p=0,043$). Todos os resultados dos LEUC foram confirmados por observação de esfregaço sanguíneo. O aumento de EOS pode estar associado a infeção parasitária e reações de hipersensibilidade, que pode ser justificado por alguns animais não estarem desparasitados (Schumacher et al., 2000; Bell, Drew & Wilson et al., 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Tendo em conta a este aumento da contagem média de EOS, seria importante realizar uma pesquisa de parasitas internos e externos, à população estudada, pelo fato de nem todos os animais se encontrarem desparasitados, sendo que a eosinofilia está associada à presença de *larva migrans*. A eosinofilia também pode estar associada a síndrome inflamatória caracterizada pela infiltração de eosinófilos nos tecidos e com aumento destas células em circulação, tal como, a doença multissistémica eosinofílica epiteliotrófica (Brosnahan, 2020). Por outro lado, embora menos frequentemente este aumento pode ser devido a resposta a alérgenos ambientais a que os cavalos estão expostos diariamente. A diminuição relativa dos MON e BAS observado é de difícil interpretação, dado que em cavalos saudáveis está descrito a ocorrência de monocitopenia e basopenia (Carrick & Begg, 2008). O valor médio de BAS da população estudada sobrepõe-se de certa forma com a raça Andaluz, isto pode ser explicado pelo facto do cavalo Lusitano ter como ancestral o cavalo Andaluz/Ibérico, e consequentemente partilham características genéticas.

Atualmente, que seja do conhecimento da autora existem poucos estudos publicados, com vista a contribuir para a caracterização das bioquímicas plasmáticas do cavalo PSL, pelo que a realização deste estudo tem um carácter inovador.

No que diz respeito, à bilirrubina total, $1,32 \text{ mg/dL}$, a média desta encontrava-se ligeiramente inferior aos PSI ($1,52 \text{ mg/dL}$; $p=0,027$). O facto de a média da concentração de bilirrubina total ser superior em valor absoluto em PSI comparativamente a PSL, pode justificar-se pela possibilidade do metabolismo da bilirrubina ser diferente para cada raça, a dieta dos animais e pelo aumento da destruição de eritrócitos associado ao exercício, especificamente na raça PSI (Essen-Gustavsson & Lindholm, 1985; Poso, Essengustavsson & Persson, 1993; Hyypä, Rasanen & Poso, 1997; Hinchcliff & Geor, 2008).

A AST da amostra estudada, 326,75 UI, foi substancialmente inferior aos PSI, (467 UI; $p=0,000$), isto pode ser explicado, segundo Thomassian et al. (2007), quando se sujeita um individuo a um exercício físico máximo, ocorre um processo fisiológico que se caracteriza pela transferência de fluido do espaço intravascular para o espaço extravascular, resultando numa maior concentração dessa enzima devido à diminuição do volume plasmático. Para determinar se este aumento de AST não está associado a miólise, é necessário estudar outra enzima muscular, a CK. Outra causa de aumento de AST inclui dano reversível e irreversível dos hepatócitos e pode ser observado após dano hepatocelular e colestase. De modo a obter um diagnóstico correto a determinação da atividade da AST deve ser complementada com outros indicadores de dano e disfunção hepática, como, a SHD, ácidos biliares, bilirrubina e GGT (Durham, 2008).

O valor médio de albumina, 3,05 g/dL e da BUN, 13,80 mg/dL da amostra PSL foi substancialmente inferior aos PSI, $p=0,000$. O aumento substancial de albumina nos PSI, pode basear-se no facto desta raça ser utilizada para desporto de alto rendimento, o exercício provoca um movimento de fluido do espaço intravascular para o espaço extracelular, ou seja, desidratação transiente, que leva a um aumento de produção de albumina (Rose et al., 1993). A hiperalbuminémia também é um achado comum em insuficiência hepática (Parraga, Carlson & Thurmond, 1995; Sellon, Spoulding, Breuhaus et al., 2000). A urémia pode ser devido a causas dietéticas, doença hepática, doença renal, stress e exercício físico (Grossman, 1982, citado por, Reed et al., 2018; Rose et al., 1993; Durham, Smith & Newton, 2003).

As PT da amostra PSL, 6,30 g/dL foi similar aos PSI (6,20 g/dL; $p=0,144$), apesar das duas médias serem semelhantes em valor absoluto, as duas são estatisticamente diferentes pelo que a média descrita para PSL é superior.

O valor médio da GTT da amostra PSL, 44,27 UI/L, foi substancialmente superior aos PSI (27 UI; $p=0,000$), pode suceder-se que na população estudada o transito biliar fosse mais lento, diferenças na quantidade de GGT e diferenças na dieta. O seu aumento está associado a doença hepática com doença biliar, como a colestase ou hiperplasia biliar (DeNotta & Divers, 2020). Em alguns equídeos este aumento pode ser fisiológico como no caso dos Asíninos, que podem ter 2-3 x a atividade da GGT dos cavalos (Burden et al 2015).

O valor médio de creatinina da amostra estudada, 1,24 mg/dL, foi inferior aos PSI (1,62 mg/dL; $p=0,000$). A idade da população PSI usada como comparação, situava-se nos 3 anos, por norma nesta idade os cavalos desta raça já começam a competir, logo o aumento

de creatinina, que provém da clivagem da creatina presente nos músculos, pode estar normalmente aumentado. Ao passo que o PSL só começa a ser desbastado por volta dos 3 anos.

