

**Universidade Federal da Bahia  
Escola de Medicina Veterinária  
Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos**

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E E  
SELÊNIO SOBRE O HEMOGRAMA, ATIVIDADE DE ENZIMAS MARCADORAS  
DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM  
CAVALOS DE HIPISMO CLÁSSICO SUBMETIDOS À PROVA DE SALTOS**

**DOMINGOS CACHINEIRO RODRIGUES DIAS**

**SALVADOR - BAHIA  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DOMINGOS CACHINEIRO RODRIGUES DIAS**

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E E  
SELÊNIO SOBRE O HEMOGRAMA, ATIVIDADE DE ENZIMAS MARCADORAS  
DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM  
CAVALOS DE HIPISMO CLÁSSICO SUBMETIDOS À PROVA DE SALTOS**

Dissertação apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos, na Área de Hematologia e Bioquímica Veterinária.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Consuelo Caribé Ayres**

**Co-orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El - Bachá**

**Salvador  
2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA EMEV – UFBA

D 541 Dias, Domingos Cachineiro Rodrigues

Influência do exercício e da suplementação com vitamina E e selênio sobre o hemograma, atividade de enzimas marcadoras de lesão muscular e índice de peroxidação de biomoléculas em cavalos de hipismo clássico submetidos à prova de saltos. / Domingos Cachineiro Rodrigues Dias. – 2008.

101 f.

Orientador: Maria Consuêlo Caribé Ayres  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária, 2008.

1. Cavalos. 2. Vitamina E. 3. Hematologia. 4. Bioquímica clínica.  
5. Estresse oxidativo. I. Ayres, Maria Consuêlo Caribé. II. UFBA/MEV.  
III. Título.

CDD 6363.1

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E E  
SELÊNIO SOBRE O HEMOGRAMA, ATIVIDADE DE ENZIMAS MARCADORAS  
DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM  
CAVALOS DE HIPISMO CLÁSSICO SUBMETIDOS À PROVA DE SALTOS**

**DOMINGOS CACHINEIRO RODRIGUES DIAS**

Dissertação defendida e aprovada para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Salvador, 31 de março de 2008.

Comissão Examinadora:

---

Profa. Dra. Maria Consuêlo Caribé Ayres – UFBA  
Orientadora

---

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves - UNESP

---

Prof. Dr. Alberto Lopes Gusmão - UFBA

Esta dissertação é dedicada a minha querida avó Aldina Pereira Rodrigues Coelho (*in memoriam*), exemplo de vida, caráter, luta e perseverança. E ao meu muito amado filho Pedro Domingos, motivo dos meus mais sinceros sorrisos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Jesus Cristo, Pai da Vida e da Verdade, por ser a fonte de força e luz em todos os momentos da caminhada.

À minha companheira Marlene por ser o alicerce fundamental de nossa família, pela sua acolhida no início da nossa estrada, e principalmente por ter gerado Pedro, minha alegria maior. Também por tantas vezes ter escolhido dar prioridade aos meus projetos em detrimento dos seus.

Aos meus pais, irmãs, sobrinhos, afilhados, compadres e amigos do Rio de Janeiro por serem para sempre a base da minha história.

À Profa. Dra. Maria Consuêlo Caribé Ayres, minha Orientadora, por ter acreditado nesse projeto, pelos conselhos, dedicação, exemplo, amizade e principalmente, pela sua perseverança.

Ao grande Prof. Dr. Ramon El-Bachá. Muito obrigado pela disponibilidade e fidelidade ao ofício de ser Professor ao partilhar de forma tão natural todo o seu vasto conhecimento. Também à equipe do LabNq – ICS - UFBA.

Obrigado à Bahia, terra que me acolheu tão bem, e a todos os amigos que fiz desde que aqui cheguei. Especialmente ao grande irmão Lívio Fontes. Sem a sua ajuda eu não teria conseguido. E também ao colega-irmão Fabiano Mello.

Ao Centro Hípico Vanguarda e aos proprietários dos cavalos que gentilmente atenderam meu apelo e cederam seus animais para a realização desse experimento. Agradeço também aos cavaleiros, amazonas e tratadores que se mobilizaram para tornar viável esse trabalho.

À Escola de Medicina Veterinária da UFBA, especialmente na pessoa da Profa. Ana Elisa pelo incentivo inicial. Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro. Também à empresa Vetnil, na pessoa da médica veterinária Karen Rebouças, pelo apoio.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses dos Animais (LDPA) que foi fundamental para a realização desse trabalho. Aos colegas, professores e pessoal da secretaria do Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos. Especialmente à Juliana da Silva Rocha e aos colegas Sheyla Magali de Souza Gama, Bruno Bastos, José Pinheiro e Rui, além dos estagiários e outros colaboradores. Muito obrigado.

E, finalmente, aos Cavalos. Inspiração e razão da minha dedicação. Que Criaturas de Deus maravilhosas vocês são!

A todos vocês a minha mais sincera gratidão.

“Devia ter amado mais, ter chorado mais. Ter visto o sol nascer. Devia ter arriscado mais e até errado mais. Ter feito o que eu queria fazer. Queria ter aceitado as pessoas como elas são. Cada um sabe a alegria e a dor que traz no coração. Devia ter complicado menos, trabalhado menos. Ter visto o sol se pôr. Devia ter me importado menos com problemas pequenos. Ter morrido de amor. Queria ter aceitado a vida como ela é. A cada um cabe alegrias e a tristeza que vier. O acaso vai me proteger enquanto eu andar distraído. O acaso vai me proteger...” (Titãs).

## ÍNDICE

	página
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMO .....	xv
<i>SUMMARY</i> .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 Hematologia e fisiologia do exercício .....	5
2.1.1 Influência do exercício sobre os constituintes sanguíneos .....	6
2.2 Marcadores bioquímicos de lesão muscular (Creatinina quinase, Aspartato aminotransferase e Lactato desidrogenase) .....	13
2.2.1 Influência do exercício sobre a atividade das enzimas Creatina quinase, Aspartato aminotransferase e Lactato desidrogenase .....	16
2.3 Estresse oxidativo e o exercício .....	19
2.3.1 Influência do estresse oxidativo sobre os constituintes sanguíneos .....	22
2.3.2 Malondialdeído (MDA) como marcador de estresse oxidativo .....	23
2.4 Influência da utilização de antioxidantes em eqüinos atletas .....	26
2.5 Importância da vitamina E e selênio na dieta de eqüinos .....	33
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	36
3.1 ARTIGO 1- INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO SOBRE O HEMOGRAMA, ENZIMAS MARCADORAS DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, EM EQÜINOS SUBMETIDOS À ATIVIDADE DE SALTO .....	36
3.2 ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E E SELÊNIO, COMO AGENTE ANTIOXIDANTE, SOBRE O QUADRO HEMATOLÓGICO, ENZIMAS MARCADORAS DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, EM EQÜINOS SUBMETIDOS À ATIVIDADE DE SALTO .....	62
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	86
5. REFERÊNCIAS .....	88

## LISTA DE TABELAS

página

TABELA 1- Valores de referência dos parâmetros do hemograma de eqüinos, segundo alguns autores .....	8
TABELA 2 - Valores de referência das atividades sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato amino transferase (AST) de eqüinos segundo alguns autores .....	18
TABELA 3 - Valores de média e desvios padrão da atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK), aspartato amino transferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) em diferentes grupos de eqüinos segundo SILVA et al.(2007) .....	19
TABELA 4 - Dados sobre os constituintes do eritrograma, das proteínas totais e concentração sérica de fibrinogênio (Fb) em <i>g/dL</i> , obtidos de eqüinos submetidos à prova de Hipismo Clássico da raça Brasileiro de Hipismo, antes e nos diferentes tempos pós-exercício .....	44
TABELA 5 - Dados sobre os constituintes do leucograma de eqüinos da raça Brasileiro de Hipismo, antes e nos diferentes tempos pós-exercício de Hipismo Clássico, distribuídos segundo os valores absolutos ( <i>células x 10<sup>3</sup>/μL</i> ) e relativos (%) .....	45
TABELA 6 - Dados sobre a atividade das enzimas Creatina Quinase (CK), Aspartato Aminotransferase (AST), Lactato Desidrogenase (LDH) em <i>UI/L</i> e dos níveis de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em membrana de hemácias, expressos em <i>nM/mg de proteína</i> , de eqüinos da raça Brasileiro de Hipismo, antes e nos diferentes tempos pós exercício de Hipismo Clássico .....	46
TABELA 7 - Estudo de correlação entre os níveis de TBARS em membranas de hemácias e outros parâmetros analisados nos diferentes momentos .....	47
TABELA 8 - Dados sobre a concentração sérica de vitamina E ( <i>μmol/L</i> ) de eqüinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e após o período de suplementação .....	69
TABELA 9 - Dados sobre o número de hemácias (He) ( <i>x10<sup>6</sup>/μL</i> ), volume globular (VG) (%), e hemoglobina ( <i>g/dL</i> ) obtidos de eqüinos submetidos à prova de Hipismo Clássico da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício. ....	70

TABELA 10: Dados sobre as proteínas plasmáticas totais (PPT) ( <i>g/dL</i> ), fibrinogênio ( <i>mg/dL</i> ), volume globular médio (VGM) ( <i>fL</i> ), hemoglobina globular média (HGM) ( <i>pg</i> ) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) (%) obtidos de equinos submetidos à prova de Hipismo Clássico da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício .....	71
TABELA 11- Dados sobre os constituintes do leucograma de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício de Hipismo Clássico, distribuídos segundo os valores absolutos ( <i>células x 10<sup>3</sup>/μL</i> ) .....	72
TABELA 12 - Dados sobre os constituintes do leucograma de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício de Hipismo Clássico, distribuídos segundo os valores relativos (%) .....	73
TABELA 13 - Dados sobre a atividade das enzimas Creatina Quinase (CK), Aspartato Aminotransferase (AST), Lactato Desidrogenase (LDH) em <i>UI/L</i> e dos níveis de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em membrana de hemácias, expressos em <i>nM/mg de proteína</i> , de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós exercício de Hipismo Clássico .....	74

## LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1 - Peroxidação lipídica e formação de MDA em membranas celulares (SJÖDIN, 1990) .....	24
FIGURA 2 - Representação química do MDA (ZWART et al., 1999) .....	24
FIGURA 3 - Demonstração gráfica da dinâmica do número de hemácias (He) ( <i>células x10<sup>6</sup>/μl</i> ), do volume globular (VG) (%), da concentração de hemoglobina (Hb) ( <i>g/dL</i> ), das proteínas plasmáticas totais (PPT) ( <i>g/dL</i> ), do fibrinogênio (Fb) ( <i>mg/dL</i> ) e do número total de leucócitos (LT) ( <i>células x10<sup>3</sup>/μl</i> ), (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente, nos diferentes momentos.....	48
FIGURA 4 - Demonstração gráfica da dinâmica das atividades séricas de CK ( <i>UI/L</i> ), AST ( <i>UI/L</i> ), LDH ( <i>UI/L</i> ) e dos níveis de TBARS em membranas de hemácias ( <i>nM/mg de proteína</i> ), (A), (B), (C) e (D), respectivamente, nos diferentes momentos .....	49
FIGURA 5 - Demonstração da correlação entre a hemoglobina ( <i>g/dL</i> ) e o nível de TBARS ( <i>nM/mg de proteína</i> ) em membrana de hemácias no T <sub>0</sub> e no T <sub>6</sub> , e entre a contagem diferencial de neutrófilos segmentados (%) e o nível de TBARS ( <i>nM/mg de proteína</i> ) em membrana de hemácias no T <sub>0</sub> e no T <sub>6</sub> (A), (B), (C) e (D), respectivamente. ....	50
FIGURA 6 - Demonstração da correlação entre a atividade sérica da AST ( <i>UI/L</i> ) e o nível TBARS ( <i>nM/mg de proteína</i> ) na membrana de hemácias no T <sub>R</sub> , T <sub>0</sub> e no T <sub>6</sub> , e entre a atividade sérica de CK e os níveis de TBARS ( <i>nM/mg de proteína</i> ) na membrana de hemácias no T <sub>6</sub> .....	51
FIGURA 7 - Demonstração gráfica da dinâmica do número de hemácias (He) ( <i>células x10<sup>6</sup>/μl</i> ), do volume globular (VG) (%), da concentração de hemoglobina (Hb) ( <i>g/dL</i> ), das proteínas plasmáticas totais (PPT) ( <i>g/dL</i> ), do fibrinogênio (Fb) ( <i>mg/dL</i> ) e dos leucócitos totais (LT) ( <i>células x10<sup>3</sup>/μL</i> ), no Grupo Controle (GC) e Grupo Teste (GT), nos diferentes momentos. (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente .....	75
FIGURA 8 - Demonstração gráfica da dinâmica da atividade sérica de CK ( <i>UI/L</i> ), AST ( <i>UI/L</i> ), LDH ( <i>UI/L</i> ) e dos níveis de TBARS em membranas eritrocitárias ( <i>nM/mg de proteína</i> ), no Grupo Controle (GC) e Grupo Teste (GT), nos diferentes momentos. (A), (B), (C) e (D), respectivamente .....	76

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADP – Adenosina Difosfato  
ATP – Adenosina Trifosfato  
AST - Aspartato Aminotransferase  
BSA – Albumina Sérica Bovina  
°C – Graus Celsius  
CBH - Confederação Brasileira de Hipismo  
CHGM - Concentração de Hemoglobina Globular Média  
CK – Creatina Quinase  
cm - centímetros  
CPK - Creatinafosfoquinase  
dL - Decilitro  
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio  
fL – Fentolitro  
g – gramas  
G - gravidade  
GGT - Gama Glutamil Transferase  
GPX - Glutathione Peroxidase  
GSH - Glutathione Reduzida  
GSSG - Glutathione Oxidada  
HGM - Hemoglobina Globular Média  
He – Hemácias  
Hb – Hemoglobina  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
Ht – Hematócrito  
Kg - Quilograma  
Km – Quilômetro  
L - Linfócito  
LDH - Lactato Desidrogenase  
MDA - Malondialdeído  
mg – Miligramas  
mm - milímetros  
ml – Mililitro  
nM – Nano Molar  
nmol – Nano Mol  
n-3 - Ácido Graxo Ômega 3  
O<sub>2</sub> – Oxigênio Molecular  
NRC - National Research Council  
P – Páginas  
pg - Picogramas  
PPT - Proteínas Plasmáticas Totais  
PV – Peso Vivo  
PSI – Puro Sangue Inglês  
RDW - Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos  
SOD - Superóxido Dismutase  
T – Tempo  
TBA – Ácido Tiobarbitúrico  
TBARS - Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico  
TCA – Ácido Tricloroacético

UI - Unidade Internacional  
UI/L - Unidades Internacionais por Litro  
VG - Volume Globular  
VGM - Volume Globular Médio  
XO – Xantina Oxidase

**DIAS, D. C. R. INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E E SELÊNIO SOBRE O HEMOGRAMA, ATIVIDADE DE ENZIMAS MARCADORAS DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM CAVALOS DE HIPISMO CLÁSSICO SUBMETIDOS À PROVA DE SALTOS.** Salvador, Bahia, 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2008.

## **RESUMO**

A atividade de hipismo clássico é considerada extenuante para cavalos atletas, e entre os mecanismos fisiopatológicos estão incriminados o aparecimento de lesões musculares, que podem causar alterações dos constituintes sangüíneos e, conseqüentemente, instalação de processos oxidativos. Como prevenção e tratamento de tais condições, suplementos contendo agentes oxidantes tem sido utilizados, e entre eles destaca-se a vitamina E (tocoferol). O objetivo desse trabalho foi determinar a influência do exercício, bem como o efeito da suplementação oral a base de vitamina E e selênio, como antioxidantes sobre o hemograma, as proteínas plasmáticas totais (PPT), o fibrinogênio (Fb), a atividade de enzimas envolvidas com lesões musculares (CK, AST e LDH), como também marcadores de estresse oxidativo, avaliado através da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em membrana de hemácias de cavalos. Para atingir os objetivos propostos foram realizados dois experimentos, onde, inicialmente, 20 cavalos da raça Brasileiro de Hipismo, treinados para a modalidade de salto (categoria de 1,00 metro de altura com tempo de aquecimento, número de obstáculos e grau de dificuldade padronizados) e mantidos em clube hípico foram submetidos a uma prova de hipismo tendo sido colhidas amostras de sangue, nos momentos: antes do exercício ( $T_R$ ), imediatamente após ( $T_0$ ), e 6 ( $T_6$ ), 12 ( $T_{12}$ ) e 24 horas ( $T_{24}$ ) após a realização da prova hípica. Posteriormente esses animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, onde em um dos grupos 10 equinos foram suplementados via oral por 45 dias com vitamina E e selênio na concentração de 2500 mg de Vitamina E e 300 mg de selênio (GT) e outro foi mantido como controle (GC), e foram então novamente submetidos ao exercício, seguindo-se o mesmo protocolo para o esforço e a colheita de material. Em ambos os experimentos o exercício influenciou sobre os constituintes sangüíneos. No primeiro caracterizou-se

pelo aumento significativo após a realização da prova: do número de hemácias, do volume globular, da concentração de hemoglobina, do número total de leucócitos, marcado pelo aumento de neutrófilos e de linfócitos, das PPT e dos linfócios. A atividade de CK e AST, além da concentração de TBARS também apresentaram valores estatisticamente superiores após o exercício, e todos os constituintes sanguíneos retornaram aos valores basais entre o T<sub>12</sub> e o T<sub>24</sub>. No segundo experimento os animais do GT retornaram aos valores basais da fase de repouso de alguns parâmetros, tais como o número de hemácias, a concentração de hemoglobina, o número total de leucócitos, e as PPT, de forma mais precoce que os animais do GC. No entanto o retorno aos valores do repouso dos dois grupos para a atividade de CK e o TBARS ocorreu no período de 24 horas. A atividade de salto induziu ao estresse oxidativo, e a suplementação com vitamina E e selênio apresentou influência sobre o eritrograma, no entanto não influenciou sobre os indicadores de avaliação de estresse oxidativo, nos cavalos da raça Brasileiro de Hipismo, criados no Estado da Bahia.

Palavras-chave: Cavalos. Vitamina E. Hematologia. Bioquímica clínica. Estresse oxidativo.

**DIAS, D. C. R. EFFECTS OF THE EXERCISE, AND ORAL VITAMIN E AND SELENIUM SUPPLEMENTATION ON HEMATOLOGIC VALUES, SERIC ACTIVITY OF MUSCULAR ENZYMES, AND PEROXIDATION OF BIOMOLECULES IN ERYTHROCYTES OF SHOW JUMPING HORSES.**

Salvador, Bahia, 2008. 101 p. Dissertation (Master of Science in Tropical Animal Science) – School of Veterinary Medicine, Federal University of Bahia, 2008.

**SUMMARY**

The physical exercise is one of the main causes of injuries in horses. Injuries related with hematological alterations and the development of oxidative stress are important, because they might be involved in the pathology of diseases that lead to the loss of athletical performance and other deleterious conditions. Vitamin E and selenium are the most common substances used in equine athletes to prevent the injuries related with oxidative stress. Show jumping is considered an exhaustive activity for athletic horses. The objective of this research was to determine the influence of this kind of exercise in hematological parameters, the serum activity of enzymes related with muscular injuries (CK, AST and LDH) and the concentration of an oxidative stress marker (TBARS) in horse erythrocyte membranes. For these purposes, 20 trained horses had been submitted to a show jumping field test. Blood samples were collected immediately before ( $T_R$ ), immediately after ( $T_0$ ), 6 ( $T_6$ ), 12 ( $T_{12}$ ) and 24 hours ( $T_{24}$ ) after the ending of the exercise. Later, these animals had been divided in two groups, one (GT) supplemented orally per 45 days with vitamin E (2500 mg/day) and selenium (300 mg/day) and another one (GC) was kept as control. After this period they were submitted to the same exercise described above. In both experiments, the exercise led to a significant increase of some analyzed parameters as the activity of CK and AST, the number of erythrocytes, the globular volume, total hemoglobin, total leucocytes, differential counting of neutrophils and lymphocytes. TBARS concentration demonstrated the development of oxidative stress. In general terms, the parameters returned to basal values between  $T_{12}$  and  $T_{24}$ . The basal concentration of vitamin E in the GT was higher than the same value for GC in the rest moment. Moreover, the values for seric vitamin E in GT after the supplementation period were higher than the same values before this period. The supplementation had significant effect in the moment of return to the basal values of total erythrocytes, total leucocytes and total plasmatic proteins. In GT these parameters returned fast to rest

values in comparison with GC. This fact can demonstrate beneficial effects on the erythrocytic, lymphocytic, and plasmatic volume distribution dynamics. The supplementation did not determine significant differences between the groups in the biochemical parameters behavior, demonstrating that the supplementation did not exert preventive effect on the sprouting of oxidative stress and activity of muscular enzymes.

**Key words:** Horses. Vitamin E. Selenium. Hematology, Clinical biochemistry, Oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos o interesse pelo estudo da fisiologia do exercício dos eqüinos aumentou significativamente em todas as partes do mundo. Este interesse foi, inicialmente, gerado pelo papel do cavalo na agricultura e intensificado pela larga utilização dos eqüinos no lazer e no esporte (HODGSON e ROSE, 1994).

As exigências por níveis extremos de desempenho atlético crescem a cada dia, devido, principalmente, à cultura do esporte atrelada à valorização econômica de animais de alto desempenho esportivo. Para alcançar tal desempenho os trabalhos físicos e técnicos aos quais os cavalos atletas são submetidos estão cada vez mais intensificados. Como conseqüência dessa intensa rotina de treinamentos e competições, esses animais eqüinos estão sujeitos ao aparecimento de lesões relacionadas à sua utilização nas diversas modalidades do esporte, tais como: enduro, corrida, o hipismo clássico, dentre outras. Tais lesões são responsáveis pela retirada desses animais das competições, gerando assim comprometimento do desempenho atlético, desvalorização monetária dos animais, entre outros prejuízos.

As principais lesões associadas ao aproveitamento atlético de eqüinos estão relacionadas aos tratos cardíaco-respiratório e músculo-esquelético, sendo que uma grande variedade de entidades clínicas pode afetar a saúde e a atuação desses animais, tornando necessária a utilização de marcadores clínicos-laboratoriais na prevenção e no tratamento de tais lesões.

Os processos de obtenção, transporte e utilização da energia pelo músculo em trabalho são as bases da resposta fisiológica ao exercício. Diversas alterações na constituição e distribuição sangüínea, com a finalidade específica de aumento do aporte de oxigênio aos músculos esquelético e cardíaco, para sustentação do aumento do metabolismo e facilitação na retirada e excreção dos metabólicos, ocorrem como conseqüências diretas do esforço físico (GARCIA et al., 1999). Dessa forma, as alterações dos constituintes sangüíneos induzidas pela atividade física são parâmetros importantes na avaliação do estado clínico, do desempenho e da recuperação de cavalos atletas (HODGSON e ROSE, 1994).

Ultimamente têm-se dado muita atenção às lesões relacionadas com o metabolismo oxidativo, já que o processo de produção de radicais livres tem sido incriminado na fisiopatologia de diversas enfermidades dos equinos, principalmente dos cavalos atletas. As lesões oxidativas podem ocorrer quando há excesso de produção de radicais livres e/ou quando os sistemas antioxidantes celulares se tornam ineficazes no controle e eliminação dessas substâncias (SILVEIRA, 2005) Esse desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa gerada pelos antioxidantes é conhecida como estresse oxidativo (URSO e CLARKSON, 2003).

A membrana das células é uma camada lipídica dupla na forma de um mosaico líquido com receptores e proteínas de transporte e, a propriedade de fluidez da membrana está relacionada com ácidos graxos poliinsaturados e a viabilidade da célula com esta flexibilidade. Os radicais livres reagem com os lipídios das membranas celulares induzindo a lipoperoxidação, causando perda da fluidez da membrana e aumento da permeabilidade com liberação das proteínas e enzimas lisossomais do citoplasma, no espaço extracelular lesionando os tecidos (SJÖDIN et al., 1990).

Uma vez que a atividade física gera aumento no consumo de oxigênio molecular com conseqüente aumento da produção de radicais livres (KINUNNEN et al., 2005a), o exercício tem sido associado ao aparecimento e desenvolvimento de enfermidades de cavalos atletas relacionadas ao estresse oxidativo. Dentre essas enfermidades destacam-se a obstrução recorrente das vias aéreas, hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, laminite, doença do neurônio motor, artrites (MOFFARTS et al, 2005a), enfermidades reprodutivas (STRADAIOLI e MAGISTRINI, 2002), além de miopatias e hemólise (CHIARADIA et al., 1998).

A peroxidação de biomoléculas, principalmente a peroxidação de lipídeos, resultante do ataque de radicais livres oriundos do estresse oxidativo, pode ser indiretamente mensurada pelos níveis séricos de Malondialdeído (MDA) na forma de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), uma vez que esta é uma das moléculas geradas durante as reações entre as Espécies Reativas de Oxigênio e as biomoléculas presentes nos tecidos orgânicos (PORTER, 1984; DEATON e MARLIN, 2003). A determinação do malondialdeído, como um produto final da lipoperoxidação, é uma das metodologias que permitem a estimativa da lesão celular causada pelo estresse oxidativo

(DURFINOVÁ et al., 2007) Este marcador bioquímico tem sido utilizado largamente no estudo do metabolismo oxidativo, especialmente em trabalhos ligados à medicina esportiva, tanto em humanos (VÁZQUEZ, 2002) quanto em cavalos atletas (CHIARADIA et al., 1998, WHITE et al., 2001).

A relação entre o estresse oxidativo e as alterações hematológicas oriundas do exercício e conseqüentes injúrias nos componentes sangüíneos, têm sido alvo de estudo devido à sua importância no desenvolvimento de patologias que geram comprometimento da higidez e do desempenho atlético em humanos (McBRITE et al., 1998; SENTÜRK et al., 2005) e de eqüinos (CHIARADIA et al., 1998; WHITE et al., 2001; KINUNEN et al., 2005a).

Segundo Harris e Mayhew (1998) entre as lesões relacionadas com a atividade física e o estresse oxidativo estão aquelas que envolvem o tecido muscular esquelético, e a utilização de marcadores da lesão muscular, tais como as enzimas, creatina quinase (CK), aspartato amino transferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH). Estas enzimas têm sido largamente utilizadas como marcadores das lesões musculares em vários experimentos relacionados com a medicina esportiva em cavalos (ART et al., 1990; LEKEUX et al., 1991; GÓMEZ et al., 2004).

A Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é o principal antioxidante do sistema não-enzimático. O envolvimento desta substância na prevenção das lesões relacionadas ao metabolismo oxidativo vem sendo estudado. Da mesma forma o Selênio, um dos principais micronutrientes, tem importância nas defesas antioxidantes enzimáticas, pois é constituinte do sistema Glutathione Oxidase / Redutase, um importante sistema enzimático envolvido com o equilíbrio do metabolismo oxidativo (PETTERSON et al., 1991).

A vitamina E reduz os efeitos da lipoperoxidação sobre as estruturas celulares, capturando os radicais livres e diminuindo os peróxidos lipídicos que são tóxicos e destroem os eritrócitos, neutrófilos e macrófagos. O exercício está associado ao estresse oxidativo e nestes casos pode-se observar o aumento no consumo de vitamina E (SILVEIRA, 2005).

O rebanho equino do Brasil é constituído de aproximadamente seis milhões de cabeças, sendo que 1,4 milhões deste total encontram-se na região nordeste. A Bahia possui a maior população de cavalos desta região, com aproximadamente 600 mil cabeças (IBGE, 2003), e a eqüinocultura, atualmente, representa uma importante atividade sócio-econômica neste estado. Desses animais, cerca de duas centenas estão ligadas a atividades do Hipismo Clássico praticada nas entidades hípicas da região metropolitana de Salvador (Fonte: Federação Hípica da Bahia).

O objetivo desta pesquisa foi estudar a influência do exercício e da suplementação com vitamina E e selênio, como antioxidante, sobre o quadro hematológico, a atividade de enzimas marcadoras de lesão muscular (Aspartato aminotransferase - AST, Creatinaquinase - CK e Lactato desidrogenase - LDH) e a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como marcador bioquímico de estresse oxidativo, em membranas de eritrócitos de cavalos atletas, mantidos na Região Metropolitana de Salvador – BA, submetidos à prova de Hipismo Clássico, na modalidade salto, sob condições naturais de competição.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Hematologia e fisiologia do exercício.**

A fisiologia das hemácias dos eqüinos apresenta algumas especificidades quando comparadas à de outras espécies de mamíferos com relação à resposta eritropoiética. Nesta espécie, as hemácias são liberadas na corrente sanguínea somente na sua forma madura, sendo que a reticulocitose (presença de hemácias imaturas na circulação) e a policromasia (alteração na coloração das hemácias) é extremamente rara em condições de homeostase e anemias moderadas, e somente com a utilização de técnicas especiais foram detectadas nas anemias severas (JAIN, 1993).

A vida de um eritrócito eqüino dura em torno de 120 a 150 dias, sendo então removido pelo sistema retículoendotelial (CARLSON, 1987). Além disso, como em outras espécies, no cavalo o baço atua como um grande reservatório de eritrócitos durante o repouso, sendo que essa reserva pode ser mobilizada para a circulação ativa quando as necessidades por transporte de oxigênio aumentam. Esse fenômeno é mediado por uma contração esplênica induzida por adrenérgicos e ocorrem em casos de hemorragias, excitação e exercícios (PERSSON, 1983).

Segundo Baskurt e Meiselman (1999), os eritrócitos de cavalos possuem tendência para se agregarem, possivelmente devido à grande deformidade e essa propriedade leva à separação das células do plasma em poucos minutos. É também comum a formação de células crenadas, além de outros mecanismos como a desidratação mediada por perdas de eletrólitos, onde a lesão oxidativa pode estar incriminada. Dessa forma, as amostras sanguíneas dessa espécie devem ser bem homogeneizadas para a realização de exames (JAIN, 1993).

A importância da hematologia como meio semiológico é reconhecida mundialmente, não somente para o estudo dos valores de referência de animais sadios, como também para avaliar alterações fisiológicas determinadas por fatores de variabilidade tais como: raça, idade, sexo, influências ambientais e alterações decorrentes da utilização dos animais, e no caso do eqüino, principalmente para o esporte (DOMINGUES JÚNIOR et al., 2004).

Os valores de referência dos parâmetros hematológicos em cavalos é um assunto controverso. Valores de referência são aqueles observados em um indivíduo, ou grupo de indivíduos, num determinado estado de saúde. Vários fatores podem influenciar os valores sanguíneos normais, ou de referência, nas várias espécies. Diferenças nesses valores também podem ser determinadas por excitação, atividade muscular, tempo de colheita, temperatura ambiente, hidratação, altitude local, variação sazonal e diurna, além de práticas de contenção (LUMSDEN et al., 1980).

Hodgson e Rose (1994) reportaram os valores de referências do hemograma de cavalos adultos, obtidos por alguns autores, os quais estão apresentados na Tabela 1. As diferenças encontradas foram influenciadas principalmente pelo fator racial e o estado de condicionamento físico. Jain (1993) apresentou os valores de referência para cavalos, classificando-os segundo as raças em “sangue frio” e “sangue quente”, sendo que para esta última classificação observou maiores valores para os parâmetros do eritrograma e menor relação neutrófilos/linfócitos. Em cavalos de corrida e naqueles que praticam enduro, os valores dos componentes do eritrograma, bem como do número total de leucócitos apresentam diferenças, sendo estas atribuídas ao volume plasmático. Portanto o hemograma de amostras colhidas durante o repouso é utilizado para a detecção de anormalidades que não são perceptíveis no exame clínico (HODGSON e ROSE, 1994).

### **2.1.1 Influência do exercício sobre os constituintes sanguíneos**

Alguns estudos tentaram correlacionar o desempenho atlético com os resultados do hemograma de repouso. Desta forma, Hodgson e Rose (1994) reportaram a influência significativa dos valores hematológicos sobre o desempenho de cavalos de corrida, onde animais com valores inferiores aos de referência apresentaram menor desempenho em pista.

Blackmore (1983), ao estudar a relação entre as concentrações de componentes hematológicos e bioquímicos do sangue com a atuação de cavalos de corrida no treinamento e durante as provas, observou uma aparente relação entre a concentração sérica de sódio, juntamente com o número de eritrócitos durante o repouso, e o desempenho atlético. O autor afirmou que uma avaliação isolada não é suficiente para

demonstrar o potencial de um animal individualmente e indicou a realização de hemogramas a cada sete ou 15 dias em cavalos submetidos a treinamento intenso.

Um dos fatores limitantes para o condicionamento atlético é a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue. Essa característica é otimizada pelo aumento total da massa eritrocitária, havendo uma relação bem definida entre o estado atlético e o volume total de eritrócitos em humanos e eqüinos, sendo que o treinamento físico gera adaptações para o aumento da demanda metabólica em vários aspectos (PERSSON, 1983; HODGSON e ROSE, 1994). O treinamento físico aumenta o volume sanguíneo total e eleva a concentração de hemoglobina, além de outros parâmetros hematológicos (JAIN, 1993).

Desde a década de 1920 é reportada a observação de que o número de hemácias circulantes em cavalos de corrida é superior aos animais que não se exercitam. Outros constituintes hematológicos como o número de leucócitos, o volume globular e a taxa de hemoglobina, nos animais de corrida se mostraram significativamente maiores do que em outras raças (DOMINGUES JÚNIOR et al., 2004).

Art et al. (1990), avaliando a influência do exercício sobre os constituintes sanguíneos em cavalos de salto observaram aumento do VG e das PPT após a realização do exercício. Os autores afirmaram que este achado foi menor do que o encontrado em outras modalidades de exercício máximo, sendo esse fato explicado pela incompleta contração esplênica associada à menor atividade simpática. Resultados semelhantes foram também obtidos por Lekeux et al. (1991).

**Tabela 1.** Valores de referência do hemograma de eqüinos, segundo alguns autores.

Parâmetros do hemograma	Jain (1986)	Hodgson e Rose (1994)	Kramer (2000)
Eritrócitos Totais ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8,41 $\pm$ 1,20	7,0 – 11,0	6,8 – 12,9
Volume Globular (%)	39,3 $\pm$ 5,00	32 - 46	32 - 53
Hemoglobina (g/dL)	13,8 $\pm$ 2,1	11,0 – 17,0	11,0 – 19,0
VGM (fL)	46,9 $\pm$ 1,9	42,0 – 47,0	37,0 – 58,0
HGM (pg)	16,04 $\pm$ 0,9	14,0 – 17,0	10,0 – 20,0
CHGM (g/dL)	34,9 $\pm$ 1,0	33,0 – 38,0	31,0 – 36,0
Leucócitos Totais (/ $\mu\text{L}$ )	9500 $\pm$ 2300	6000 – 11000	5400 - 14300
Neutrófilos Segmentados	4700 $\pm$ 1500	2500 – 6500	2260 - 8580
Linfócitos	4000 $\pm$ 1300	2000 – 5000	1500 - 7700
Monócitos	421 $\pm$ 151	200 - 800	0 - 1000
Eosinófilos	266 $\pm$ 113	100 – 400	0 - 1000
Basófilos	67 $\pm$ 63	0 – 300	0 - 290
Leucócitos (%)			
Neutrófilos Segmentados	49,3 $\pm$ 7,2	-	22 - 72
Linfócitos	41,19 $\pm$ 7,2	-	17 – 68
Monócitos	4,7 $\pm$ 1,8	-	0 – 14
Eosinófilos	3,2 $\pm$ 1,6	-	0 - 10
Basófilos	0,7 $\pm$ 0,7	-	0 - 14
Proteínas Totais (g/dL)	7,00 $\pm$ 0,4	-	5,8 – 8,7
Fibringênio (mg/dL)	200 $\pm$ 100	< 400	100 - 400

Em estudo utilizando cavalos de salto, o treinamento produziu adaptações fisiológicas traduzidas por diminuição da frequência cardíaca e respiratória, além de aumento do volume globular e da concentração de hemoglobina pós-exercício, após um período de 60 dias de prática dessa atividade. Por outro lado, as proteínas plasmáticas não aumentaram significativamente após o exercício durante todo o período do treinamento (GÓMEZ et al., 2004.) Esses autores consideraram a hipótese de que o treinamento pode gerar um estímulo hematopoiético como resposta adaptativa para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio. Entretanto, Garcia et al.(1999) avaliando o treinamento tradicional de cavalos Criolo Chileno, demonstraram um aumento significativo nos valores do volume globular, concentração de hemoglobina e proteínas plasmáticas totais, pós-exercício.

O hemograma realizado após o exercício pode ajudar na interpretação do hemograma de repouso, uma vez que o exercício causa alterações no volume globular, principalmente devido à liberação de eritrócitos do baço na circulação, sendo o número de células liberadas relacionado com o aumento da atividade simpática que é proporcional a velocidade, intensidade e duração do exercício (SNOW, 1983), como também pela influência direta da população eritrocitária a as concentrações de catecolaminas (HODGSON e ROSE, 1994). Carlson (1987) considera que o volume globular, a contagem total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina aumentam entre um e dois minutos após o início do exercício, no entanto essa resposta é diferente entre exercícios intensos, de curta duração e o enduro. Há ainda um aumento concomitante das proteínas plasmáticas totais, o que reflete alterações do volume do plasma.

A reserva esplênica é significativa uma vez que o baço pode conter até 50% do volume total de células vermelhas, sendo que a mobilização dessa reserva de eritrócitos gera uma “autotransfusão” que exerce um papel importante no aumento da capacidade de carreamento do oxigênio para satisfazer a demanda ocasionada pelo exercício (CARLSON, 1987). Estudos demonstraram que cavalos esplenectomizados tiveram diminuição da capacidade atlética e que o baço atua como uma reserva cardiovascular para a manutenção do preenchimento ventricular em situações de frequência cardíaca alta (HODGSON e ROSE, 1994).