O valor médio da CK da amostra PSL, 201,88 UI/L, foi substancialmente inferior aos PSI (390 UI/L; $p=0,000$). Este aumento substancial da CK em PSI pode ser justificado com base nas suas características fenotípicas, nomeadamente, o aumento da densidade de mitocôndrias do músculo esquelético, aumento da atividade enzimática e grande capacidade de armazenamento de substratos energéticos, como o glicogénio, estes fatores podem justificar um aumento de CK não patológico. O aumento de CK pode servir como indicador de uma variedade de doenças, desde doença cardíaca, distrofia muscular, dano nervoso, doenças da tiroide e má função renal. Os fatores que contribuem para níveis elevados de CK no sangue incluem, dano celular, rutura das células musculares ou doença que pode resultar numa fuga de CK das células para o plasma sanguíneo (Totsuka, Nakaji, Suzuki et al., 2002; Baird et al., 2011; Pulugurtha, 2011). Alguns autores, que relacionam o exercício muscular e o metabolismo, reportam que o nível elevado de CK está associado a dano das células musculares após exercício físico extenuante (Baird et al., 2011).

No que diz respeito, à análise dos esfregaços sanguíneos para a presença de *B. caballi* e *T. equi*, apenas uma égua de 5 anos apresentou trofozoítos de *B. caballi*, pelo que foi automaticamente excluída da amostra, pois os critérios de inclusão para a mesma eram animais aparentemente saudáveis e com exame clínico normal. Observação de *B. caballi* e *T. equi* em esfregaços sanguíneos ocorre na fase aguda da doença, por isso teria sido interessante realizar PCR para detetar outros possíveis portadores assintomáticos.

Assim, verificámos que na população estudada existiam diferenças significativas entre os parâmetros do hemograma e bioquímicas plasmáticas comparativamente às raças PSL e Andaluz. Estas diferenças poderão ser resultado de disparidades fisiológicas entre estas sub-populações de cavalos, contudo não poderemos descartar a possibilidade de características intrínsecas da amostra de cavalos avaliadora influenciarem os resultados obtidos, o exemplo mais notório é o facto da amostra de cavalos PSL avaliados compreenderem maioritariamente animais jovens. No entanto, este trabalho visa ser um ponto de partida para outros estudos sobre esta temática, cuja finalidade será melhorar os cuidados médico veterinários providenciados aos animais de uma das raças autóctones portuguesas mais relevantes. Nesse sentido definimos intervalos de confiança de 95% para

todos os parâmetros, os quais poderão ajudar na interpretação de análises hematológicas de animais cujas características serão semelhantes aos da população aqui reportada.

6. Conclusão

A raça PSL tem ganho popularidade crescente, devido à sua aptidão e características físicas. Assim, é pertinente a caracterização de indicadores fisiológicos da raça, tais como os valores de hemograma e bioquímicas séricas, de modo a melhorar a abordagem médica a estes animais.

As diferenças observadas entre as médias dos parâmetros do hemograma e bioquímicas plasmáticas da população de PSL estudada e das populações de equinos PSI e Andaluz, apontam para a importância de utilizar valores de referência adaptados à raça de equinos a avaliar. Estas diferenças poderão estar associadas à genética e manejo.

Contudo, verificaram-se algumas diferenças entre as médias obtidas na população estudada de PSL e as previamente reportadas em cavalos PSL, assim como as reportadas para cavalos PSI e Andaluz. Todos os parâmetros do hemograma à exceção da Hg revelaram diferenças significativas. De igual modo, todos os parâmetros das bioquímicas plasmáticas, à exceção da PT, foram estatisticamente diferentes entre a população PSL e os cavalos PSI. Assim as padronizações de intervalos de confiança obtidos neste estudo tiveram impacto na elaboração de intervalos de referência para o hemograma e bioquímicas plasmáticas em cavalos da raça PSL. Contudo, este estudo visou contribuir para uma medicina personalizada e adaptada às necessidades dos cavalos PSL, pelo que futuramente seria benéfico alargar esta pesquisa a um maior número de animais, incluindo cavalos pertencentes a outras faixas etárias.

Até à data ainda existem poucos estudos sobre os intervalos de referência de bioquímicas sanguíneas em cavalos PSL, tendo em conta que na prática veterinária poderão assumir um papel importante na tomada de decisões, por parte do médico veterinário aquando da análise do hemograma e das bioquímicas plasmáticas em cavalos PSL.