Utilizando o exercício com velocidade constante e diferentes graus de inclinação de esteira ergométrica, Smith et al.(1989) observaram aumento significativo pós-exercício do volume globular, contagem total de eritrócitos, hemoglobina total, PPT, contagem total de leucócitos e contagem de linfócitos.

Com relação aos índices hematimétricos, o volume globular médio (VGM), a hemoglobina globular média (HGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) não parecem ser afetados pelo exercício (DOMINGUES JÚNIOR et al., 2004). Hodgson e Rose (1994) afirmaram que o exercício pode levar a pequenas diminuições do volume globular médio e aumento da hemoglobina globular média.

Aliada ao eritrograma, o leucograma de cavalos atletas em repouso recebeu ênfase na avaliação do condicionamento físico, especialmente a relação neutrófilos/linfócitos. Uma relação neutrófilo:linfócito de 1,5:1 (60% de neutrófilos para 40% de linfócitos) foi considerada ideal, sendo indicada a utilização da relação neutrófilo/linfócito do hemograma de repouso como marcador hematológico de excesso de treinamento, uma vez que alterações nessa relação são ligadas à liberação de cortisol devido ao estresse físico (HODGSON e ROSE, 1994).

Korhonen et al.(2000) afirmaram que em cavalos treinados, a relação entre neutrófilos e linfócitos pode ser um indicador sensível de estresse de curta duração, sendo que uma baixa relação entre os valores dessas células sanguíneas pode ser indicativa de adaptação ao exercício.

Por outro lado, de acordo com Hodgson e Rose (1994), o treinamento de cavalos para enduro não determina alterações na proporção de neutrófilos, linfócitos e monócitos e as alterações leucocitárias indicam pouco sobre o estado de condicionamento físico, uma vez que proporção das alterações leucocitárias está associada com a intensidade e duração do exercício, assim como ao grau de estresse ao qual o animal está sujeito. A contagem total de leucócitos pode aumentar de 10 a 30%, não sendo esse aumento tão expressivo como nos parâmetros eritrocitários.

Leucocitose moderada é induzida pelo exercício intenso, e na maioria das espécies o exercício leva a uma “leucocitose fisiológica” pelo aumento na circulação da população marginal de neutrófilos produzindo uma marcante neutrofilia. No cavalo a leucocitose associada ao exercício se deve ao aumento dos linfócitos e contagem variável de neutrófilos (CARLSON, 1987).

O exercício submáximo e de longa duração produz leucocitose com neutrofilia e linfopenia devido ao aumento plasmático de cortisol, podendo haver desde um grande aumento na relação neutrófilo/linfócito, até o aparecimento de neutrófilos jovens na circulação devido a condições máximas de estresse em provas árduas de enduro, sendo que essas alterações podem perdurar por mais de 48 horas. Por outro lado, o exercício máximo de curta duração determina um influxo leucocitário oriundo da reserva esplênica que determina uma leucocitose moderada e diminuição da relação neutrófilo/linfócito. Isso ocorre porque a mobilização de leucócitos é mascarada pelo aumento concomitante da mobilização eritrocitária (SNOW, 1983). Essas alterações são transitórias, durando cerca de algumas horas. A seguir o número de linfócitos volta a baixar determinando assim o aumento da relação neutrófilo/leucócito coincidindo com o aumento do cortisol pós-exercício (HODGSON e ROSE, 1994).

Durante o exercício físico extenuante o número de leucócitos circulantes aumenta de forma substancial. Ocasionalmente, esse aumento ocorre em duas fases, com um aumento instantâneo do número tanto de neutrófilos e linfócitos, seguido por outro momento de leucocitose tardia que pode durar por algumas horas, quando o número de neutrófilos aumenta e o número de linfócitos cai. Acredita-se que o primeiro pico é devido à demarginação de neutrófilos aderidos ao endotélio induzida pela ação de catecolaminas, sendo a segunda fase oriunda da mobilização de neutrófilos maduros da medula óssea induzida pelo cortisol (KORHONEN et al., 2000).

Korhonen et al.(2000) ao submeter cavalos a duas corridas distintas com intervalo de três dias, observaram leucocitose e aumento da relação neutrófilo:linfócitos, além de aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no sangue ao término das duas provas. Essa leucocitose foi devido a uma neutrofilia que perdurou por seis horas. Os autores afirmaram que em cavalos treinados, a relação entre neutrófilos e linfócitos pode ser um indicador sensível de estresse de curta duração, sendo que uma baixa

relação entre os valores dessas células sanguíneas pode ser indicativa de adaptação ao exercício.

A avaliação dos níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT) deve ser realizada juntamente com os índices eritrocitários e leucocitários, uma vez que este parâmetro serve como informação adicional na interpretação do hemograma através da sua comparação com o volume globular, auxiliando assim no diagnóstico diferencial de condições como a desidratação, contração esplênica (especialmente em eqüinos), policitemias, entre outras (MEYER et al., 1995). Juntamente com o aumento do volume globular, há o aumento das proteínas plasmáticas totais, o que reflete influxo de proteínas e alteração na distribuição do volume plasmático, através da saída de líquidos para o espaço extravascular como resposta ao exercício, colaborando assim para a hemoconcentração (CARLSON, 1987).

Em cavalos de corrida, não foram determinadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos associadas com o desempenho destes animais como uma resposta ao exercício durante o treinamento (REVINGTON, 1983; TYLER-MCGOWAN et al., 1999).

Segundo Garcia et al. (1999), a avaliação dos constituintes sanguíneos permite determinar as modificações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem como resposta ao exercício e ao treinamento ao qual os cavalos são submetidos. Os autores reafirmaram que a frequência cardíaca, a concentração de lactato sanguíneo, o volume total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina podem ser indicadores confiáveis para avaliar a aptidão física e o nível de treinamento de um cavalo.

## **2.2 Marcadores bioquímicos de lesão muscular (Creatinina quinase, Aspartato aminotransferase e Lactato desidrogenase).**

O maior desafio ao se destinar um cavalo para a vida atlética é mantê-lo livre de lesões (HODGSON e ROSE, 1994), sendo que em cavalos utilizados para corrida a causa mais comum de maus resultados em provas é a injúria músculo-esquelética, estando esse fato relacionado com a queda do desempenho muscular (KINNUNEN et al., 2005a).

Dentre as principais estratégias para a detecção e acompanhamento clínico de lesões musculares, destaca-se a avaliação da atividade de enzimas marcadoras de injúria muscular no soro ou no plasma. Uma mudança na atividade dessas enzimas no plasma pode ocorrer por várias razões, incluindo-se alterações na permeabilidade da membrana celular, necrose celular, bloqueio ou diminuição na excreção da enzima, aumento da síntese, assim como diminuição da sua produção. Na maioria das situações não há diminuição na taxa de eliminação de tais substâncias, ocorrendo, porém, o aumento do influxo para o plasma que causa alterações detectáveis. Essas alterações oriundas de uma lesão parcial ou completa na célula, ou devido a aumentos transitórios na permeabilidade da membrana celular, comumente, ocorrem devido a defeitos na integridade da membrana que contém a enzima, sendo que na maioria delas podem ser detectadas em maiores concentrações no sangue e nos variados tipos de injúrias musculares são enzimas sarcoplasmáticas. A intensificação da função celular, que pode ocorrer durante o exercício ou como resposta a lesões, pode levar ao aumento da permeabilidade da membrana celular. Por isso, na maioria das vezes é difícil distinguir entre aumento de atividade por problemas patológicos de um aumento fisiológico, na atividade dessas enzimas (HARRIS e MAYHEW, 1998).

As enzimas mais comumente utilizadas para indicação de dano muscular são: Aspartato aminotransferase (AST), Creatinaquinase (CK) e Lactato desidrogenase (LDH), embora esta última seja menos específica para avaliação de alterações do tecido muscular (HODGSON e ROSE, 1994).

A Creatinafosfoquinase (CPK), também conhecida como Creatinaquinase (CK), é a enzima mais sensível para indicação de lesão muscular (KANEKO et al., 1997). Essa enzima catalisa a fosforilação da adenosina difosfato (ADP) do fosfato de creatina,

tornando a adenosina trifosfato (ATP) disponível para a contração muscular (SILVA, et al., 2007). As mudanças séricas da CK ocorrem mais rapidamente do que as da AST, onde o aumento pode durar por semanas em caso de doença muscular ou exercício, enquanto que os níveis de CK podem diminuir em cerca de seis a 48 horas (HODGSON e ROSE, 1994). No cavalo, a CK é encontrada predominantemente no músculo esquelético, no miocárdio e no cérebro. Como não há uma troca significativa dessa enzima entre o fluido cerebrospinal e o sangue, os aumentos significativos na atividade plasmática total da CK se devem à injúria muscular esquelética ou cardíaca (HARRIS e MAYHEW, 1998).

A magnitude do aumento da CK sérica é considerada como um marcador quantitativo da lesão muscular, reversível ou irreversível, causada pelo exercício ou ainda pela injeção intramuscular, uma vez que o aumento nos níveis séricos da CK é diretamente proporcional à injúria muscular. Essa enzima não entra na corrente sanguínea diretamente após ser liberada da célula muscular, sendo transportada pela linfa via líquido intersticial (KANeko et al., 1997).

A Aspartato amino transferase (AST), que catalisa a transaminação de L-aspartato e alfa-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, é encontrada em quase todos os tecidos, logo, a atividade sérica de AST não é específica para nenhum tecido, mas o músculo e o fígado podem ser considerados as maiores fontes (SILVA, et al., 2007). A razão entre a AST citoplasmática e mitocondrial no soro de cavalos é significativamente maior do que a encontrada em outras espécies, sendo que no equino parece não haver especificidade de isoformas dessa enzima por diferentes tecidos (HARRIS e MAYHEW, 1998).

A LDH catalisa a reação reversível de L-lactato para piruvato em todos os tecidos. Esta enzima está presente em grandes quantidades na musculatura esquelética, mas o aumento da atividade sérica desta enzima não é específico para lesão muscular (SILVA et al., 2007). Essa enzima é formada por um conjunto de peptídeos que geram cinco isoenzimas, e assim como a AST, é encontrada na maioria dos tecidos, não sendo específica para nenhum deles. Entretanto, diferentes tecidos contêm concentrações variadas de isoenzimas de LDH, o que permite a separação por eletroforese para a caracterização de cada tecido e identificação de lesões, sendo que o treinamento físico

pode afetar a proporção de isoenzimas de LDH na musculatura esquelética (HARRIS e MAYHEW, 1998).

Embora a CK seja mais específica como indicativo de necrose muscular do que a AST, a determinação simultânea de AST e CK em eqüinos representa valioso potencial diagnóstico e prognóstico, em razão das diferentes taxas de retorno a níveis basais de suas atividades no soro ou no plasma. O aumento da atividade sérica da CK indica se a necrose muscular é ativa ou se ocorreu recentemente; o persistente aumento de CK indica que a necrose muscular continua ativa. A CK tem meia-vida de menos de 24 horas, enquanto a AST tem meia-vida de sete a oito dias (SILVA et al, 2007).

Valores elevados nas atividades de CK e AST indicam lesões musculares, pois têm sido observados em enfermidades como a rbdomiólise (HODGSON e ROSE, 1994). Várias miopatias estão associadas ao esforço físico, assim como as miosities provocadas pelo decúbito prolongado são importantes nos eqüinos, estando esta última relacionada com a necrose tecidual por isquemia e também ao processo de isquemia/reperfusão e conseqüente produção de EROs. Além disso, estudos demonstraram aumento significativo da atividade da CK, AST e LDH em cavalos submetidos à orquiectomia em decúbito (LEAL et al., 2006).

O aumento fisiológico da atividade da CK após o exercício com envolvimento da mudança na permeabilidade da membrana, possivelmente ocorre em razão da hipóxia, além de outros fatores. A hipóxia pode ocorrer durante exercícios leves em animais mal condicionados, sendo então esperada elevação mais significativa na atividade dessa enzima em relação a um animal bem condicionado fisicamente. Apesar de ser uma afirmativa controversa, é possível que a magnitude do aumento da atividade das enzimas musculares diminua com o treinamento. A atividade da AST pode estar aumentada no início de um programa de condicionamento físico e tende a diminuir com o progresso do treinamento (HARRIS e MAYHEW, 1998).

Silva et al.(2007) reportaram que um programa de treinamento adequado, devidamente ajustado ao condicionamento físico do eqüino, não leva ao aumento acentuado da atividade das enzimas de função muscular.

### **2.2.1 Influência do exercício sobre a atividade das enzimas Creatinaquinase, Aspartato aminotransferase e Lactato desidrogenase**

Anderson (1975) submeteu um grupo de cavalos a exercícios com intensidade controlada e verificou uma elevação na atividade da LDH e CK pós-exercício, mas que retornaram aos valores basais em 72 horas. Essa ocorrência foi reduzindo com a repetição das seções de exercício, especialmente no que se referiu à ação da CK.

Em cavalos de hipismo, Art et al. (1990) investigaram algumas respostas fisiológicas em cavalos durante uma prova de saltos, observando aumentos significativos na atividade da CK, AST e LDH. Os autores afirmaram que, apesar da atividade de hipismo ser realizado sob condições de baixa duração e velocidade, esse tipo de exercício representa grande esforço, que requer do metabolismo anaeróbico um treinamento específico.

Do mesmo modo, Lekeux et al.(1991) estudando os efeitos do exercício em concurso de saltos (hipismo clássico) sobre a resposta de marcadores bioquímicos de lesão músculo-esquelética, observaram aumentos significativos nas atividades de CK, AST e LDH após o exercício, em comparação aos valores obtidos em repouso.

Entretanto, em cavalos submetidos a um programa de treinamento que não incluiu sessões de salto, não foram observadas alterações significativas da AST pós-exercício, havendo, porém, aumento significativo da CK no início do período de treinamento, sendo que após esse período não foi mais detectada essa alteração (GÓMEZ et al., 2004). Fato semelhante foi obtido na pesquisa realizada por Toledo et al. (2001) que não observaram aumentos significativos da atividade da AST e LDH em cavalos Puro Sangue Inglês de corrida, submetidos a exercícios leves (passo), moderados (trote) e intensos (galope). Garcia et al. (1999) não observaram aumento significativo na atividade das enzimas CK, AST e LDH em cavalos da raça Criolo Chileno submetidos a exercícios.

O aumento na atividade das enzimas musculares em resposta ao exercício pode ser utilizado como índice da aptidão atlética dos animais, onde aqueles menos fisicamente condicionados, ou inaptos athleticamente, deveriam apresentar maiores incrementos na

atividade dessas enzimas em relação àqueles que apresentam melhor condição física (GARCIA et al., 1999). Do mesmo modo, Gómez et al.(2004) observaram que a adaptação ao exercício pode ser medida de acordo com o dano muscular que os cavalos sofrem após realizar um determinado exercício.

Harris e Mayhew (1998) afirmaram que não é possível determinar se cavalo pode apresentar melhor desempenho atlético se possuem menor atividade das enzimas musculares, e propuseram um teste de resposta ao exercício submáximo para cavalos utilizando a atividade da CK e AST como critérios de avaliação. Assim estabeleceram para a atividade da CK em repouso valores entre zero e 49 UI/L, e para AST valores entre 150 e 230 UI/L. Nesse teste são considerados normais no período pós-exercício, aumentos que perdurem entre 2 a 4 horas, não superiores ao dobro do valor de repouso para CK, com retorno aos níveis basais em 24 horas, e aumento de no máximo 50% do valor basal de AST sem sinais clínicos de rigidez muscular. Os valores de referência para a atividade plasmática ou sérica das enzimas CK e AST em eqüinos estão demonstrados na tabela 2.

Silva et al.(2007) estudaram a atividade da CK, AST e LDH em cavalos destinados a três tipos de atividade: atletas, tração e reprodução, mantidos na região nordeste do Brasil. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 3. As diferenças encontradas foram atribuídas a adaptações bioquímicas na musculatura, promovidas pelos diferentes graus de condicionamento físico em cada tipo de atividade. Dessa forma, os autores concluíram que os valores de função bioquímica muscular nos eqüinos variaram segundo o tipo de atividade física à qual eram submetidos, e que por isso deve-se levar em consideração o nível de atividade que o animal esteja submetido para melhor interpretação dos resultados das atividades séricas de CK e AST.

**Tabela 2.** Valores de referência das atividades sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato amino transferase (AST) de eqüinos, segundo alguns autores.

Autores	Raça	CK (UI/L)	AST (UI/L)
Anderson (1975)	PSI	42 - 170	231 – 358
Lumsden et al.(1980)	PSI	38,7 ± 40	217 ± 140
Hodgson e Rose (1994)	N.D.R	100 - 300	150 – 400
Fernandes (1994)	Árabe	84,3 ± 20,8	132 ± 8,8
Kaneko et al.(1997)	N.D.R	2,4 – 23,4	226 – 366
Harris e Mayhew (1998)	N.D.R	0 – 49	150 – 230
		103 – 467	120 – 309
		(vida livre)	(vida livre)
Franciscato et al.(2006)	Crioula	77 – 311	99 – 382
		(em treinamento)	(em treinamento)

**Tabela 3.** Valores de média e desvios padrão da atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK), aspartato amino transferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) em diferentes grupos de eqüinos, segundo SILVA et al.(2007).

Grupo	CK (UI/L)	LDH (UI/L)	AST (UI/L)
Atletas (n = 20)	80, 2 <sup>a</sup> ± 10,7	102,5 ± 30,00	56,8 <sup>a</sup> ± 20,9
Reprodução (n = 20)	83,9 <sup>a</sup> ± 13,9	98,6 ± 34,4	33,0 <sup>b</sup> ± 13,01
Tração (n = 18)	94,4 <sup>b</sup> ± 16,0	112,8 ± 32,3	50,1 <sup>a</sup> ± 19,2

Em colunas, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p > 0,05$ ; teste Duncan).

### 2.3 Estresse oxidativo e o exercício.

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é o aceptor universal de elétrons que possibilitou aos organismos aeróbicos utilizarem a energia contida nos nutrientes. Mesmo sendo vantajosa em termos energéticos, a utilização do oxigênio molecular no processo de respiração aeróbica leva à produção de compostos nocivos aos sistemas biológicos denominados radicais livres (JI, 1999).

A maioria dos radicais livres é extremamente reativa, altamente tóxica e capaz de reagir com diversas moléculas orgânicas como lipídeos, proteínas, além de ácidos nucleicos (JIMÉNEZ et al., 2005).

Cerca de 5 % do oxigênio utilizado pelas células são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Esses compostos muitas vezes são de extrema utilidade para a homeostase do organismo (JI, 1999).

Entre as principais EROs produzidas neste processo estão o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), que é altamente reativo. Este último radical é especialmente nocivo, pois não há contra ele sistemas enzimáticos capazes de neutralizá-lo (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

O principal sistema de defesa antioxidante biológico é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (ARAÚJO et al., 2006). Já o sistema não-enzimático de defesas antioxidantes inclui compostos sintetizados pelo próprio organismo, além de substâncias oriundas da dieta regular ou suplementação alimentar, sendo que a vitamina E é considerada como o antioxidante dietético principal na quebra da reação em cadeia lipooxidativa (DEATON e MARLIN, 2003).