8. Bibliografia

- Ali, S., Sugimoto, C., & Onuma, M. (1996). Equine Piroplasmosis. *Journal of Equine Science*, 7(4), 67-77.
- Allsopp, M. T. E. P., Lewis, B. D., & Penzhorn, B. L. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 130-136.
- Amory, H. (2006). *Analyse de sang: interprétation de l'hématologie et de la biochimie de routine*. Comunicação apresentada no XXIIIème Journée d'étude de la BEPS, França.
- Anderson, M. G. (1975). The influence of exercise on serum enzyme levels in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 7, 160 – 165.
- Anhold, H., Candon, R., Chan, D., & Amos, M. (2014). A comparison of elevated blood parameter values in a population of thoroughbred horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 651-655.
- Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Puro Sangue Lusitano- disponível em: <http://abpsl.rpm.com.br/> acedido em 20 de novembro de 2021.
- Associação Portuguesa do Cavalo Puro Sangue Lusitano – disponível em <http://www.cavalo-lusitano.com/> acedido em 20 de novembro de 2021.
- Bajpai, R., Rajak, C., & Poonia, M. (2015). Platelet estimation by peripheral smear: Reliable, rapid, cost-effective method to assess degree of thrombocytopenia. *International Journal of Medical Science Research and Practice*, 5(5), 90-93.
- Balan, M., McCullough, M., & O'Brien, P.J. (2019). Equine Blood Reticulocytes: Reference intervals, physiological and pathological changes. *Comparative clinical pathology*, 28, 53-62.
- Barralet, A., & Ricketts, S. (2002). Haematology and Blood Biochemistry in the Horse: A guide to interpretation. *In Practice*, 24(6).
- Bashiruddin, J. B., Cammà, C., & Rebelo, E. (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, 84, 75–83.
- Batlivala, T.P., Bacon, N.J., Avery, A.C., Barabas, K., Gunn-Christie, R.G., Conway, J., et al. (2010). Paraneoplastic T cell lymphocytosis associated with a thymoma in a dog. *J. Small Animal Practice*, 51(9), 491–494.

- Battsetseg, B., Xuan, X., Ikadai, H., Bautista, J. L., Byambaa, B., Boldbaatar, D., et al. (2001). Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. *International Journal of Parasitology*, 31(4), 386–386.
- Baumler H, Neu B, Mitlohner R, et al. (2001). Electrophoretic and aggregation behavior of bovine, horse and human red blood cells in plasma and in polymer solutions. *Biorheology*, 38, 39–51.
- Bayly, W., M. (1987). The interpretation of clinicopathologic data from the equine athlete. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 3(3), 631–647.
- Bell, S. A., Drew, C. P., Wilson, W. D., et al. (2008). Idiopathic chronic eosinophilic pneumonia in 7 horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 648–653.
- Benson, G., J. & Thurmon, J., C. (1980). Clinical pharmacology of succinylcholine. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 176, 646-647.
- Bernard, W., V. & Divers, T., J. (1989). Variation in serum sorbitol dehydrogenase, aspartate transaminase, and isoenzyme 5 of lactate dehydrogenase activities in horses given carbon tetrachloride. *American Journal of Veterinary Research*, 50(5), 622-623.
- Bhoora, R., Quan, M., Frassen, L., Butler, C.M., van der Kolk, J.H., Guthrie, A. J. et al. (2010). Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Veterinary Parasitology*, 168(3–4), 201–211.
- Bochsler, P. N., & Slauson, D. O. (2002). Inflammation and repair of tissue. In: D., O Slauson & B., J Cooper (Eds.), *Mechanisms of Disease* (pp 167-172). St. Louis: Mosby.
- Bose, R., Jorgensen, W., K., Dalgliesh, R. J., Friedhoff, K., T. & de Vos, A., J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 61-74.
- Boyd, J. (1983). The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. *Veterinary Clinical Pathology*, 12(2), 9–24.
- Brewer, B.D., Clement, S.F., Lotz, W.S., Gronwall, R. (1991). Renal clearance, urinary excretion of endogenous substances, and urinary diagnostic indices in healthy neonatal foals. *Journal of veterinary internal medicine*. 5(1), 28-33.
- Brockus, C. W., & Andreasen, C. B. (2003). Erythrocytes. In: K., S Latimer, E., A Mahaffey & K., W Prasse, *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology* (4^a ed., pp. 3-45). Ames: Iowa State Press.

- Brosnhan, M.M. (2020). Eosinophils of the horse: Part II: Eosinophils in clinical diseases. *Equine Veterinary Education*, 32(11), 590-602.
- Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M., & Treacher, D. F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, 368, 157- 69.
- Bruning, A. (1996). Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, 152(2), 139-151.
- Burden, F.A., Hazell-Smith, E., Mulueta, G., Patrick, V., Tramford, R., Braunlie, H. W. B. (2015). Reference intervals for biochemical and haematological parameters in mature domestic donkeys (*Equus asinus*) in the UK. *Equine Veterinary Education*, 28(3), 134–139.
- Burton, A.G., Borjesson, D.L., & Vernau, W. (2014). Thymoma-associated lymphocytosis in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(4), 584–588.
- Cantú -Martínez, M., A., Segura-Correa, J., C., Silva-Paéz, M., L., Avalos-Ramírez, R., & Wagner, G., G. (2012). Prevalence of Antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Horses From Northeastern Mexico. *Journal of Parasitology*, 98(4), 869-870.
- Carlson, G. P. (1975). *Hematologic alterations in endurance - trained horses*. In: Proceedings of the First International Symposium on Equine Hematology (pp. 444 – 449).
- Carrick, J. B., & Begg, A. P. (2008). Peripheral Blood Leukocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24(2), 239-259.
- Castejón, F., Rubio, D., Tovar, P., Vinuesa, M., Riber, C. (1994). A comparative study of aerobic capacity and fitness in three different horse breeds (Andalusian, Arabian and AngloArabian). *Zentralbl Veterinarmed A*, 41,645–652.
- Castejón-Riber, C., Muñoz, A., Trigo, P., Riber, C., Santisteban, R., & Castejón, F. (2012). Comparative ergoespirometric adaptations to a treadmill exercise test in untrained show Andalusian and Arabian horses. *Veterinary Research Communication*,36, 41-46.
- Chikhaoui, M., Smail, F., & Adda, F. (2018). Blood hematological values of Barb horses in Algeria. *Open Veterinary Journal*, 8 (3), 330-334.
- Christopher, M. J., & Link, D. C. (2007). Regulation of neutrophil homeostasis. *Current Opinion of Hematology*, 14(1), 3-8.
- Christopher, M. M., & Lee, S. E. (1994). Red cell morphologic alterations in cats with hepatic disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 23(1), 7-12.

- Coles, E. (1988). *Veterinary clinical pathology*. Philadelphia: WB Saunders.
- Constantinopol, M., Jones, J. H., Weibel, E. R., Taylor, C. R., Lindholm, A., et al. (1989). Oxygen transport during exercise in large mammals. II. Oxygen uptake by the pulmonary gas exchanger. *Journal of Applied Physiology*, 67, 871–878.
- Cornick, J., L. & Seahorn, T., L. (1990). Cardiac arrhythmias identified in horses with duodenitis/ proximal jejunitis: Six cases (1985-1988). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 197(8), 1054-1059.
- Cowell, R. L. (2004). *Veterinary Clinical Pathology Secrets*. St. Louis, Missouri: Elsevier, Mosby.
- Cowell, R. L., & Tyler, R. D. (2002). *Diagnostic cytology and hematology of the horse* (2^a ed.). Missouri: Mosby.
- Crisman, M. V., & Scarratt, W. K. (2008). Immunodeficiency disorders in Horses. *Veterinary Clinic of Equine*, 24(2), 299-310.
- Cross, D. A., Klesius, P. H., Hanrahan, L. A., et al. (1987). Dermal cellular – responses of helminth - free and *Ostertagia ostertagi* - infected calves to intradermal injections of soluble extracts from *O. ostertagi* L3 larvae. *Veterinary Parasitology*, 23, 257 – 264.
- De Wall, D.T., & Heerden, J.V. (2004). Equine Piroplasmosis. In J. A. W Coetzer & R., C Tustin, *Infectious Diseases of Livestock*. (2^a Ed., pp. 425-432). USA: Oxford University Press.
- Divers, T. J. (1988). The poor performance horse. In: P., Huntington (Ed.). *Proceedings of Tenth Bain-Fallon Memorial Lectures. Equine Diagnostics and Therapeutics. Artarmon*. Australia: Australian Equine Veterinary Association.
- Divers, T. J. (2003). Prevention and Treatment of Thrombosis, Phlebitis and Laminitis in Horses with Gastrointestinal Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 19, 779-790.
- Divers, T. J., Warner, A., Vaala, W. E., Whitlock, R. H., Acland, H. A., Mansmann, R. A., & Palmer, J. E. (1983). Toxic hepatic failure in newborn foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 183, 1407 – 1413.
- Duncan, J. R., & Prasse, K. W. (2011). *Veterinary Laboratory Medicine*. (5^a Ed.). Ames, IA: Iowa University Press.
- Durham, A. (2008). Management of horses with hepatic disorders. In: K., Corley & J., Stephen (Eds.), *The Equine Hospital Manual* (pp. 524-532). Blackwell, Oxford.

- Durham, A. E., Smith, K. C., & Newton, J. R. (2003). An evaluation of diagnostic data in comparison to the results of liver biopsies in mature horses. *Equine Veterinary Journal*, 35, 554–559.
- Edwards, G. B., Kelly, D. F., & Proudman, C. J. (2000). Segmental eosinophilic colitis: a review of 22 cases. *Equine Vet J Suppl*, 32, 86–93.
- Epstein, K. L., Brainard, B. M., Gomez-Ibanez, S. E., Lopes, M. A. F., Barton, M. H., et al. (2011). Thromboestatography in horses with acute gastrointestinal disease. *J Vet Int Med*, 25, 307-314.
- Essen-Gustavsson, B., & Lindholm, A. (1985). Muscle fibre characteristics of active and inactive standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 17, 434– 438.
- Fayolle, P., Lefebvre, H. & Braun, J., P. (1992). Effects of incorrect venepuncture on plasma creatinekinase activity in dog and horse. *British Veterinary Journal*, 148(2), 161-162.
- Finocchio, E., Coffman, J., & Osbaldiston, G. (1960). Platelet counts in horses. *Cornell Veterinary*, 60(3), 518-27.
- Flaminio, M. J. B. F., Tallmadge, R. L., Salles-Gomes, C. O. M., et al. (2009). Common Variable Immunodeficiency in horses is characterized by B cell depletion in primary and secondary lymphoid tissues. *Journal of Clinical Immunology*, 29(1), 107-116.
- Hall, C. M., Busch, J. D., Scoles, G. A., Palma-Cagle, K. A., Ueti, M.W., Kappmeyer L.S., et al. (2013). Genetic characterization of *Theileria equi* infecting horses in North America: Evidence for a limited source of US introductions. *Parasites Vectors*, 6, 35.
- Harvey, J. W. (1990). Normal Hematologic Values. In: A., M Koterba, W., H Drummond & P., C Kosch (Eds), *Equine Clinical Neonatology* (pp. 561-570). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Harvey, J. W. (1995). Methemoglobinemia and Heinz-body hemolytic anemia. In J., D Bonagura & R., W Kirk (Eds.), *Kirk's Current Veterinary Therapy Small animal Practice* (pp. 443-446). Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Harvey, J. W. (1997). The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: J., J Kaneko, J., W Harvey & M., L Bruss, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (5^a. ed., pp. 157-203). San Diego: Academic Press.
- Harvey, J. W., Stockham, S. L., Scott, M. A., Johnson, P. I., Scott, M. A. & Donald, J. J. (2003). Methemoglobinemia and eccentrocytosis in equine erythrocyte flavin adenine dinucleotide deficiency. *Veterianry Patholology*, 40(6), 632-42.