As EROs normalmente não representam problema no organismo em repouso uma vez que o sistema de defesa antioxidante está a postos para neutralizar a sua produção (WILLIAMS, 2004). Porém, quaisquer condições que levem ao aumento da produção de radicais livres, ou à diminuição das defesas antioxidantes, podem gerar uma condição denominada estresse oxidativo, que é definido por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os sistemas de defesa antioxidantes. (JIMÉNEZ et al., 2005). Algumas enfermidades de eqüinos são associadas ao estresse oxidativo, incluindo as miopatias e hemólise (CHIARADIA et al., 1998).

Segundo Araújo et al. (2006) o exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante. Durante o exercício físico ocorrem várias reações que levam à formação das EROs.

Os mecanismos pelas quais as lesões musculares oriundas do exercício ocorrem são pouco elucidadas, apesar de vários trabalhos sugerirem que o aumento da produção de radicais livres possui um papel importante nesse processo (McARDLE et al., 2002; KINNUNEN et al., 2005a). Segundo Avellini et al. (1995), o aumento do metabolismo do oxigênio leva à formação de radicais livres derivados do oxigênio, sendo que a patogênese das miopatias induzidas pelo exercício em eqüinos pode estar relacionada a alterações na peroxidação lipídica causada pelos radicais livres.

De acordo com Mills et al.(1997), a musculatura esquelética é particularmente sensível à injúria oxidativa devida à alta exposição ao oxigênio e a alta proporção de ácidos graxos insaturados em suas bio-membranas, podendo esse processo ser responsável pelo aumento de CK e AST comumente utilizados como meio diagnóstico de lesão muscular após exercícios intensos.

McBride e Kraemer (1999) observaram uma correlação positiva entre a atividade plasmática da AST e CK com várias mensurações do estado antioxidante, especialmente os hidroperóxidos lipídicos. Esses autores afirmaram que esse fato é consistente com a hipótese de que os radicais livres produzidos durante o exercício alteram a permeabilidade da membrana das células musculares.

McArdle et al. (2002) afirmaram que o músculo esquelético é capaz de modificar a taxa respiratória rapidamente durante o exercício e sendo assim, a produção de EROs aumenta consideravelmente quando o fluxo de oxigênio através da mitocôndria está aumentado.

A atividade de hipismo (concurso de saltos), apesar da relativa baixa velocidade, é bastante extenuante. O metabolismo anaeróbico contribui significativamente para a demanda energética, sendo que a resposta fisiológica a esse tipo de exercício reflete o esforço intenso necessário para a execução de saltos a cada cinco segundos aproximadamente (CLAYTON, 1994).

Lekeux et al.(1991) ao estudarem a resposta fisiológica ao exercício de saltos em cavalos, consideraram que a atividade de hipismo apesar de ser realizada em baixas velocidades e ter duração curta, requer energia não somente gerada por processos oxidativos, mas também pelo metabolismo anaeróbico.

Urso e Clarkson (2003) consideraram a importância da elevação moderada na produção de radicais livres oriundos do exercício, como processo fundamental para a adaptação e condicionamento da musculatura durante o treinamento, pois os radicais livres podem agir como sinalizadores para essa adaptação.

Do mesmo modo, Kinnunen et al.(2005a) afirmaram que o exercício crônico de intensidade moderada altera positivamente a homeostase oxidativa de células aumentando a resistência ao estresse oxidativo, uma vez que há adaptações na capacidade antioxidante que protegem as células dos efeitos deletérios do estresse oxidativo.

### **2.3.1 Influência do estresse oxidativo sobre os constituintes sanguíneos**

Os eritrócitos são locais comuns e abundantes para a geração e reação de radicais livres e grandes suprimentos de oxigênio, sendo preenchidos por resíduos de hemoglobina com atividade redox (IGLESIAS e CATALÁ, 2005).

Em 2001, Sentürk et al., afirmaram que o aumento da temperatura corporal, a desidratação, a hemoconcentração e o trauma mecânico, aliados à maior produção de EROs são eventos relacionados com a hemólise durante o exercício.

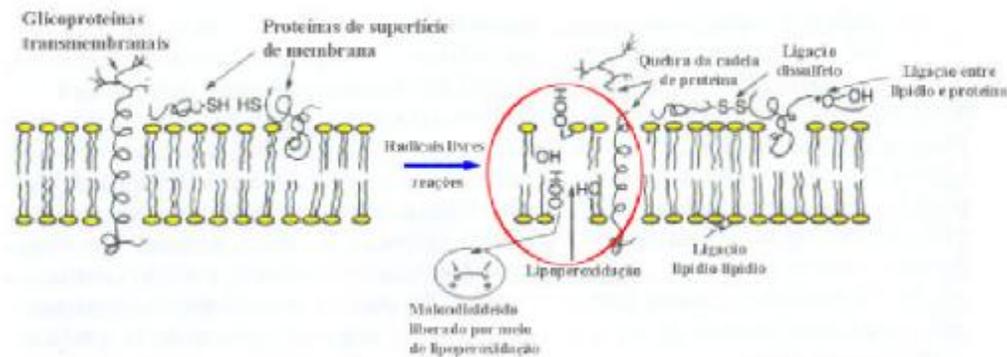
Sentürk et al.(2005) consideraram os efeitos imediatos que o exercício físico intenso produzem sobre as variáveis hematológicas e propriedades físicas dos eritrócitos em humanos, incluindo o aumento do volume globular, da contagem total de eritrócitos e leucócitos, aumento da proporção de granulócitos, além de alterações na viscosidade sanguínea, na composição plasmática e nas propriedades mecânicas dos eritrócitos, caracterizadas por perda de fluidez do sangue e interferências na microcirculação sanguínea. Essas alterações hemodinâmicas relacionadas com o exercício podem ser deletérias para a perfusão de alguns órgãos gerando assim lesões teciduais, sendo que esses eventos podem estar relacionados com a mortalidade durante o exercício. Os autores sugeriram que efeitos benéficos da suplementação com antioxidantes sobre essas lesões podem incriminar os processos oxidativos, uma vez que há uma relação entre o aparecimento de tais lesões induzidas pelo exercício e o desenvolvimento de estresse oxidativo, que foi reportado como causa de deterioração mecânica dos eritrócitos. Nesse mesmo trabalho, os autores afirmaram que o exercício aeróbico exaustivo foi capaz de induzir uma resposta semelhante à inflamatória como indicado pelo aumento da contagem de leucócitos e da porcentagem de granulócitos. Além disso, foi demonstrado o aumento da peroxidação lipídica nos eritrócitos de indivíduos treinados e sedentários, que ocorreu após a resposta leucocitária estabelecendo assim uma relação causal entre esses processos, sendo que as alterações na deformidade dos eritrócitos acompanharam as alterações leucocitárias. O estresse oxidativo que ocasionou as alterações mecânicas sobre os eritrócitos pode ter sido induzido pela ativação de neutrófilos adjacentes e a suplementação multi-vitamínica foi capaz de prevenir alterações mecânicas, assim como a peroxidação lipídica, nos eritrócitos, mensurada pelos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

### **2.3.2 Malondialdeído (MDA) como marcador de estresse oxidativo**

A presença abundante de membranas fosfolipídicas nos locais onde as EROs são geradas, transformam essas estruturas em alvos endógenos e rapidamente afetados pelos radicais livres, especialmente os ácidos graxos poliinsaturados (ZWART et al., 1999).

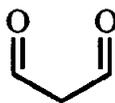
A peroxidação lipídica é um processo em cadeia, complexo, onde lipídeos insaturados reagem com o oxigênio molecular gerando hidroperóxidos lipídicos. Sob condições que envolvem amostras biológicas, os lipídios são degradados em vários produtos incluindo alcanos, alcenos, hidroxialcenos, cetonas, entre outros (SLATER, 1984). A identificação e mensuração desses compostos são importantes como índices de peroxidação lipídica (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990). Um dos resultados dessa reação é a produção de malondialdeído (MDA) em tecidos submetidos à peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados dentro das membranas fosfolipídicas (SJÖDIN et al., 1990).

A deformidade das membranas celulares está relacionada com a integridade dos ácidos graxos poliinsaturados e a viabilidade da célula com a flexibilidade dessa membrana. As EROs ao reagirem com os lipídios das membranas celulares causam perda da fluidez da membrana e aumento da permeabilidade com liberação das proteínas e enzimas lisossomais do citoplasma no espaço extracelular lesionando os tecidos. Os compostos formados podem se decompor em numerosos produtos aldeídos de diferentes comprimentos de cadeias, reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 1) (SJÖDIN et al., 1990).



**Figura 1:** Peroxidação lipídica e formação de MDA em membranas celulares (SJÖDIN, 1990)

A avaliação bioquímica do estresse oxidativo normalmente é realizada utilizando-se marcadores indiretos (MOFFARTS et al., 2007). O MDA é o aldeído individualmente mais abundante resultante da peroxidação lipídica, sendo que sua determinação pela reação do TBA é uma das metodologias mais comuns para o estudo da peroxidação lipídica (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990). A figura 2 mostra a representação química do MDA (ZWART et al., 1999).



**MDA**

**Figura 2:** Representação química do MDA (ZWART et al., 1999)

Na sua forma livre o MDA pode ser mensurado por absorvânsiometria ultravioleta, polarografia ou por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (BIRD e DRAPER, 1984). Porém, a análise do MDA através do teste do TBA é o padrão para o estudo da peroxidação lipídica e utilizado por autores em testes de campo (PORTER, 1984), sendo já usada em estudos na espécie equina (CHIARADIA et al., 1998; WHITE et al., 2001; DEATON et al., 2002; MARLIN et al., 2002).

Neste teste uma molécula de MDA reage com duas de TBA com a produção de um pigmento róseo que possui absorvância máxima num comprimento de onda entre 532 –

535 nm. Essa reação deve ser realizada em um pH entre 2 – 3 e a 90 – 100°C durante 10 a 15 minutos. Após o resfriamento a absorbância é aferida e a concentração do MDA é calculada (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990).

Segundo Esterbauer e Cheeseman (1990), o MDA participa de reações com outras moléculas além do TBA. Além disso, o teste do TBA não é específico para o MDA, pois uma grande variedade de substâncias, tais como açúcares e aminoácidos oxidados, sob condições apropriadas também forma pigmentos róseos em meio aquecido ao reagir com o TBA. Uma vez que o teste do TBA é intrinsecamente inespecífico para o MDA, (JANERO, 1990), o índice de peroxidação lipídica deve ser expresso como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ZWART et al., 1999).

A quantidade de TBARS formados deve ser calculada através da absorbância em comprimento de onda de 532 nm, usando-se o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  sendo expressa em nmol de TBARS/mg de proteína, utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão (MIURA et al., 1998).

A metodologia tradicional empregada para detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é realizada por meio da mensuração espectrofotométrica da absorbância ou ainda a fluorescência. Mais atualmente a metodologia utiliza o aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com maior precisão e sensibilidade na separação dos componentes aldeídos, obtendo-se o MDA livre (DRAPER et al., 1993).

Durfinová et al.(2007) realizaram comparação entre o teste espectrofotométrico do TBA e o HPLC para análise do conteúdo do MDA utilizando como amostra um homogeneizado de tecido cerebral de ratos. O conteúdo de TBARS determinados espectrofotometricamente assim como as de complexo TBA-MDA estimado por HPLC foram similares. Os autores não encontraram diferença significativa entre o conteúdo de TBARS e suas quantidades deduzidas através da análise do complexo MDA-TBA por HPLC. Os resultados sugerem que os produtos da lipoperoxidação podem ser determinados sem interferência pelo teste do TBA.

## 2.4 Influência da utilização de antioxidantes em equinos atletas

Apesar de haver grandes evidências de que os cavalos atletas estão expostos a alterações no balanço oxidativo e dessa forma a suplementação com antioxidantes ser frequentemente recomendada, não é bem conhecido em que situações há uma real necessidade por antioxidantes levando-se em conta o nível de condicionamento físico, a raça, sexo e idade desses animais (KIRSCHVINK et al., 2006).

Métodos artificiais que objetivam a redução das lesões oxidativas durante o exercício incluem a administração de fontes exógenas de antioxidantes naturais, tal como a vitamina E (JIMÉNEZ et al., 2005).

Em 1992, Singh et al., propuseram a utilização de sais inorgânicos de manganês como drogas antioxidantes em cavalos, uma vez que esses compostos mostram ter atividade similar à enzima superóxido-dismutase (SOD).

O alopurinol, um análogo estrutural da hipoxantina e potente inibidor da xantina desidrogenase e da xantina oxigenase (XO), e tem sido administrado em cavalos com o intuito de se determinar a contribuição da atividade da XO na formação de EROs durante o exercício intenso. Os autores concluíram que a inibição da XO pelo alopurinol levou à diminuição da produção das EROs durante o exercício e, conseqüentemente, do estresse oxidativo (MILLS et al., 1997).

A suplementação com a L-carnitina, também foi estudada em animais de raças trotadoras submetidos a um protocolo de exercícios e os resultados demonstraram sua influência sobre a concentração de metabólitos de EROs e atividade da SOD, levando à redução do estresse oxidativo nos animais suplementados (TROMBETTA e FALASCHINI, 2003).

Em um experimento realizado, um grupo de equinos suplementados com vitamina E e outro com restrição desta vitamina, a concentração de TBARS na musculatura, não apresentou alteração após a realização do exercício entre os grupos experimentais. Este estudo demonstrou que cavalos podem tolerar baixos níveis de vitamina E e que os

níveis plasmáticos dessa substância não refletem os teores na musculatura (PETERSSON et al., 1991).

Siciliano et al. (1997) investigaram os efeitos da suplementação com vitamina E sobre os marcadores da integridade muscular em cavalos submetidos ao exercício, distribuindo-os em três grupos: sem suplementação, suplementados com 80 UI/kg (grupo 80) e suplementados com 300 UI/kg (grupo 300) de vitamina E. Todos os animais foram submetidos a um teste de exercício submáximo ao final do período de 90 dias de suplementação e foi demonstrado que a concentração de  $\alpha$ -tocoferol dos animais não suplementados caíram de forma significativa. No grupo suplementado com 300 UI/kg, ocorreu uma elevação tanto no plasma quanto no músculo, quando comparado com o grupo não suplementado e o grupo 80. No final do experimento não se observou alteração entre os grupos com relação à atividade das enzimas AST e CK e na concentração dos TBARS, nas amostras de tecido muscular.

Em estudo realizado com a suplementação de vitamina E em cavalos foi observado aumento significativo nos níveis de TBARS como marcadores de estresse oxidativo, sobretudo no período de baixos níveis de vitamina E (McMENIMAN e HINTZ, 1992). Esses autores concluíram que os cavalos estão normalmente expostos a um grau de peroxidação lipídica, como indicam os valores de TBARS no plasma e na musculatura encontrados nesses animais em repouso.

Chiaradia et al. (1998) buscaram uma relação entre a peroxidação lipídica e a lesão da fibra muscular, utilizando um grupo de garanhões submetidos, durante um período de treinamento de três meses, a uma série de exercícios físicos de intensidade progressiva, e avaliou a atividade das isoenzimas creatinaquinase (CK), lactatodesidrogenase (LDH), e glutathiona (GSH). Foram observados altos níveis de MDA ( $0,11\mu\text{mol/L}$ ) nos animais após exercício intenso e até 18 horas após o exercício. Houve aumento da atividade de isoenzimas da LDH, enquanto que a atividade da CK não se alterou. Os achados em relação ao MDA e GSH confirmaram que o exercício foi capaz de gerar radicais livres e peroxidação lipídica, que essa geração depende da intensidade da atividade e que a eliminação dos produtos da peroxidação lipídica é um processo vagaroso.

Baskurt e Meiselman (1999) ao estudar a susceptibilidade dos eritrócitos de equinos a alterações mecânicas induzidas por lesões oxidativas, concluíram que comparado ao eritrócito humano o eritrócito equino é mais sensível à injúria oxidativa, pois foram encontrados maiores níveis de formação de meta-hemoglobina, tendência à formação de equinócitos, alterações na agregação e redução da deformidade das células, em resposta ao desafio oxidante.

Estudando as alterações induzidas pelo exercício em alguns marcadores bioquímicos e oxidativos no plasma e nos eritrócitos de cavalos destinados à prática da modalidade de pentlato, Balogh et al. (2001) colheram amostras antes, logo após e 24 horas depois de uma competição e observou aumentos significativos na atividade da CK e LDH imediatamente após o exercício, os quais retornaram aos valores basais em 24 horas. Os níveis de TBARS e glutatona reduzida não se alteraram nos eritrócitos, mas se mostraram menores 24 após o exercício.

Na atividade de enduro eqüestre Marlin et al.(2002) observaram um aumento significativo da concentração de TBARS, da atividade das enzimas CK e AST no plasma logo após, e até 16 horas depois do exercício, quando comparados à fase do repouso, enquanto que os níveis de vitamina E mostraram-se inalterados. Apesar disso, os autores afirmaram que esses achados não foram suficientes para demonstrar o estresse oxidativo clássico, uma vez que os antioxidantes e os marcadores bioquímicos de estresse oxidativo da circulação podem não refletir o estado muscular, que é o local de maior produção de EROs durante o exercício.

Adicionando 200 gramas de óleo rico em ácidos graxos polinsaturados para um grupo de cavalos (grupo O) e para outro grupo (grupo O + E), a mesma dieta anterior acrescida de 5 gramas de  $\alpha$ -tocoferol, Bergero et al., (2004) não obtiveram diferenças estatisticamente significativas nos valores plasmáticos da concentração de TBARS entre os grupos.

Com o objetivo de elucidar os mecanismos de proteção antioxidante em equinos treinados, Kinnunen et al. (2005b) avaliaram a capacidade antioxidante desses animais em relação à capacidade de absorção de EROs e outros marcadores de estresse oxidativo, após uma sessão única de exercício moderado. Os resultados demonstraram

que as alterações no estresse oxidativo, traduzidos pelo aumento significativo nos níveis de hidroperóxidos lipídicos e no estado antioxidante, oriundas do exercício agudo são mais pronunciadas durante o período de recuperação do que imediatamente ao exercício.

Estudando os efeitos do exercício prolongado (80 quilômetros de enduro eqüestre) sobre os marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos e a defesa antioxidante plasmática em cavalos da raça Árabe, Kinnunen et al.(2005c) demonstraram que a capacidade antioxidante plasmática total não sofreu alterações devido a esse tipo de exercício, uma vez que não houve diferenças significativas tanto nos índices de peroxidação lipídica, mensuradas pelos níveis de hidroperóxidos lipídicos, quanto em outros marcadores de estresse oxidativo. Do mesmo modo, não houve aumento significativo da atividade das enzimas musculares CK e AST.

Muñoz-Escassi et al. (2006) investigaram as alterações sobre a concentração de peróxidos lipídicos e a glutathiona peroxidase no plasma de cavalos de hipismo e de adestramento, demonstrando que houve aumento significativo das concentrações de peróxidos lipídicos tanto no momento de aquecimento quanto após a prova de hipismo.