- Harvey, J.W. (2001). *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals* (1ª Ed.). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Hinchcliff, K. W., Kociba, G. J., & Mitten, L. A. (1993). Diagnosis of EDTA - pseudothrombocytopenia in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 203, 1715 – 1716.
- Hirai, K., Miyamasu, M., Takaishi, T. & Morita, Y. (1997). Regulation of the function of eosinophils and basophils. *Critical Reviews in Immunology*, 17(3-4), 325–352.
- Hoffman, W.E, Solter, P.F. (2008). *Diagnostic enzymology of domestic animals*. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Kaneko, J.J., Harvey, J.W., & Bruss, M.L. (eds), (6ª ed., pp 351–378). Burlington: Academic Press.
- Hyypä, S., Rasanen, L. A., & Poso, A. R. (1997). Resynthesis of glycogen in skeletal muscle from standardbred trotters after repeated bouts of exercise. *American Journal of Veterinary Research*, 58,162–166.
- Jain, N. C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Jones, J. H., & Lindstedt, S. L. (1994). Limits to maximal performance. *Annual Review of Physiology*, 55, 547–569.
- Jones, J. H., Longworth, K. E., Lindholm, A., Conley, K. E., Karas, R. H., et al. (1989). Oxygen transport during exercise in large mammals. I. Adaptive variation in oxygen demand. *Journal of Applied Physiology*, 67, 862–870.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (pp. 882-888). San Diego, California: Academic Press.
- Kerr, M., G. (2002). *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Biochemistry and Hematology* (2ª. Ed.). West Sussex: Blackwell Science.
- Klag, A. R., Giger, U., & Shofer, F. S. (1993). Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986-1990). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 202, 783-788.
- Knowles, D. P. Jr., Kappmeyer, L. S., Stiller, D., et al. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 3122–3126.
- Kramer, J., Tornquist, S., Erfle, J., & Sloeojan, G. (1993). Large Granular Lymphocyte Leukemia in a Horse. *Veterinary Clinical Pathology*, 22(4), 126–128.
- Laha, R., Das., & Sen, A. (2015). Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. *Tropical Parasitology*, 5(2), 94–100.

- Latimer, K. S. M., & Rakich, P. (2002). Peripheral blood smears. In: R., L Cowell & r., D Tylers, *Diagnostic cytology and hematology of the horse* (2^a. ed.). St Louis (MO): Mosby Inc.
- Latimer, K. S., & Prasse, K. W. (2003). Leukocytes. In: K., S Latimer, E., A Mahaffey, & K., W Prasse (Eds), *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology* (4^a. ed., pp 46-79). Ames (IA): Iowa State Press.
- Lavóie, J. P. (2020). *Blackwel's Five-Minute Veterinary Consult: Equine*. (3^a ed.). WA: Wiley Blackwell.
- Lawrie, C. (2012). Hematology: Science and Practice. Croatia: InTech
- Lennox, T. J., Wilson, J. H., Hayden, D. W., Bouljihad, M., Sage, A. M., Walser, M. M., et al. (2000). Hepatoblastoma with erythrocytosis in a young female horse. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 216(5), 718-721.
- Lessard, P., Wilson, W., D., Olander, H., J., et al. (1986). Clinicopathologic study of horse surviving pyrrolizidine alkaloid (*Senecio vulgaris*) toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, 47(8), 1776-1780.
- Lester, S. J., Mollat, W. H., & Bryant, J. E. (2015). Overview of Clinical Pathology and the Horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 31(2), 247-268.
- Lopes, P.A. (2020). Piroplasmose equina e implicações nas trocas comerciais em Portugal e no brasil: percepções em uma amostra de proprietários, coudelarias e médicos veterinários. Tese apresentada ao departamento da Faculdade de Medicina Veterinária para obter o grau de mestre, orientada por Professora Doutora Ana Maria Duque de Araújo Munhoz, Lisboa.
- Lording, P. (2008). Erythrocytes. *Veterinary Clinic of Equine*, 225, 235.
- Lumsden, J. H., Rowe, R., Mullen, K. (1980). Hematology and biochemistry reference values for the light horse. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 44(1), 32-42.
- Mack, S. J., Kirkby, K., Malalana, F., & McGowan, C. M. (2014). Elevations in serum muscle enzyme activities in racehorses due to unaccustomed exercise and training. *Vet Record*, 174(6), 145.
- McKellar, Q., A., Bogan, J., A., von Fellenberg R., L., et al. (1991). Pharmacokinetic, biochemical and tolerance studies on carprofen in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 23(4), 280-284.

- McLellan, J. (2011). Does it matter which platelet-rich plasma we use?. *Equine Veterinary Education* 23, 101-104.
- Meyer, D. J. & Harvey, J. W. (1998). *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis* (2^a. ed.). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Meyer, D. J., & Walton, R. M. (2013). The Liver. In R., M. Walton, *Equine Clinical Pathology* (pp. 71-86). New York, USA: Wiley-Blackwell.
- Miglio, A., Falcimelli, E., Mezzasoma, A.M., Cappelli, R., Mecocci, S., Gresele, P., et al., (2021). Effect of first long-term training on whole blood count and blood clotting parameters in thoroughbreds. *Animals*, 447(11), 1-13.
- Monreal, L., Villatoro, A. J., Monreal, M., Espada, Y., Angles, A. M., & Ruiz-Gopegui, R. (1995). Comparison of the effects of low-molecular-weight and unfractionated heparin in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 1281-1285.
- Morris, D. D. (1998). Diseases of the hemolymphatic system. In: S., M Reed & W., M Bayly (Eds.), *Equine Internal Medicine* (pp. 558-601). WB Saunders Co.
- Muñoz, A., Riber, C., Trigo, P. & Castejón, F. (2012): Age- and gender-related variations in hematology, clinical biochemistry, and hormones in Spanish fillies and colts. *Research in Veterinary Science*, 93, 943–949.
- Muñoz, A., Riber, C., Trigo, P., et al. (2009). Hematopoietic neoplasias in horses: myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *Journal of Equine Science*, 20, 59–72.
- Muñoz, A., Santisteban, R., Rubio, M.D., Agüera, E.I., Escribano, B.M. & Castejón, F.M. (1998). Locomotor, cardiocirculatory and metabolic adaptations to training in Andalusian and Anglo-Arabian horses. *Research Veterinary Science*, 66, 25–31.
- Muñoz, A., Santisteban, R., Rubio, M.D., Riber, C., Agüera, E.I. & Castejón, F.M. (1999). Locomotor response to exercise in relation to plasma lactate accumulation and heart rate in Andalusian and Anglo Arabian horses. *Veterinary Research Communication*, 23,369–384.
- Murray, M. (1985). Hepatic lipidosis in a post parturient mare. *Equine Veterinary Journal*, 17, 68-69.
- Narayanan, S., & Appleton, H., D. (1980). Creatinine: a review. *Clinical Chemistry*, 26(8), 1119-1126.

- Násko, M., Domino, M., Jasinski, T., & WitkowskalPilaszewicz, O. (2021). The physical activity-dependent hematological and biochemical changes in school horses in comparison to blood profiles in endurance and race horses. *Animals*, 1128(11), 1-13.
- Navarrete, I., & Serrano F. J. (1999). Babesiosis. In M., C Campillo, F. A. R Vasquez, A. R. M Fernandez, M. C. S Acedo, S., H Rodriguez, I., N Lopez-Cozar, et al., *Parasitologia Veterinária* (pp. 587-592). Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España.
- OIE (2018). Equine Piroplasmosis. OIE Terrestrial Manual. Cap 3.5.8, 1310-1319.
- Overman, J. (2018). Red Blood Cells. In N., Pusterla & J., Higgins, *Interpretation of Equine Laboratory diagnostics* (1ª Ed., pp. 112-132). Hoboken, USA: Wiley-Blackwell.
- Parraga, M. E., Carlson, G. P., & Thurmond, M. (1995). Serum protein concentrations in horses with liver disease: a retrospective study and review of the literature. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9, 154-161.
- Pearson, E., G., Hedstrom, O., R., & Poppenga, R., H. (1994). Hepatic cirrhosis and hemochromatosis in three horses. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 204, 1053-1056.
- Poso, A. R., Essengustavsson, B., & Persson, S. G. B. (1993). Metabolic response to standardized exercise test in standard-bred trotters with red-cell hypervolemia. *Equine Veterinary Journal*, 25, 527–531.
- Pulugurtha, S. (2011). What is Creatine Kinase? Acedido em 19 de outubro, 2021 de <http://www.livestrong.com/article/431354-what-is-creatine-kinase/>.
- Pusterla, N. M., & Higgins, J. (2018). *Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics*. Hoboken: Wiley Blackwell.
- Qablan, M. A., Obornik, M., Petrželková, K. J., Sloboda, M., Shudiefat, M., Hořín, P., et al. (2013). Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: Epidemiology and genetic diversity. *Parasitology*, 140, 1096–1103.
- Reagan, W. J., Carter, C. & Turek, J. (1994). Eccentrocytosis in equine red maple leaf toxicosis. *Veterinary Clinical Pathology*, 23, 123-127.
- Reagan, W. J., Rovira, A. R. I., & DeNicola, D. B. (2019). *Veterinary Hematology: Atlas of Common Domestic and Non-Domestic Species* (3ª. ed.). Hoboken, USA: Willey-Blackwell.
- Rebar, A. H. (1998). *Hemogram Interpretation for Dogs and Cats*. St. Louis: Ralston Purina Co.