Onze cavalos foram selecionados para um estudo com o objetivo de verificar se o treinamento controlado e a suplementação dietética a base de 40 mg/kg de vitamina E e 20µg/kg de selênio por 70 dias seriam capazes de aumentar a habilidade neutralizadora contra o estresse oxidativo nos tecidos. O MDA plasmático em repouso e depois do exercício foi significativamente maior antes do que depois do programa de treinamento e da suplementação. Em ambos os momentos houve aumentos significativos do MDA pós-exercício, sendo que no teste realizado após os 70 dias de treinamento e suplementação, o MDA foi significativamente menor do que no primeiro momento. Os valores de MDA e vitamina E apresentaram correlação significativamente inversa, o que demonstra que o treinamento e a suplementação foram capazes de melhorar o sistema neutralizante de radicais livres através do consumo da vitamina E, para conter a peroxidação lipídica oriunda do exercício. O aumento de MDA na primeira prova física sugeriu grande produção de radicais livres induzidos pelo exercício. Na segunda prova, os valores de MDA diminuíram, demonstrando que a suplementação favoreceu a capacidade do organismo de combater os radicais livres. Por outro lado, os valores de

vitamina E apresentaram-se diminuídos indicando aumento no consumo em função do aumento da lipoperoxidação (AVELLINI et al., 1999).

Moffarts et al. (2004) demonstraram que o exercício pode influenciar significativamente sobre os marcadores antioxidantes em cavalos trotadores e observaram que marcadores, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos podem sofrer processo adaptativo oriundo do treinamento e de acordo com a intensidade do exercício.

Silveira (2005) utilizou dez eqüinos adultos da raça Árabe, submetendo-os a um protocolo de exercício com velocidades crescentes, em esteira com posição horizontal. Foram aferidas a freqüência respiratória, a temperatura retal, a temperatura ambiente e umidade relativa do ar antes e após o exercício e a freqüência cardíaca antes, durante e após o exercício. Os protocolos de exercícios foram realizados seis dias por semana, durante quatro semanas em esteira de alta velocidade, sendo que nesta etapa não foram colhidas amostras de sangue dos animais. Após o treinamento os animais foram submetidos a um teste padrão de exercício progressivo com esteira inclinada, que consistiu em desafiar os eqüinos com velocidades crescentes até a exaustão, colhendo-se então amostras de sangue para: hemograma, contagem do número de plaquetas, proteína total plasmática, fibrinogênio, atividade enzimática sérica da CK, AST e LDH, hemogasometria, dosagem sérica do MDA, concentração de vitamina E, cortisol, e lactato sanguíneo. Amostras de sangue foram colhidas antes do início do exercício, em repouso, durante o exercício em diferentes velocidades crescentes, 1 minuto depois do exercício, 3 minutos, 5 minutos, 30 minutos, 60 minutos e nos momentos subseqüentes: 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 3 dias e 5 dias. Os resultados demonstraram que exercício progressivo induziu o estresse oxidativo e lipoperoxidação em eqüinos da raça Árabe por meio da produção de MDA sérico, após 30 minutos. O autor sugeriu que apesar da detecção de níveis basais de vitamina E, esta e/ou outras substâncias antioxidantes naturais foram eficientes na proteção das membranas celulares evitando a propagação da lipoperoxidação. Além disso, foram verificadas alterações no hemograma, contagem total de leucócitos, contagem diferencial (nos neutrófilos segmentados e linfócitos), onde foi sugerida ação do cortisol sobre estes parâmetros, permitindo concluir que o exercício progressivo e o estresse oxidativo foram os possíveis responsáveis em promover alterações na membrana das células musculares aumentando os valores séricos das enzimas CK, AST e LDH.

Em um estudo sobre o efeito da suplementação oral com antioxidantes por um período de três meses, em cavalos de corrida treinados, foi demonstrado que esses animais apresentaram alterações significativas em marcadores bioquímicos da atividade antioxidante no sangue durante esse período. A suplementação foi capaz de contrabalançar esse desequilíbrio, principalmente pela elevação do  $\alpha$ -tocoferol, selênio e da atividade da glutathione peroxidase nos eritrócitos (MOFFARTS et al.,2005b).

Moffarts et al.(2006) realizaram um experimento com o objetivo de comparar o impacto de exercícios realizados em esteira e em pista de corrida, sobre o equilíbrio oxidativo de cavalos atletas, para avaliar se os resultados obtidos em condições laboratoriais poderiam ser parâmetros para o exercício realizado a campo. Ao final do experimento observaram que o exercício realizado em esteira induziu maiores alterações no lactato sanguíneo e nos marcadores do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em relação ao exercício realizado na pista.

Utilizando um grupo de 493 cavalos, Kirschvink et al.(2006) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se a influência da raça, do sexo, e da idade em relação aos marcadores do equilíbrio oxidativo em cavalos atletas, observaram diferenças significativas nos parâmetros analisados. Foi concluído que o equilíbrio oxidativo do sangue é influenciado pela raça, sexo e idade e que há uma relação positiva entre os níveis de glutathione peroxidase, vitamina E e selênio, enquanto que há uma relação negativa entre o volume globular, atividade de CPK e LDH. Os autores propuseram que esses resultados podem auxiliar na determinação das necessidades específicas por antioxidantes e vitaminas, em grupos distintos de cavalos atletas.

Ao comparar o conteúdo de vitamina E na dieta total de cavalos competindo em prova de enduro de 80 quilômetros com os índices de estresse oxidativo, Williams et al.(2003) observaram a existência de relação positiva entre os resultados de níveis plasmáticos de  $\alpha$  – tocoferol para os animais que receberam suplemento de vitamina E. Houve uma correlação negativa entre o consumo de vitamina E e a atividade sérica da CK e de AST e por isto consideraram que o alto consumo de vitamina E está associado a um menor grau de lesão muscular e estresse oxidativo, assim como é elevado o estado antioxidante de eqüinos, durante a prova de enduro. Diante desses resultados, os autores concluíram

que equinos submetidos a exercícios intensos podem ter seu bem-estar e desempenho melhorados se forem suplementados com altos níveis de vitamina E.

Williams et al.(2004a), estudaram o efeito da suplementação antioxidante sobre o desenvolvimento de estresse oxidativo em cavalos submetidos a uma prova de enduro equestre de 80 quilômetros. Um grupo recebeu uma suplementação oral diária formulada com 5000 UI de vitamina E, por três semanas. Outro grupo foi suplementado com a mesma dose de vitamina E, adicionada de 7 gramas de vitamina C. Foram analisados após a prova os níveis de hidroperóxidos lipídicos,  $\alpha$ -tocoferol, ascorbato, albumina, atividade de CK e AST no plasma, além da atividade eritrocitária de glutaciona peroxidase. Além do ascorbato, nenhum dos parâmetros foi afetado comparando-se as suplementações. Por outro lado, os índices de hidroperóxidos lipídicos, CK e AST aumentaram significativamente após a prova, enquanto que a atividade de glutaciona peroxidase e o total de glutaciona nas células sanguíneas foram reduzidos. Além disso, houve correlação positiva entre o aumento de hidroperóxidos lipídicos e a atividade da CK e AST. Os autores concluíram que existiu uma associação entre a lesão muscular e os índices de estresse oxidativo.

Williams et al. (2004b) conseguiram demonstrar que a suplementação com vitamina E e ácido lipóico, outra molécula considerada como antioxidante, foi capaz de prevenir o desenvolvimento de estresse oxidativo, caracterizado por menores níveis de marcadores bioquímicos, assim como observaram diminuição do grau de liberação de enzimas marcadoras de lesão muscular e da atividade de apoptose celular, em cavalos de enduro.

Ao comparar os marcadores de estresse oxidativo de cavalos atletas em três provas distintas de enduro equestre, Williams et al.(2005) encontraram valores significativamente maiores para a atividade das enzimas CK e AST nos animais que não conseguiram finalizar os percursos em comparação aos outros animais antes, durante e após as provas, apesar de outros marcadores não mostrarem essa diferença. Os autores concluíram que considerando as diferenças entre as condições e resultados das três provas, há grande importância no condicionamento físico, no tipo de terreno, nas condições ambientais e distância do percurso para a interpretação dos resultados de marcadores de estresse oxidativo e enzimas musculares.

Com o objetivo de determinar os níveis de suplementação com vitamina E necessários para minimizar os efeitos do exercício exaustivo em éguas de raça de trote, em uma esteira de alta-velocidade, Williams e Carlucci (2006) avaliaram o efeito da suplementação com vitamina E sobre o estresse oxidativo. Um grupo permaneceu como controle e não recebeu suplementação alguma, um grupo teste recebeu 5000 UI e em outro foi administrado 10000 UI por dia de vitamina E. Os autores observaram que a suplementação acima dos níveis recomendados não parece ser benéfica para o controle do estresse oxidativo e do balanço oxidativo em cavalos submetidos a exercícios intensos, e que níveis até dez vezes acima dos recomendados pelo NRC poderiam ser nocivos para o metabolismo do beta-caroteno, e assim, serem contra-indicados.

O metabolismo oxidativo eritrocitário foi estudado em eqüinos da raça Árabe, submetidos a exercício progressivo em esteira de alta velocidade através da avaliação do efeito da suplementação com vitamina E (1000UI/animal/dia) sobre os constituintes sangüíneos. Como resultado observou-se após o exercício diferenças significativas no eritrograma, com aumento do número de hemácias, do volume globular e da concentração de hemoglobina, como também das PPT. A suplementação com vitamina E atenuou o estresse oxidativo, caracterizado pelo menor valor do MDA no grupo suplementado, entretanto, verificou-se um aumento da atividade da AST, CK (MACHADO, 2006).

## **2.5 Importância da vitamina E e selênio na dieta de eqüinos.**

A concentração natural de vitamina E, assim como sua atividade, varia consideravelmente na dieta usualmente oferecida a eqüinos. Forrageiras frescas e colhidas em estado imaturo, geralmente contêm maiores níveis de vitamina E (30 – 100 UI/kg), enquanto os grãos tendem a possuir concentrações menores. O processo e o tempo de estocagem reduzem progressivamente a concentração natural de vitamina E (SICILIANO, 2004).

A absorção da vitamina E está relacionada com a digestão de gorduras, e é facilitada pela função pancreática, secreção biliar, formação de micelas e penetração através das membranas intestinais. A maior parte da vitamina E é absorvida como álcool, sendo transportada para a circulação geral através da circulação linfática, sendo então estocada

em todos os tecidos corpóreos, especialmente no fígado e tecido adiposo e excretada principalmente pela bÍlis. O tocoferol é oxidado nos tecidos dos animais, produzindo o alfa-tocoferilquinona, que é o principal produto formado a partir da peroxidação de lipÍdeos. Este composto se transforma em alfa-tocoferil-hidroquinona que pode ser acumulado no fígado e excretado em forma conjugada nas fezes, bÍlis, ou pode ainda sofrer beta-oxidação nos rins, formando o ácido alfa-tocoferônico, que é convertido à alfa-tocoferona-lactona e excretado pela urina (COSTA, 2000).

A vitamina E se localiza primariamente nas partes lipofÍlicas das células, tais como as membranas celulares, que contêm vitamina E na concentração de aproximadamente 1,0 mg para cada 5 a 10 gramas de membrana lipÍdica (CHEW, 1996).

Baalsrud e Overnes (1986) propuseram que a vitamina E, sozinha ou associada com o selênio, pode ser essencial para o desenvolvimento de resistência contra doenças tais como a gripe por vírus influenza e o tétano em cavalos, sendo que a atividade antioxidante da vitamina E na prevenção da peroxidação lipÍdica é um dos mecanismos possíveis para auxiliar a resposta imune. Baixas concentrações de vitamina E nas membranas estão relacionadas com a desestabilização de células do sistema imune, com a diminuição da hipersensibilidade retardada, diminuição da resposta imune celular, diminuição da produção de imunoglobulinas e de interleucina-2. Além disso, a vitamina E provoca diminuição na produção de prostaglandinas (FERNÁNDEZ et al., 2002).

A necessidade de vitamina E em cavalos é um assunto controverso. Vários estudos estabeleceram valores discrepantes tanto em relação aos valores, como aos vários níveis e tipos de atividade. A maior parte da vitamina E ingerida pelos animais é oriunda da dieta básica formada por forrageiras ricas em tocoferol. Além disso, a ingestão pode variar muito dependendo da dieta oferecida ao cavalo. Muitas rações comerciais contribuem para essa variação por serem formuladas com suplementação de vitamina E (SICILIANO, 2004). Dessa forma, a necessidade de suplementação para animais pode estar fundamentada em estados carenciais ou em aumento das necessidades basais decorrentes do aumento da atividade metabólica. O NRC (1989) estabeleceu as concentrações de vitamina E nas dietas de 50 UI/kg para cavalos em manutenção e 80 UI/kg para éguas gestantes, potros em crescimento e cavalos em trabalho, sendo

tolerados níveis máximos de 1000 UI/kg de alimento. Estes valores foram reportados por Lawrence (2000) e Hintz (2000).

Apesar das recomendações do NRC serem provavelmente adequadas na maioria das circunstâncias, foi reportado que as necessidades podem ser maiores do que o recomendado, nos casos de potros em crescimento e éguas em reprodução (HINTZ, 2000). Roneus et al. (1986) recomendaram para cavalos de corrida adultos, a suplementação diária de 1,1 a 4,4 mg/kg P.V. de vitamina E, para animais com dietas pobres nesse nutriente como ideal.

Outro fator que pode influenciar a oferta de vitamina E é eficiência na sua utilização pelo organismo, sendo que variáveis como a forma química da vitamina E e o nível de ácidos graxos insaturados na dieta podem afetar a utilização do tocoferol. Além disso, sinais de intoxicação por excesso de vitamina E não foram reportados em cavalos. Por outro lado, a deficiência de vitamina E, conjuntamente com a de selênio, pode estar envolvida na patogenia de miodegenerações, doença do músculo branco, além da mieloencefalopatia degenerativa e doença do neurônio motor (HINTZ, 2000).

As exigências de selênio nos eqüinos são estimadas em cerca de 0,1 mg/kg de matéria seca (NRC, 1989). Snow et al. (1986) consideraram que as exigências de selênio em cavalos de corrida podem ser menores do que as recomendadas. Por outro lado, o aumento do metabolismo durante o exercício, gerando quantidades maiores de EROs leva ao aumento das necessidades de selênio para maior atividade de glutathione peroxidase, necessária para a remoção dessas substâncias oxidativas. Foi sugerida que a concentração de 0,3 mg/kg poderia ser mais apropriada na dieta total de cavalos (HINTZ, 2000).

A deficiência e o excesso de selênio estão incriminados em algumas patologias, tais como: problemas musculares em várias espécies, inclusive em cavalos, doença do músculo branco em potros, miodegeneração distrófica e polimiosite em animais adultos (HARRIS e MAYHEW, 1998), sendo que a intoxicação crônica por selênio foi incriminada na perda de pêlos, colapso do casco, erosão articular, claudicação, além de cegueira associada à ataxia e insuficiência respiratória (HINTZ, 2000).

### 3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### 3.1 INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO SOBRE O HEMOGRAMA, ENZIMAS MARCADORAS DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, EM EQUÍNOS SUBMETIDOS À ATIVIDADE DE SALTO.

##### RESUMO

A atividade de hipismo clássico é considerada extenuante para cavalos atletas, e o exercício físico causa lesões relacionadas com alterações hematológicas e com o estresse oxidativo que estão envolvidas na fisiopatologia de enfermidades nesses animais. O objetivo desse trabalho foi determinar a influência do exercício sobre os parâmetros do hemograma, das proteínas plasmáticas totais, do fibrinogênio, da atividade de enzimas envolvidas com lesões musculares (CK, AST e LDH), como também de marcador de estresse oxidativo, avaliado através da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em membrana de hemácias de cavalos. Para tanto, 20 cavalos treinados foram submetidos a uma prova de hipismo tendo sido colhidas amostras de sangue, nos momentos imediatamente, antes ( $T_R$ ), imediatamente após ( $T_0$ ), 6 ( $T_6$ ), 12 ( $T_{12}$ ) e 24 horas ( $T_{24}$ ) após a realização do exercício. O exercício influenciou sobre alguns parâmetros analisados, tais como: número de hemácias, volume globular, concentração de hemoglobina, número total de leucócitos, contagem diferencial de neutrófilos e linfócitos em valores absolutos, atividade das enzimas CK e AST, e a concentração de TBARS, demonstrando assim o desenvolvimento de estresse oxidativo, uma vez que, levando-se em consideração a análise estatística, os maiores valores foram observados após a realização do exercício. Todos os parâmetros avaliados retornaram aos valores basais 24 horas após a realização da prova. Esses resultados demonstraram a relevância da utilização de tais parâmetros para o monitoramento do estado clínico de cavalos de uso na prática de esporte, em especial para avaliação do condicionamento físico e da adaptação dos animais ao tipo de atividade aos quais são submetidos.

**Palavras-chave:** Equínos, Fisiologia do exercício, Hematologia, Bioquímica clínica, Estresse oxidativo.

## ***SUMMARY***

The physical exercise cause injuries in horses related to hematological alterations and oxidative stress that are involved in the physiopathology of some diseases. The activity of show jumping is considered extenuate for athletic horses. The objective of this research was to determine the influence of this kind of exercise on the hematological parameters, the activity of enzymes related with muscular injuries (CK, AST and LDH), and the concentration of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), a marker of oxidative stress, in erythrocyte membranes of horses. For this purpose, 20 trained horses had been submitted to a show jumping session. Blood samples were collected immediately before ( $T_R$ ), immediately after ( $T_0$ ), 6 ( $T_6$ ), 12 ( $T_{12}$ ) and 24 hours ( $T_{24}$ ) after the exercise. The exercise influenced some analyzed parameters: the number of erythrocytes, the globular volume, the concentration of hemoglobin, total number of leukocytes, differential counting of neutrophils and lymphocytes in absolute numbers, the activity of enzymes CK and AST. The concentration of TBARS demonstrated the development of oxidative stress. The values obtained before the exercise were lesser and statistically significant than those obtained after the accomplishment of the exercise. In a general way, all parameters returned to basal values 24 hours after the end of the exercise session. These results demonstrated the relevance of the analysis of such parameters for the follow up of the clinical state of athletic horses, in special for the evaluation of the physical conditioning and the adaptation of these animals to the kind of exercise to which they are submitted.

**Key-words:** Equine, Exercise physiology, Hematology, Clinical biochemistry, Oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO

A avaliação do hemograma e da bioquímica sérica tem sido utilizada para o monitoramento do cavalo atleta, permitindo o acesso à função de vários sistemas orgânicos, sendo assim ferramentas fundamentais no acompanhamento do estado de saúde desses animais (HODGSON e ROSE, 1994). A importância da hematologia como meio semiológico é reconhecida mundialmente, não somente para a determinação dos valores de referência de animais sadios, mas principalmente para o acompanhamento das alterações fisiológicas influenciadas pelos fatores de variabilidade tais como raça, idade, sexo, condições ambientais e alterações decorrentes da utilização dos animais para o esporte (DOMINGUES JÚNIOR et al., 2004).