- Reed, S. M., Bayly, W. M., & Sellon, D. C. (2018). *Equine Internal Medicine* (4^a. ed.). Philadelphia: Saunders.
- Ricketts, S. W. (2006). The Beaufort Cottage Laboratories Guide to Equine Clinical Pathology. Newmarket, England: Rosedale & veterinary surgeons.
- Rikihisa, Y. (1991). The tribe Ehrlichiaee and Ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 286-380.
- Rodrigues, A., Figuera, R. A., Souza, T. M., Schild, A. L., Soares, M. P., Milano, J., et al. (2015). Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. *Pesquisa veterinaria Brasileira*, 25(4).
- Rose, R. J. & Allen, J. R. (1983). Hematologic responses to exercise and training. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 1(3), 461 – 477.
- Rose, R. J. & Hodgson, D. R. (1982). Haematological and plasma biochemical parameters in endurance horses during training. *Equine Veterinary Journal*, 14, 144–148.
- Rose, R. J., Allen, J. R., Hodgson, D. R., Stewart, J.H., Chan, W. (1993). Responses to submaximal treadmill exercise and training in the horse: Changes in haematology, arterial blood gas and acid base measurements, plasma biochemical values and heart rate. *Vet Records*, 113(26–27), 612–618.
- Ros-García A., M'ghirbi Y., Hurtado A., & Bouattour A. (2013). Prevalence and genetic diversity of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 3–37.
- Rothschild, M.A., Oratz, M., & Schreiber, S. S. (1988). Serum Albumin. *Hepatology*, 8(2), 385–401.
- Satué, K., Gardón, J.C., & Muñoz, A. (2017). Interpretation of Platelets in the horse. *Journal of Hematology Research*, 4, 19–25.
- Satué, K., Hernandez, A., & Muñoz, A. (2012). Physiological Factors in the Interpretation of Equine Hematological Profile. *Hematology – Science and Practice*. 1-26.
- Satué, K., Hernandez, A., Lorente, C., et al. (2009). Immunophenotypical characterization in Andalusian horse: variations with age and gender. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133, 219–227.
- Satué, K., Hernández, Á., Lorente, C., Fazio, E., Medica, P. (2020). Age- And Sex-Relating Modifications On Haematology In Spanish Purebred Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 93, 1–6.

- Schumacher, J., Edwards, J. F., & Cohen, N. (2000). Chronic idiopathic inflammatory bowel diseases of the horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14, 258–265.
- Schwint, O. N., Ueti, M.W., Palmer, G. H., Kappmeyer, L. S., Hines, M. T., Cordes, R. T. (2009). Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrobiological Agents Chemother.*, 53(10), 4327–4332.
- Sellon, D. C., Spoulding, K., Breuhaus, B. A., Katz, L., & Mealey, R. (2000). Hepatic abscesses in three horses. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 216, 882-887.
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2007). Resolution of neutrophil homeostasis. *Current Opinion Hematology*, 14, 3-8.
- Shin, E. K., Perryman, L. E., & Meek, K. (1997). A kinase - negative mutation of DNA - PKCS in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *Journal of Immunology*, 158, 3565 – 3569.
- Silva, H. I. S. B. (2011). Contribuição para o estudo do hemograma do cavalo puro sangue lusitano. Tese apresentada ao departamento da Faculdade de Medicina Veterinária para obter o grau de mestre, orientada por Dr. Paolo Bona Soares e Dra. Lara Armengou Ruiz, Lisboa.
- Silvestre-Ferreira, A.C., Cotovio, M., Maia, M., Queiroga, F., Pires, J., & Colaço, A. (2018). Reference intervals for haematological parameters in the Lusitano horse breed. *Acta Veterinária Hungarica*, 66(5), 530–541.
- Smith, B.P., VanMetre, D.C., & Pusterla, N. (2020). *Large Animal Internal Medicine*. (6ª Ed.). Missouri: Elsevier.
- Snow, D. H., & Harris, P. (1988). Enzymes as markers for the evaluation of physical fitness and training of racing horses. *Advances in Clinical Enzymology*, 6, 251–258.
- Snow, D. H., Gash, S. P., & Rice, D. (1987). Field observations on selenium status, whole blood glutathione peroxidase and plasma gamma-glutamyl transferase activities in Thoroughbred racehorses. In: J., R Gillespie, N., E Robinson (Eds.), *Equine Exercise Physiology 2* (pp. 494–505). Davis, CA: ICEEP Publications.
- Spickler, A. R. (2018). Equine Piroplasmosis. Acedido em 22/11/2021 em http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/equine_piroplasmosis.pdf.