A causa mais comum de resultados negativos em competições eqüestres é a injúria músculo-esquelética, estando esse fato relacionado com a queda do desempenho muscular (KINNUNEN et al., 2005). Para o monitoramento da higidez do tecido muscular e o controle de tais lesões, utiliza-se a avaliação da atividade de enzimas como a Creatina Quinase (CK), Aspartato Aminotransferase (AST) e a Lactato Desidrogenase (LDH), uma vez que o aumento da atividade das mencionadas enzimas indica lesão muscular (HODGSON e ROSE, 1994).

A produção de radicais livres tem sido incriminada como componente causador de diversas enfermidades dos eqüinos, principalmente dos cavalos atletas. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) relacionadas ao exercício foi demonstrada por Sjödin et al. (1990), e entre os seu efeitos deletérios potenciais destaca-se a indução de lesões teciduais pela oxidação dos componentes celulares tais como as membranas lipídicas. Dessa forma, o estresse oxidativo induzido pelo exercício pode contribuir para acelerar o processo de fadiga e lesão da fibra muscular, levando à intolerância ao exercício e queda de desempenho atlético (MOFFARTS et al., 2004).

O estresse oxidativo oriundo do exercício pode estar ligado às alterações hematológicas, uma vez que foi demonstrado aumento da atividade peroxidativa dos leucócitos após sessão de exercícios (KORHONEN et al., 2000). Além disso, as alterações mecânicas nos eritrócitos, oriundas de lesões das membranas determinadas pelo ataque de radicais livres, ao gerar diminuição da fluidez eritrocitária, podem afetar a microcirculação na musculatura causando lesão nesse tecido e conseqüente aumento da atividade das enzimas ligadas à lesão muscular (SENTÜRK et al., 2005; BASKURT e MEISELMAN, 1999; PORTIER et al., 2006; MOFFARTS et al., 2007).

O malondialdeído (MDA) é o aldeído individualmente mais abundante resultante da peroxidação lipídica, sendo que sua determinação pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) é uma das metodologias mais comuns para o estudo da peroxidação lipídica (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990), sendo utilizada em pesquisas na espécie eqüina (PORTER, 1984; CHIARADIA et al., 1998; DEATON et al., 2002; MARLIN et al., 2002; SILVEIRA, 2005).

Tendo em vista que no Hipismo Clássico a prova de saltos é considerada uma atividade extenuante para o cavalo, o objeto desta pesquisa foi estudar o efeito do exercício sobre o quadro hematológico, a atividade de enzimas marcadoras de lesão muscular (Creatina Quinase - CK, Aspartato Aminotransferase - AST e a Lactato Desidrogenase - LDH),

além de avaliar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como marcador bioquímico de estresse oxidativo, em membranas de eritrócitos de cavalos atletas mantidos em hípica da Região Metropolitana de Salvador - BA.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 20 eqüinos clinicamente sadios com idade compreendida entre oito e 12 anos, da raça Brasileira de Hipismo (BH), com peso médio de 450 kg, mantidos sob regimes de treinamento para provas de hipismo clássico, em clube eqüestre do Município de Salvador. Todos os animais foram submetidos a manejos sanitário e nutricional semelhantes, incluindo-se vermifugações a cada três meses com produtos comerciais e vacinação semestral contra Gripe Eqüina, Tétano e Encefalomielite Eqüina, além de vacinação anual contra a Raiva. A alimentação dos animais foi constituída por: água à vontade, 7,5 kg de feno de capim Coast Cross (*Cynodon dactylon*), 7,5 kg de capim Elefante (*Pennisetum hybridum*) e ração comercial, ofertando-se a quantidade correspondente entre 1 a 1,5 % do peso vivo, dividindo-se em duas refeições.

Todos os animais encontravam-se a mais de 90 dias sob regime de treinamento físico e técnico para provas de hipismo a qual era constituída por: duas a quatro sessões de treinamento físico (passo, trote e galope) e uma a duas sessões de saltos semanais e descanso semanal.

Durante o período de padronização de treinamento de exercício e manejo nutricional não foram administrados quaisquer tipo de medicamento aos animais, quando então foram submetidos a exames físicos conforme recomenda Speirs (1997), e realizado o hemograma para certificar-se do estado clínico desses eqüinos, sendo os resultados registrados em fichas clínicas individuais.

### **2.2 Delineamento experimental**

Após o período de padronização, os 20 animais foram submetidos ao exercício que se constituiu de uma prova de Hipismo Clássico na categoria de 1,00 metro de altura. O tempo de aquecimento, o número de obstáculos bem como o grau de dificuldade foi padronizado e composto por 25 minutos de exercício, sendo 10 minutos a passo, 10 a trote, 5 minutos a galope com um total de seis saltos de preparação. A prova foi constituída de dupla passagem por uma pista de nove obstáculos, perfazendo um total de 18 saltos com duração de cerca de três minutos. Os grupos experimentais foram formados colhendo-se as amostras de sangue com os animais ainda em repouso ( $T_R$ ), imediatamente após término do exercício ( $T_0$ ), e seis ( $T_6$ ), 12 ( $T_{12}$ ) e 24 ( $T_{24}$ ) horas após a realização da prova hípica para avaliação do hemograma, atividade de enzimas como marcadores bioquímicos de lesão muscular e índice de peroxidação de biomoléculas, através da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

## 2.3 Colheita do material

Por punção da veia jugular externa foram colhidas duas amostras de 5ml de sangue de cada animal em tubos a vácuo contendo sal trissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA  $K_3$ ) a 10%, onde uma foi destinada às análises dos constituintes do hemograma e a outra para a obtenção de hemolizado para a determinação de TBARS. Essas amostras foram acondicionadas sob refrigeração e imediatamente remetidas ao Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais Domésticos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (EMEV – UFBA), onde foram processadas.

Para avaliação das atividades das enzimas CK, AST, LDH foram colhidos 10ml de sangue em tubos sem EDTA, em seguida mantidos em repouso em temperatura ambiente para a retração do coágulo e obtenção do soro, o qual foi congelado a  $-40^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização das provas laboratoriais.

## 2.4 Análises laboratoriais

Foram realizados os exames que compõem o hemograma (eritrograma e leucograma), análises de proteínas plasmáticas totais, fibrinogênio plasmático, avaliação da atividade sérica de CK, AST, LDH e o índice de peroxidação de biomoléculas nas membranas de eritrócitos pela quantificação dos TBARS através da reação do TBA.

Para realização do eritrograma foi determinada a contagem do número de eritrócitos em câmara de Neubauer, utilizando-se o líquido de Gower numa proporção de 1:200 como solução diluente e o resultado foi expresso em número de células  $\times 10^6/\mu\text{L}$ . A técnica utilizada para a determinação do volume globular foi a do microhematócrito, usando-se tubos capilares de diâmetros homogêneos de 1mm e 7 mm, preenchidos com sangue até dois terços do seu volume, que após fechamento com massa específica os capilares foram centrifugados durante 5 min com uma força de 12000 G, e o resultado foi expresso em porcentagem (%). A concentração de hemoglobina foi determinada por meio do método da cianometahemoglobina, empregando-se o líquido de Drabkin, sendo expressa em  $g/dL$ . A determinação dos índices hematimétricos absolutos, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), e concentração da hemoglobina globular média (CHGM) foram calculados por meio dos dados obtidos na contagem das hemácias (He); concentração de hemoglobina (Hb) e determinação do volume globular (VG), conforme descritos por Birgel (1982), e os resultados expressos, respectivamente em fentolitros ( $fL$ ), picogramas ( $pg$ ) e porcentagem (%).

Para a realização do leucograma efetuou-se a contagem do número total de leucócitos adicionando-se 20 $\mu\text{l}$  de sangue total em 400 $\mu\text{l}$  de solução a 4% de ácido acético e posterior contagem em câmara de Neubauer e foi expresso em número de células/ $\mu\text{L}$  de sangue. Para a contagem diferencial dos leucócitos foram confeccionados esfregaços sangüíneos corados pelo corante de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947), segundo a técnica padronizada para animais (BIRGEL, 1982). Em cada esfregaço sangüíneo foram diferenciados 100 leucócitos classificados de acordo com as suas características tintoriais em: neutrófilos, com núcleos em bastão e com núcleo segmentado, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos, apresentando-se o resultado em números relativos e expressos em porcentagem, e a seguir, por cálculos matemáticos, foram

obtidos os números absolutos de cada tipo de leucócitos e expressos em número de células  $\times 10^3/\mu\text{L}$  (MATOS E MATOS, 1988).

A concentração das proteínas totais foi realizada pelo método refratométrico, expressando-se os resultados em  $\text{g/dL}$  e o fibrinogênio plasmático foi também determinado por método refratométrico, após tratamento térmico do plasma, segundo preconizado por JAIN (1993) e os resultados expressos em  $\text{mg/dL}$ .

As determinações das atividades das enzimas foram realizadas através de sistema colorimétrico, utilizando-se kits comerciais, onde para a CK seguiu-se a técnica descrita por Okinaka et al. (1961); da AST a metodologia descrita por Reitman e Frankel (1957) e da LDH conforme descrito por Whitaker (1969).

O índice de peroxidação de biomoléculas, principalmente lipídios, foi avaliado pelo teor de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA), denominadas de TBARS, em membranas de eritrócitos, descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). O referido método se baseia na reação de uma grande variedade de substâncias oxidadas que formam complexos de cor rósea com o TBA, tais como o MDA, açúcares e aminoácidos oxidados em meio aquecido. Os eritrócitos foram obtidos por centrifugação do sangue total a  $12.000 \times \text{g}$  por 10 minutos e foram lisados em água destilada. As membranas eritrocitárias obtidas foram lavadas com tampão fosfato 50  $\text{mM}$  pH 7,4, na mesma condição de centrifugação descrita acima até se eliminar completamente a presença de hemoglobina no sobrenadante. Ao final desse processo, o sedimento contendo fragmentos obtidos de membranas de eritrócitos foi ressuspensão no mesmo tampão. Realizou-se a determinação de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Posteriormente, foram preparados os tubos para a análise contendo 1 mg de proteína, adicionando-se 2 ml de solução de TCA a 15 % (p/v) com TBA a 0,67 % (p/v). Para cada tubo teste preparou-se um tubo branco contendo a amostra juntamente com 2 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 15 % (p/v). O aparelho de espectrofotometria foi zerado com um tubo contendo apenas os reagentes, mas sem amostra. Esse conjunto de três tubos foi aquecido na temperatura de  $100^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Após o resfriamento e centrifugação para a retirada do sedimento, o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro em comprimento de onda de 532  $\text{nm}$ . A diferença entre o valor de absorvância do tubo teste com o valor de absorvância do seu respectivo branco foi usada para o cálculo da concentração de TBARS. O resultado da absorvância foi utilizado para calcular o TBARS equivalente à concentração de MDA usando-se o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os valores equivalentes de TBARS foram expressos em  $\text{nM/mg de proteína}$  (MIURA et al., 1998).

## 2.5 Análise estatística

O efeito do exercício foi analisado comparando-se os dados obtidos antes do exercício com os dados a cada tempo após o exercício pelo teste  $t$  pareado ou o teste não paramétrico de Wilcoxon, dependendo da normalidade das amostras. O efeito do tempo após o exercício foi analisado pelo teste de análise de variância (ANOVA) unilateral ou pelo teste de ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, dependendo da normalidade das amostras, seguidos do método de Student-Newman-Keuls. Verificou-se a existência de correlação entre os diferentes parâmetros, utilizando-se o teste de Pearson ou o de Spearman dependendo da normalidade dos dados. Dados comparados

que apresentaram valores de  $p < 0,05$  foram considerados como sendo significativamente diferentes. Utilizou-se o programa Sigma Stat (LARSON, 1982).

### 3. RESULTADOS

Os valores das médias, desvios padrão, medianas, percentil 25 e percentil 75 dos constituintes sanguíneos obtidos dos eqüinos treinados para provas de hipismo clássico utilizados para avaliação da influência do exercício sobre o hemograma, as proteínas plasmáticas totais, o fibrinogênio, as enzimas marcadoras de lesão muscular e a avaliação do estresse oxidativo estão apresentados nas tabelas de 4 a 6.

Os resultados apresentados na tabela 4 e figura 3 (das letras de A a E) demonstraram a influência do exercício sobre constituintes do eritrograma, das proteínas plasmáticas totais e do fibrinogênio, pois os valores de médias e medianas obtidas para o número de hemácias, o volume globular, a concentração de hemoglobina e das proteínas analisadas foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre os momentos analisados. A análise estatística evidenciou que antes do exercício ( $T_R$ ) e imediatamente após este ( $T_0$ ) os eqüinos obtiveram valores maiores para o número de hemácias ( $7,36 \pm 1,09$  a  $9,65 \times 10^6/\mu L$ ), o volume globular ( $32,15 \pm 3,74$  a  $43,25 \pm 3,94$  %), a concentração de hemoglobina ( $11,90 \pm 1,99$  a  $16,08 \pm 1,80$  g/dL) e para as PPT ( $6,95 \pm 0,33$  a  $7,27 \pm 0,25$  g/dL) e Fb ( $395 \pm 114,6$  a  $610,00 \pm 188,90$  mg/dL), e que a partir desta fase os valores foram gradativamente menores e significantes, restabelecendo para os valores próximos ao da fase do repouso 24 horas após a realização do exercício ( $T_{24}$ ), revelando assim um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do tempo sobre os valores mencionados.

Nos esfregaços sanguíneos confeccionados não foram encontradas alterações morfológicas das hemácias.

Conforme apresentação dos resultados na tabela 5 e figura 3 (letra F), o exercício causou efeito sobre o leucograma, evidenciado pelos valores das médias e medianas do número total de leucócitos, em decorrência do aumento dos valores absolutos dos neutrófilos segmentados e linfócitos que foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) nas fases de repouso ( $T_R$ ) e imediatamente após a realização das provas de hipismo clássico ( $T_0$ ). A cinética do número total de leucócitos variou de  $7,16 \pm 1,15$  para  $8,95 \pm 1,20$  células  $\times 10^3/\mu L$ ; os neutrófilos segmentados de  $4,54 \pm 0,94$  para  $5,77 \pm 1,00$  células  $\times 10^3/\mu L$  e os linfócitos de  $2,28 \pm 0,54$  para  $2,85 \pm 0,65$  células  $\times 10^3/\mu L$ . Como semelhante ao ocorrido com as células da série vermelha, os leucócitos gradativamente apresentaram restabelecimento dos valores de média basais, até as 24 horas após a prova de hipismo clássico ( $T_{24}$ ), decorrente da neutrofilia observada até seis horas, enquanto que a linfocitose perdurou até 12 horas após o exercício.

Em relação à contagem diferencial de leucócitos relativa, houve diminuição da relação N/L após 12 horas decorridas do exercício por um aumento da proporção de linfócitos (de  $34,65 \pm 6,07\%$  no  $T_6$ , para  $37,55 \pm 3,83\%$  no  $T_{12}$ ) e diminuição da proporção de neutrófilos (de  $61,55 \pm 6,09\%$  no  $T_6$ , para  $58,25 \pm 3,79\%$  no  $T_{12}$ ), sendo que em ambos os casos, os valores retornaram aos níveis de repouso no  $T_{24}$ .

Os resultados apresentados na tabela 6 e figura 4 evidenciaram a influência do exercício sobre as atividades das enzimas marcadoras de lesão músculo-esquelética, bem como sobre o índice de peroxidação de biomoléculas, principalmente lipídios, avaliado pelo

teor de substâncias reativas do TBARS em membranas das hemácias. Os valores observados para a CK, AST e TBARS antes do exercício foram menores ( $28,5 \pm 15,49$  UI/L,  $39,0$  (35,0; 48,9)UI/L e  $148,07 \pm 114,76$  nM/mg de proteína, respectivamente) e estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os obtidos imediatamente após o exercício ( $124,06 \pm 45,67$  UI/L,  $62,7$  (48,7; 75,9) UI/L e  $543,26 \pm 311,72$  nM/mg de proteína, respectivamente) e gradualmente houve um decréscimo até seis horas após a realização da prova hípica, quando atingiram os níveis basais, os quais foram estatisticamente significativos.

Os resultados expostos na tabela 7 e figuras 5 e 6 demonstram a correlação entre a concentração de TBARS na membrana de hemácias e os diversos parâmetros avaliados nos diferentes momentos. Houve uma correlação significativa ( $p < 0,05$ ) negativa entre as concentrações de TBARS com: as PPT, a contagem diferencial relativa de neutrófilos segmentados, a contagem diferencial relativa de linfócitos e com a atividade sérica de LDH.

Além disso, foram observadas correlações significativas ( $p < 0,005$ ) positivas entre os níveis de TBARS e a concentração de hemoglobina, a contagem diferencial de neutrófilos segmentados, a atividade sérica da AST, CK e LDH.

**Tabela 4.** Dados sobre os constituintes do eritrograma, das proteínas plasmáticas totais (PPT) em *g/dL* e concentração sérica de fibrinogênio (Fb) em *mg/dL*, obtidos de equinos submetidos à prova de Hipismo Clássico da raça Brasileiro de Hipismo, antes e nos diferentes tempos pós-exercício. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

Constituintes do Eritrograma	T <sub>R</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>24</sub>
He ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7,36 $\pm$ 1,09 7,52; 6,85; 8,00	9,65 <sup>a</sup> $\pm$ 1,59 9,32; 8,84; 10,40	8,50 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,03 8,44; 7,57; 9,00	7,78 <sup>b</sup> $\pm$ 0,77 7,90; 6,95; 8,28	7,37 <sup>b</sup> $\pm$ 0,80 7,54; 6,83; 7,78
VG (%)	32,15 $\pm$ 3,74 32,00; 29,00; 34,50	43,25 <sup>a</sup> $\pm$ 3,94 43,50; 40,50; 46,00	34,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,22 34,0; 32,50; 35,0	33,50 <sup>b</sup> $\pm$ 2,54 34,00; 32,00; 34,50	32,00 <sup>b</sup> $\pm$ 3,17 32,0; 29,00; 34,00
Hb ( <i>g/dL</i> )	11,90 $\pm$ 1,99 11,50; 10,80; 13,10	16,08 <sup>a</sup> $\pm$ 1,80 16,70; 14,70; 17,20	13,20 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,45 13,1; 12,30; 14,2	12,7 <sup>b</sup> $\pm$ 1,17 12,60 <sup>a</sup> ; 11,90; 13,70	11,73 <sup>b</sup> $\pm$ 1,84 11,8; 10,80; 12,40
VGM ( <i>fL</i> )	44,33 $\pm$ 6,76 44,70; 38,60; 48,90	45,65 $\pm$ 7,01 44,60; 42,00; 49,10	40,34 <sup>ab</sup> $\pm$ 4,08 39,7; 37,20; 43,9	43,43 $\pm$ 5,25 44,30; 38,70; 46,80	43,75 $\pm$ 5,47 44,9; 38,80; 47,50
HGM ( <i>pg</i> )	16,33 $\pm$ 2,90 16,20; 14,50; 17,50	16,94 $\pm$ 2,51 16,80; 16,00; 18,50	15,63 $\pm$ 1,87 15,1; 14,20; 17,4	16,44 $\pm$ 1,90 1,70; 15,30; 17,50	16,05 $\pm$ 2,09 16,4; 14,90; 17,30
CHGM (%)	36,94 $\pm$ 3,97 36,6; 34,5; 39,9	37,21 $\pm$ 2,87 36,8; 35,9; 39,3	38,74 $\pm$ 2,39 39,0; 37,1; 40,2	37,99 $\pm$ 2,65 38,9; 36,8; 39,9	36,81 $\pm$ 3,39 36,4; 34,7; 39,1
Fb ( <i>mg/dL</i> )	395,0 $\pm$ 114,6 400; 300; 500	610,0 <sup>a</sup> $\pm$ 188,9 550; 500; 750	305,0 <sup>a</sup> $\pm$ 119,1 300 <sup>b</sup> ; 200; 350	324,0 <sup>a</sup> $\pm$ 98,6 325 <sup>b</sup> ; 250; 390	365,0 $\pm$ 93,3 400 <sup>b</sup> ; 300; 400
PPT ( <i>g/dL</i> )	6,95 $\pm$ 0,33 7,00; 6,80; 7,20	7,27 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25 7,30; 7,00; 7,50	7,17 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,29 7,15; 7,00; 7,25	6,81 <sup>b</sup> $\pm$ 0,36 6,80; 6,60; 7,00	6,98 <sup>b</sup> $\pm$ 0,27 7,00; 6,90; 7,20

<sup>a</sup> em linha p < 0,05 comparado com T<sub>R</sub>. <sup>b</sup> em linha p < 0,05 comparado com T<sub>0</sub>.