- Steffey, E., P., Giri, S., N., Dunlop, C., I., et al. (1993). Biochemical and haematological changes following prolonged halothane anesthesia in horses. *Research in Veterinary Science*, 55(3), 338-345.
- Steffey, E., P., Woliner, M., J., & Dunlop, C. (1990). Effects of five hours of constant 1.2 MAC halothane in sternally recumbent, spontaneously breathing horses. *Equine Veterinary Journal*, 22, 433-436.
- Stockham, S. L. (1995). Interpretation of equine serum biochemical profile results. *Veterinary clinics of north america: equine practice*, 11(3), 391-414.
- Stockham, S. L., & Scott, M. A. (2002). *Leukocytes. Fundamentals of veterinary clinical pathology*. (1^a Ed., pp 49-83). Ames (IA): Iowa State Press.
- Stockham, S. L., Harvey, J. W. & Kinden, D. A. (1994). Equine glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Veterinary Pathology*, 31, 518-527.
- Stokol, T., Yeo, W. M., Burnett, D., DeAngelis, N., Huang, T., et al. (2015). Equid herpesvirus Type 1 Activates platelets. *PLoS One*, 23, 10(4).
- Sumbria, D., Singla, L. D., & Sharma, A. (2016). *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: A serological and molecular survey. *Tropical Animal Health Production*, 48, 45-52.
- Suter, S. E., Gouthro, T. A., O' Malley, T., et al. (2007). Marking of peripheral T - lymphocytes by retroviral transduction and transplantation of CD34+ cells in a canine x - linked severe combined immunodeficiency model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117, 183 - 196.
- Tang, L. J., Hosgood, G., Labruyère, J., Benet, S. L., Fitzgerald, L., Shiel, R. E. (2015). Marked cytorreduction of a lymphocyte-rich mediastinal thymoma with neoadjuvant chemotherapy in a cat. *Journal of FMS Open Reports*, 1(1).
- Tenter, A., M. & Freidhoff, K., T. (1986). Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Veterinary Parasitology*, 20, 49-61.
- Thomson, G., W., Wilson, R., W., Hall, E., A., et al. (1977). Tyzzer's disease in the foal: Case report and review. *Canadian Veterinary Journal*, 18(2), 41-43.
- Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W., DeNicola, D., Fettman, M. J., Lassen, E. D., et al., (2004). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins.
- Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W & Campbell, T. W. (2012). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2^a Ed.). Iowa State University Press: Wiley-Blackwell.

- Totsuka, M., Nakaji, S., Suzuki, K., Sugawara, K., & Sato, K. (2002). Break Point of Serum Creatine Kinase release after endurance exercise. *Journal of Applied Physiology*, 93, 1280–1286.
- Tvedten, H. (2010). Laboratory and clinical diagnosis of anemia In: D., J Weiss & K., J Wardrop (Eds), *Schalm's Veterinary Hematology* (6^a. ed., pp. 152-161). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Valberg, S., Haggendal, J. & Lindholm, A. (1993). Blood chemistry and skeletal muscle metabolic responses to exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Veterinary Journal*, 25(1), 17-22,
- Valberg, S., Jonsson, L. & Lindholm A, et al., (1993). Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Veterinary Journal*, 25(1)11-16.
- Vicente, A., Carolino, N., & Gama, L. (2011). Dispersão Mundial do Cavalo Lusitano e sua Demografia. FIPSL – 1º Congresso Internacional do Cavalo Lusitano.
- Waal, D. T. (1992). Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal*, 148, 6–14.
- Walton, R. M. (2014). *Equine Clinical Pathology*. Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Weiss, D. J. (1984). Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. *Veterinary Clinical Pathology*, 13, 27-31.
- Weiss, D. J., & Wardrop, K. J. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology* (6^a. Ed.). Ames (IA): Blackwell Publishing.
- Weiss, D. Y., Kristensen, A., Papenfuss, N., & McClay, C. B. (1990). Quantitative evaluation of echinocytes in the dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 19, 114-118.
- Weiss, O. J., & Lulich, J. (1999). Myelodysplastic syndrome with sideroblastic differentiation in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 28(2), 59-63.
- West, H., J. (1989). Evaluation of total bile acid concentrations for the diagnosis of hepatobiliary disease in horses. *Research Veterinary Science*, 46(2), 264-270.
- White, A., Estrada, M., Walker, K., Wisnia, P., Filgueira, G., Valdés, F., et al., (2001). Role of exercise and ascorbate on plasma anti-oxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comparative biochemistry and physiology Part A: Molecular and integrative physiology*, 128(1), 99-104.

- Wikander, Y.M., Knights, K., Coffee., C., Vernau, W., Biller, D.S., Higginbotham, M.L., et al. (2020). CD4 and CD8 double-negative immunophenotype g thymoma-associated lymphocytes in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 918–922.
- Wilkie, J.S.N, Yager, J.A., Nation, P.N., Clark, E.G., Townsend, H.G., Baird, J. D. (1985). Chronic eosinophilic dermatitis: a manifestation of a multisystemic eosinophilia, epitheliotropic disease in five horses. *Veterinary Pathology*, 22(4), 297–305.
- Willard, M. D. & Tvedten, H. (2004). *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (4^a. ed.). St Louis (MO): Saunders.
- Ybañez, A. P., Ybañez, R. H. D., Talle, M. G., Arreglo, R. M. T., Geens, M. J. C., Villas J.G.I., et al. (2018). Serological and molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Philippine horses. *Ticks Tick-Borne Disease*, 9, 1125–1128.
- Zaugg, J. L. (2002). Babesiosis. In B., P Smith, *Large Animal Internal Medicine* (pp. 1051-1055). St. Louis, Missouri, USA: Mosby Inc.