**Tabela 5.** Dados sobre os constituintes do leucograma de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, antes e nos diferentes tempos pós-exercício de Hipismo Clássico, distribuídos segundo os valores absolutos (*células x 10<sup>3</sup>/μL*) e relativos (%). Os resultados estão expressos pela média ± desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

Constituintes do Leucograma	T <sub>R</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>24</sub>
LT ( <i>x 10<sup>3</sup>/μL</i> )	7,16 ± 1,15 6,90; 6,45; 7,73	8,95 <sup>a</sup> ± 1,20 8,80; 8,15; 9,55	8,31 <sup>a</sup> ± 1,49 8,07 <sup>b</sup> ; 7,20; 9,25	7,75 <sup>a</sup> ± 1,18 7,45 <sup>b</sup> ; 6,93; 8,15	7,16 ± 0,84 6,95 <sup>b</sup> ; 6,70; 7,53
Seg	4,54 ± 0,95 4,36; 3,88; 5,13	5,77 <sup>a</sup> ± 1,00 5,69; 5,00; 6,21	5,09 <sup>a</sup> ± 0,91 4,83 <sup>b</sup> ; 4,42; 5,42	4,49 ± 0,60 4,29 <sup>b</sup> ; 4,13; 4,66	4,61 ± 0,71 4,57 <sup>b</sup> ; 4,10; 5,05
Linf	2,29 ± 0,54 2,28; 1,79; 2,75	2,85 <sup>a</sup> ± 0,65 2,66; 2,51; 2,97	2,90 <sup>a</sup> ± 0,78 2,89; 2,43; 3,50	2,92 <sup>a</sup> ± 0,61 2,75; 2,56; 3,24	2,23 ± 0,35 2,25 <sup>b</sup> ; 1,96; 2,54
Mon	0,17 ± 0,07 0,15; 0,12; 0,23	0,16 ± 0,11 0,15; 0,08; 0,24	0,17 ± 0,09 0,15; 0,09; 0,22	0,15 ± 0,07 0,14; 0,08; 0,20	0,15 ± 0,06 0,14; 0,12; 0,19
Eos	0,14 ± 0,09 0,13; 0,07; 0,17	0,13 ± 0,08 0,13; 0,08; 0,19	0,13 ± 0,09 0,11; 0,07; 0,18	0,15 ± 0,08 0,14; 0,08; 0,20	0,15 ± 0,06 0,13; 0,12; 0,22
Bas	0,003 ± 0,015 0,00; 0,00; 0,00	0,008 ± 0,026 0,00; 0,00; 0,00	0,003 ± 0,013 0,00; 0,00; 0,00	0,008 ± 0,027 0,00; 0,00; 0,00	0,008 ± 0,025 0,00; 0,00; 0,00
Seg(%)	63,25 ± 6,80 63,0; 56,0; 70,5	64,55 ± 6,24 67,50; 58,5; 68,0	61,55 ± 6,09 59,5; 56,0; 65,0	58,25 <sup>a,b</sup> ± 3,79 58,5; 55,5; 60,5	64,20 ± 4,49 65,5; 60,5; 68,0
Linf	32,20 ± 7,18 33,0; 25,5; 39,5	32,00 ± 5,67 30,05; 28,0; 35,0	34,65 ± 6,07 36,5; 30,5; 40,0	37,55 <sup>a,b</sup> ± 3,83 38,0; 35,5; 40,0	31,45 ± 5,11 31,50; 27,0; 36,0
Mon	2,40 ± 0,99 2,00; 2,00; 3,00	1,80 ± 1,23 2,00; 1,00; 3,00	2,05 ± 0,99 2,00; 1,00; 3,00	2,00 ± 0,97 2,00; 1,00; 2,50	2,15 ± 0,81 2,00; 2,00; 3,00
Eos	1,95 ± 1,05 2,00; 1,00; 2,50	1,50 ± 0,94 1,50; 1,00; 2,00	1,65 ± 1,08 1,50; 1,00; 2,00	2,00 ± 0,97 2,00; 1,00; 3,00	2,20 ± 0,83 2,00; 2,00; 3,00
Bas	0,05 ± 0,22 0,00; 0,00; 0,00	0,10 ± 0,30 0,00; 0,00; 0,00	0,05 ± 0,22 0,00; 0,00; 0,00	0,10 ± 0,30 0,00; 0,00; 0,00	0,10 ± 0,30 0,00; 0,00; 0,00

<sup>a</sup> em linha p < 0,05 comparado com T<sub>R</sub>. <sup>b</sup> em linha p < 0,05 comparado com T<sub>0</sub>.

**Tabela 6.** Dados sobre a atividade das enzimas Creatina Quinase (CK), Aspartato Aminotransferase (AST), Lactato Desidrogenase (LDH) em *UI/L* e dos níveis de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em membrana de hemácias, expressos em *nM/mg de proteína*, de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, antes e nos diferentes tempos pós exercício de Hipismo Clássico. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

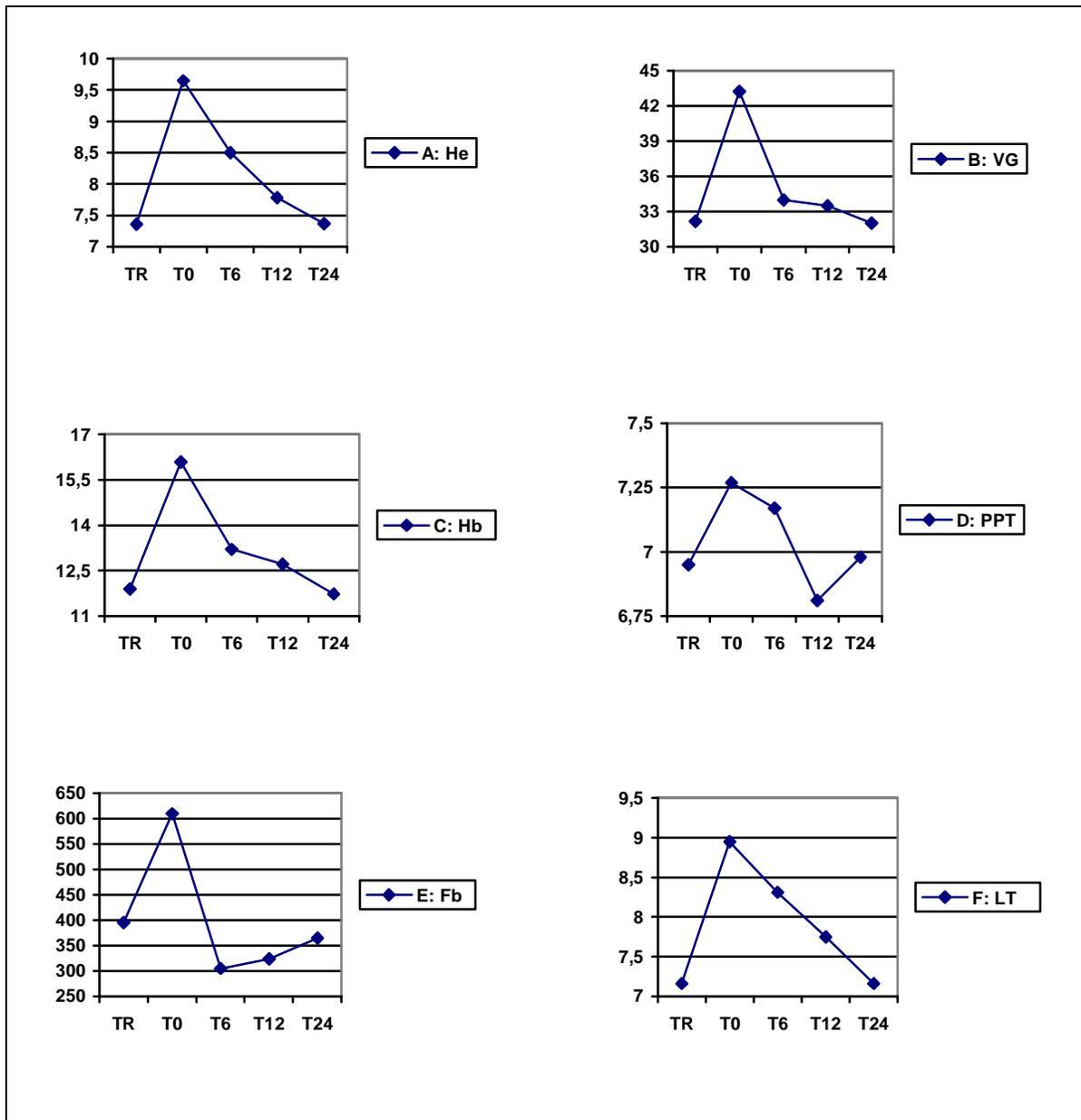
Parâmetros Bioquímicos	T <sub>R</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>24</sub>
CK ( <i>UI/L</i> )	28,5 $\pm$ 15,49 24,0; 12,5; 39,2	124,0 <sup>a</sup> $\pm$ 45,6 131,1; 86,1; 155,0	42,9 <sup>a</sup> $\pm$ 20,0 38,2 <sup>b</sup> ; 28,6; 53,4	26,2 $\pm$ 8,5 25,3 <sup>b</sup> ; 21,0; 32,4	27,8 $\pm$ 13,1 30,0 <sup>b</sup> ; 12,0; 35,7
AST ( <i>UI/L</i> )	43,1 $\pm$ 10,1 39,0; 35,0; 48,9	63,6 $\pm$ 14,3 62,7 <sup>b</sup> ; 48,7; 75,9	46,6 $\pm$ 11,6 43,7 <sup>b</sup> ; 37,8; 54,7	43,3 $\pm$ 6,5 42,6 <sup>b</sup> ; 38,5; 45,3	38,1 $\pm$ 7,0 37,3 <sup>b</sup> ; 33,8; 41,5
LDH ( <i>UI/L</i> )	228,2 $\pm$ 100,3 205,7; 173,9; 291,1	265,0 $\pm$ 93,9 279,1; 201,0; 305,5	238,7 $\pm$ 74,1 276,6; 191,8; 301,9	227,8 $\pm$ 66,8 232,8; 189,4; 274,4	228,7 $\pm$ 63,5 239,4; 191,4; 277,1
TBARS ( <i>nM/mg ptn</i> )	148,0 $\pm$ 114,7 118,6; 73,7; 185,9	543,2 <sup>a</sup> $\pm$ 311,7 525,6; 285,3; 756,4	416,9 $\pm$ 391,6 189,1 <sup>a,b</sup> ; 109,0; 756,4	216,9 $\pm$ 157,6 153,8 <sup>b</sup> ; 118,6; 272,4	129,1 $\pm$ 81,7 125,0 <sup>b</sup> ; 64,1; 176,3

<sup>a</sup>em linha  $p < 0,05$  comparado com T<sub>R</sub>. <sup>b</sup>em linha  $p < 0,05$  comparado com T<sub>0</sub>.

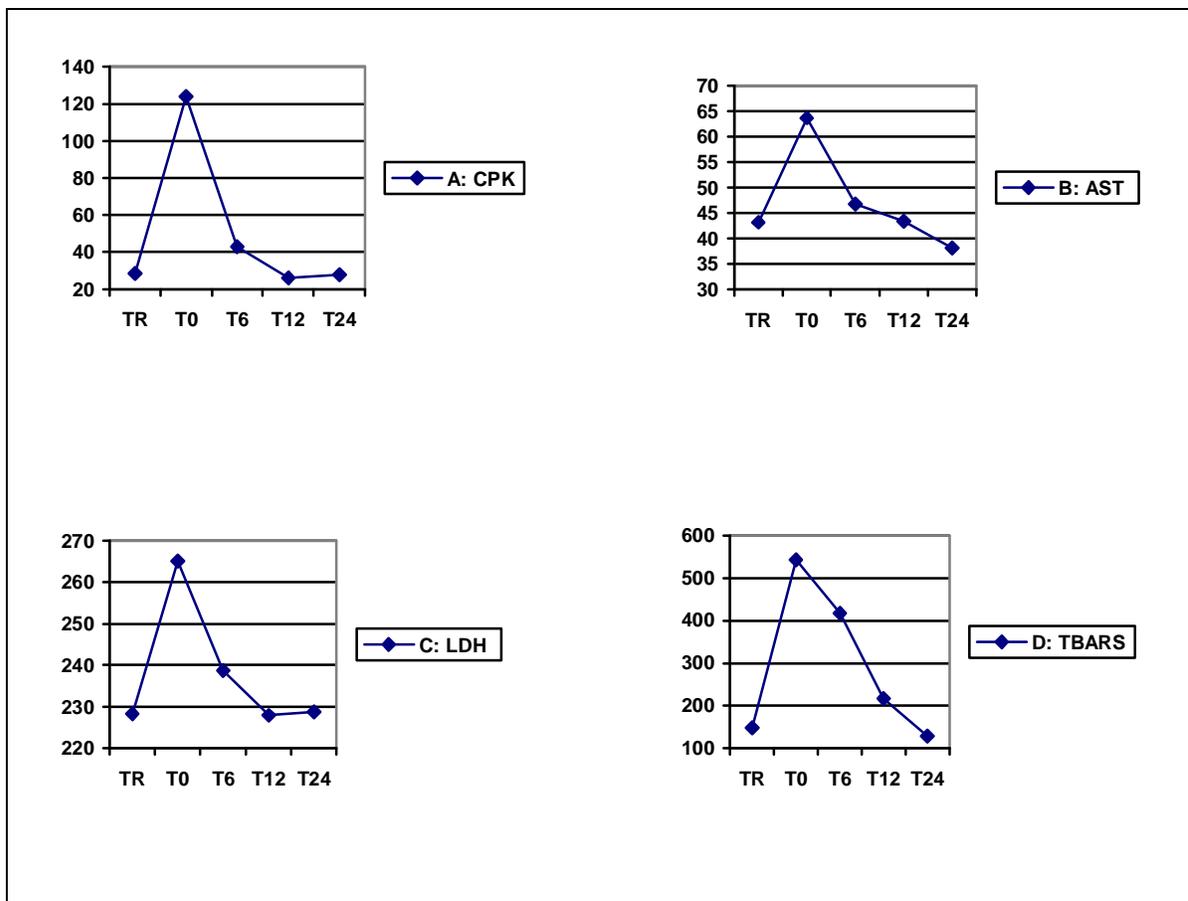
**Tabela 7.** Estudo de correlação entre os níveis de TBARS em membrana de hemácias e outros parâmetros analisados nos diferentes momentos. Dados expressos pelos coeficientes de correlação e valores de p. Salvador, 2008.

	TBARS				
	T <sub>R</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>24</sub>
He ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	-0,073 / 0,752	0,317 / 0,173	0,0497 / 0,8313	-0,018 / 0,936	-0,182 / 0,442
VG (%)	0,248 / 0,292	0,331 / 0,153	0,4226 / 0,0623	0,344 / 0,134	0,297 / 0,203
Hb (g/dL)	0,0407 / 0,8647	0,4907 / 0,02802 <sup>a</sup>	0,6277 / 0,00309 <sup>a</sup>	0,224 / 0,337	-0,133 / 0,575
PPT (g/dL)	-0,4774 / 0,0333 <sup>b</sup>	-0,0681 / 0,7753	0,368 / 0,108	0,326 / 0,157	-0,301 / 0,194
Fb (mg/dL)	0,238 / 0,308	0,174 / 0,456	0,150 / 0,521	-0,372 / 0,103	0,142 / 0,546
LT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,0306 / 0,8982	-0,154 / 0,516	-0,163 / 0,488	-0,029 / 0,896	0,0288 / 0,904
Seg (%)	0,217 / 0,359	-0,5165 / 0,0199 <sup>b</sup>	0,60448 / 0,0048 <sup>a</sup>	-0,265 / 0,255	0,335 / 0,149
Linf (%)	-0,297 / 0,204	0,363 / 0,115	-0,664 / 0,00132 <sup>b</sup>	0,269 / 0,246	-0,436 / 0,0546
AST (UI/L)	0,554 / 0,0112 <sup>a</sup>	0,655 / 0,0016 <sup>a</sup>	0,710 / 0,0020 <sup>a</sup>	-0,167 / 0,476	-0,335 / 0,149
CK (UI/L)	0,295 / 0,207	0,128 / 0,589	0,5325 / 0,0157 <sup>a</sup>	0,075 / 0,747	-0,239 / 0,311
LDH (UI/L)	-0,241 / 0,306	-0,5864 / 0,0065 <sup>b</sup>	0,252 / 0,2772	-0,338 / 0,141	0,632 / 0,0028 <sup>a</sup>

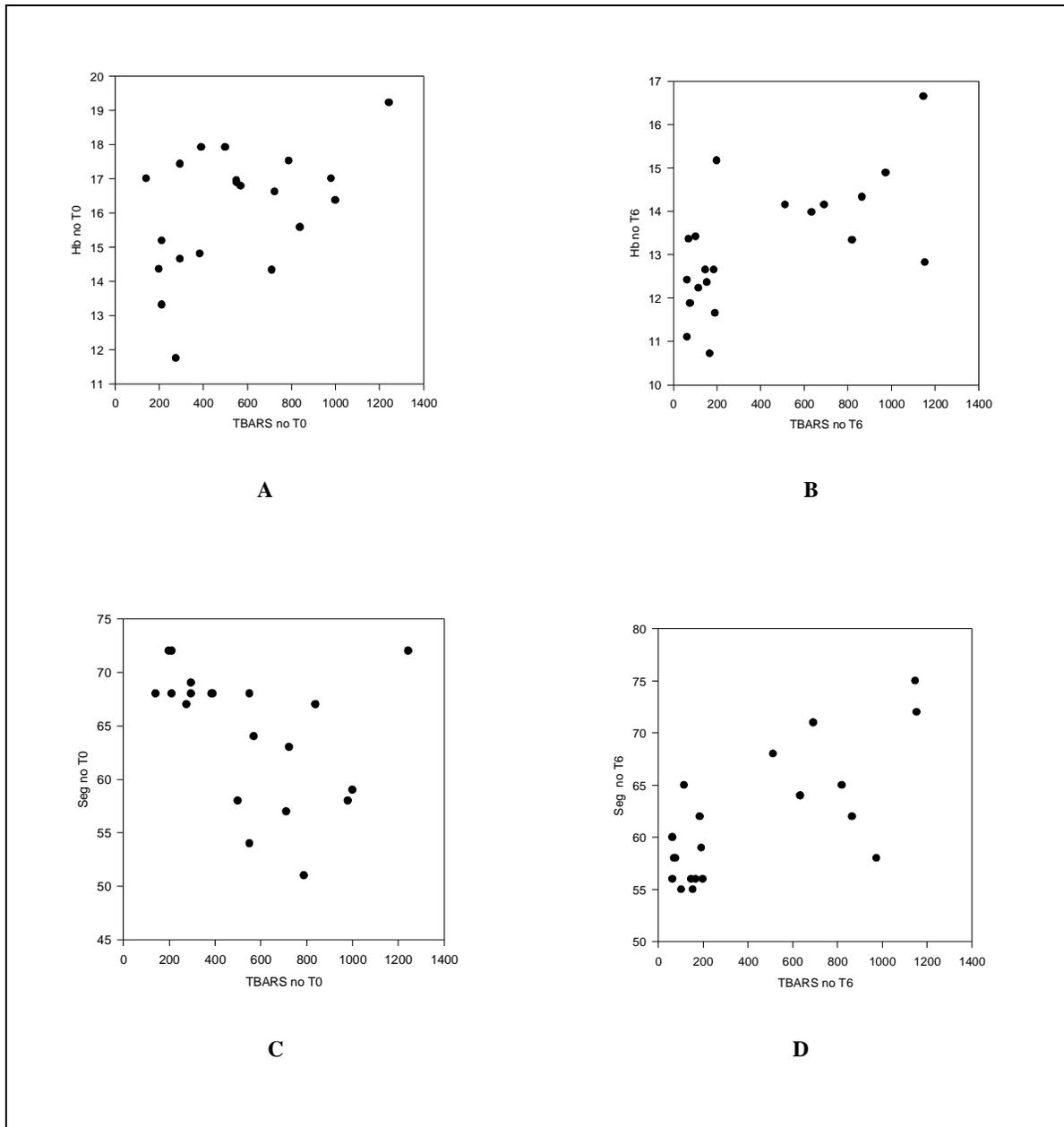
<sup>a</sup> correlação significativamente ( $p < 0,05$ ) positiva. <sup>b</sup> correlação significativamente ( $p < 0,05$ ) negativa.



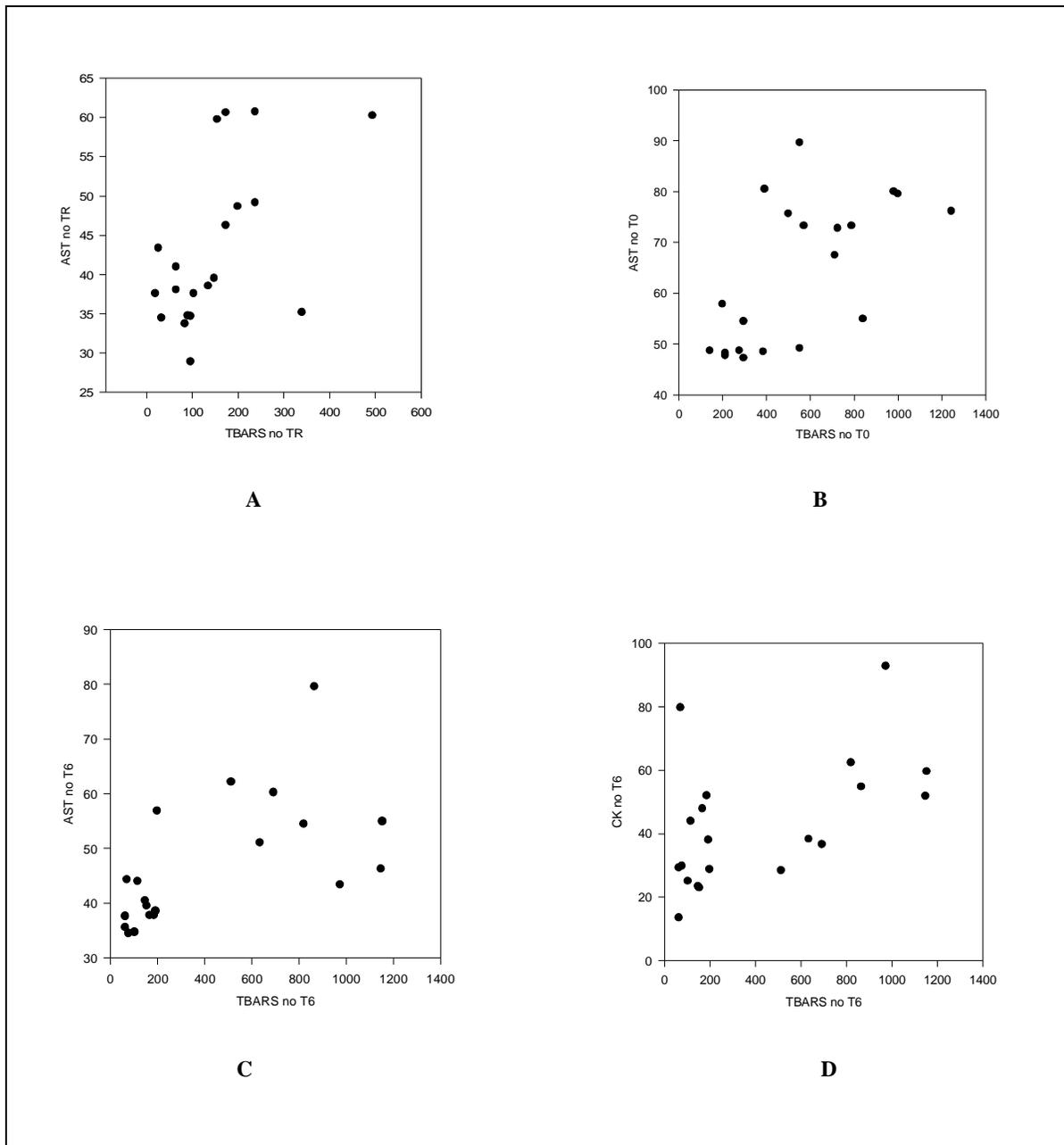
**Figura 3.** Demonstração gráfica da dinâmica do número de hemácias (He) (*células  $\times 10^6/\mu l$* ), do volume globular (VG) (%), da concentração de hemoglobina (Hb) (*g/dL*), das proteínas plasmáticas totais (PPT) (*g/dL*), do fibrinogênio (Fb) (*mg/dL*) e do número total de leucócitos (LT) (*células  $\times 10^3/\mu l$* ), (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente, nos diferentes momentos.



**Figura 4.** Demonstração gráfica da dinâmica das atividades séricas de CK (UI/L), AST (UI/L), LDH (UI/L) e dos níveis de TBARS em membranas de hemácias (nM/mg de proteína), (A), (B), (C) e (D), respectivamente, nos diferentes momentos.



**Figura 5.** Demonstração da correlação entre a hemoglobina ( $g/dL$ ) e o nível de TBARS ( $nM/mg$  de proteína) em membrana de hemácias no T<sub>0</sub> e no T<sub>6</sub>, e entre a contagem diferencial de neutrófilos segmentados (%) e o nível de TBARS ( $nM/mg$  de proteína) em membrana de hemácias no T<sub>0</sub> e no T<sub>6</sub>. (A), (B), (C) e (D), respectivamente.



**Figura 6.** Demonstração da correlação entre a atividade sérica da AST (*UI/L*) e o nível TBARS (*nM/mg de proteína*) na membrana de hemácias no  $T_R$ ,  $T_0$  e no  $T_6$ , e entre a atividade sérica de CK e os níveis de TBARS (*nM/mg de proteína*) na membrana de hemácias no  $T_6$ . (A), (B), (C) e (D), respectivamente.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação do hemograma, proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio.

Os resultados dos parâmetros do hemograma dos equinos, obtidos nesta pesquisa, estão em concordância com os valores reportados na literatura para a espécie em estudo (JAIN, 1986; HODGSON e ROSE, 1994; KRAMER, 2000).

A influência do exercício sobre a contagem do número de hemácias, do volume globular e da concentração da hemoglobina, observada pelos valores de médias maiores e estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), imediatamente após a realização da prova hípica, quando comparados ao período de repouso, corroboram com os resultados reportados em pesquisas anteriores, em animais treinados para outras modalidades de exercício (SMITH et al., 1989; GARCIA et al., 1999; DOMINGUES JÚNIOR, 2004; SILVEIRA, 2005), bem como o restabelecimento dos valores basais, ocorridos em até 24 horas após a realização do exercício. A dinâmica desses parâmetros do eritrograma fora também constatada em animais de outras raças submetidos à prova de salto (ART et al., 1990; LEKEUX et al., 1991). Isto, possivelmente se explica pelo armazenamento das hemácias no baço durante o repouso e o aumento de catecolaminas ativados em função do exercício (SNOW, 1983; GOMÉZ et al., 2004).

As alterações hematológicas observadas nesta pesquisa foram compatíveis com o desenvolvimento de hemoconcentração. Segundo Carlson (1987), a viscosidade do sangue é influenciada pela viscosidade do plasma, pela concentração, agregação e deformidade de eritrócitos, e a alta viscosidade sangüínea pode impedir o fluxo, levando à ineficiência na distribuição de oxigênio aos tecidos periféricos durante o exercício. Entretanto, em pesquisas realizadas em cavalos de corrida, não foram observadas variações de parâmetros hematológicos antes e após as provas de velocidade (REVINGTON, 1983).

Em relação aos índices hematimétricos absolutos, o VGM apresentou diminuição significativa transitória seis horas após o exercício, devido ao menor aumento do VG em relação ao aumento do número de eritrócitos nesse momento. Esse achado corrobora a afirmação de que o exercício pode levar a pequenas diminuições do VGM (HODGSON e ROSE, 1994).

Os valores obtidos para as PPT na fase de repouso estão dentro do intervalo considerado normal para a espécie (JAIN, 1986; KRAMER, 2000). O exercício foi capaz de aumentar de forma significativa os valores desses parâmetros conforme já observado por Carlson (1987), justificando que este evento reflete o influxo de proteínas e alteração na distribuição do volume plasmático, através da saída de líquidos para o espaço extravascular, como resposta ao exercício, colaborando assim para a hemoconcentração. Em cavalos submetidos ao exercício de salto foi observado o aumento significativo das PPT após a realização do exercício (ART et al., 1990; LEKEUX et al., 1991), bem como em animais treinados para outra modalidade de exercício (GARCIA et al., 1999; BALOGH et al., 2001; SILVEIRA, 2005), apesar disso, obtiveram-se resultados discordantes em cavalos submetidos ao exercício de salto, quando os valores das PPT não se alteraram após a prova equestre (GÓMEZ et al., 2004).

O fibrinogênio plasmático também apresentou valores de média durante o repouso dentro do limite proposto por Jain (1986) e Kramer (2000). O aumento significativo desse valor após o exercício, seguido de diminuição no momento T<sub>6</sub>, com retorno aos valores basais no T<sub>12</sub>, estão discordantes com os resultados obtidos em animais que realizaram exercícios em esteira ergométrica (SMITH et al., 1989; SILVEIRA, 2005).

A cinética do número total de leucócitos, com aumento do valor da média, de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) após o exercício, e retorno ao valor de repouso no T<sub>6</sub>, foram semelhantes aos mencionados por outros autores (JAIN, 1986; KRAMER, 2000; HODGSON e ROSE, 1994). A contagem total do número de leucócitos pode aumentar de 10 a 30% após o exercício máximo de curta duração, determinando influxo leucocitário oriundo da reserva esplênica (HODGSON e ROSE, 1994), e do mesmo modo, durante o exercício físico extenuante (KORHONEN et al., 2000). Além disto, a resposta dos leucócitos ao exercício está relacionada ao aumento de corticóides plasmáticos (JAIN, 1993) e à ação de catecolaminas (TOLEDO et al., 2001; SILVEIRA, 2005).

Em relação à contagem diferencial de leucócitos houve neutrofilia e linfocitose absoluta imediatamente após o exercício, sendo que a neutrofilia teve resolução em seis horas enquanto que a linfocitose perdurou até 12 horas após o exercício. A contagem diferencial relativa de leucócitos demonstrou que após 12 horas do momento do exercício houve uma diminuição da relação N/L por um aumento da proporção de linfócitos e diminuição da proporção de neutrófilos. Esses resultados estão de acordo com o observado anteriormente (HODGSON e ROSE, 1994). No entanto, Korhonen et al. (2000) observaram leucocitose e aumento da relação neutrófilos/linfócitos ao término do exercício. Essa leucocitose também foi devido à neutrofilia que perdurou por seis horas. A leucocitose pós-exercício ocasionalmente ocorre em duas fases, com um aumento instantâneo do número tanto de neutrófilos e linfócitos, seguido por outro momento de leucocitose tardia que pode durar por algumas horas, quando o número de neutrófilos aumenta e o número de linfócitos diminui. O primeiro pico é devido à demarginação de neutrófilos aderidos ao endotélio induzida pela ação de catecolaminas, sendo a segunda fase oriunda da mobilização de neutrófilos maduros da medula óssea, induzida pelo cortisol. O exercício induz aumentos transitórios das catecolaminas plasmáticas e do cortisol, o que leva à mobilização de linfócitos do baço e também à demarginação dos neutrófilos restringindo-os na circulação sanguínea, que impede a sua migração para os tecidos (SNOW, 1983; SILVEIRA, 2005).

Em atletas humanos foi encontrada leucocitose por neutrofila, sendo esta observada após o exercício como resposta fisiológica do organismo, semelhante à observada no processo inflamatório não progressivo, uma vez que ela só se estende até quatro horas após o exercício (SENTÜRK et al., 2005).

#### **4.2. Avaliação da atividade das enzimas marcadoras de lesão muscular**

O valor da média na fase de repouso da atividade da enzima CK foi semelhante aos obtidos por vários autores para o cavalo atleta (HARRIS e MAYHEW, 1998; KANEKO et al., 1997; LUMSDEN et al., 1980), entretanto difere de uma pesquisa realizada no Brasil, em cavalos submetidos a exercícios de diferentes intensidade, cujo valor foi maior do que o obtido neste trabalho (TOLEDO et al., 2001).

O valor da média da atividade de AST, em repouso, é semelhante ao reportado por Silva et al. (2007), para o grupo de animais de reprodução, e segundo os autores, este fato sugere que os animais utilizados se encontravam adaptados ao treinamento. Quanto à atividade da LDH em repouso, o resultado desta pesquisa foi semelhante ao obtido por Toledo et al. (2001), em cavalos atletas submetidos a exercício de alta intensidade.

A dinâmica da atividade sérica de enzimas musculares (CK e AST), imediatamente após o exercício, e seu retorno aos valores basais num intervalo de 6 a 12 horas de descanso, que ocorreu no presente estudo, foi observada anteriormente e corrobora a boa condição atlética dos animais utilizados, levando-se em conta o teste de resposta ao exercício sub-máximo proposto por Harris e Mayhew (1998), apesar do nível de CK pós-exercício ter ultrapassado o dobro do valor basal. Foi possível observar ainda que os níveis de AST no T<sub>24</sub> foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os encontrados no T<sub>6</sub> e T<sub>12</sub>. A musculatura esquelética é particularmente sensível à injúria oxidativa devida à alta exposição ao oxigênio e a alta proporção de ácidos graxos insaturados em suas biomembranas (MILLS et al., 1997).

Em cavalos de salto foi demonstrado, anteriormente, aumento significativo da atividade da CK e AST após a realização do exercício, quando comparado ao momento do repouso. O aumento transitório na permeabilidade da membrana celular e a presença de lesões que resultam na destruição da célula com liberação do seu conteúdo na circulação podem estar envolvidos nesse processo (LEKEUX et al., 1991; ART et al., 1990). Entretanto, Gómez et al. (2004), trabalhando com animais de salto submetidos a exercício, não observaram diferença estatisticamente significativa da AST nas fases antes e pós-exercício, mas sim aumento significativo da CK no início do período de treinamento, sendo que após esse período não foi mais detectada essa alteração, o que o autor considerou como sinal de adaptação ao treinamento.

De forma contrária ao que alguns experimentos demonstraram, os animais utilizados nesse estudo não tiveram aumento significativo da atividade da LDH sérica após o exercício. Esse resultado é semelhante ao reportado por Toledo et al. (2001), em cavalos de corrida. Entretanto outras pesquisas demonstraram o aumento significativo na atividade da LDH após o exercício (GARCIA et al., 1999; LEKEUX et al., 1991; BALOGH et al., 2001). Porém, deve-se considerar a afirmação de Silva et al. (2001) de que, apesar da presença em grandes quantidades dessa enzima na musculatura esquelética, o aumento da atividade sérica da LDH não é específico para o tecido muscular.

### **4.3 Avaliação do índice de peroxidação de biomoléculas.**

Os valores de TBARS obtidos nesta pesquisa, durante o momento do repouso, foram compatíveis com os encontrados por McMeniman e Hintz (1992), quando observaram que cavalos estão normalmente expostos a um grau de peroxidação lipídica devido aos níveis de TBARS no plasma e na musculatura. Esse achado também está em concordância com o reportado por Chiaradia et al. (1998) e Silveira (2005), que encontraram concentrações de TBARS plasmática em eqüinos durante o repouso.

O exercício aumentou de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) os valores de TBARS na membrana de hemácias após o exercício, sendo que no T<sub>12</sub> houve remissão desse aumento e retorno aos valores basais, resultado também observado por Chiaradia

et al. (1998) que obteve altas concentrações de MDA sérico em animais após exercício intenso, onde os valores da concentração de MDA permaneceram aumentados até 18 horas após o exercício, ao contrário do ocorrido no presente estudo.

Do mesmo modo, Avellini et al. (1999) obtiveram aumento significativo de MDA plasmático em cavalos atletas após o exercício, concluindo ser devido à produção de radicais livres oriundos da atividade física. Além disso, White et al. (2001) demonstraram aumento significativo de TBARS no plasma após o exercício, e atribuiu que o aumento de MDA, na forma de TBARS pode ser em decorrência de lesões oxidativas pela produção de radicais livres oriundas do exercício. O aumento da TBARS e foram observados em cavalos atletas ao realizar exercício progressivo em esteira de alta velocidade (SILVEIRA, 2005; MACHADO, 2006).

Em cavalos de hipismo, Muñoz-Escassi et al. (2006) observaram aumento significativo das concentrações de peróxidos lipídicos, outro marcador de estresse oxidativo, tanto no momento de aquecimento quanto após a prova de hipismo, o que também demonstrou o desenvolvimento de estresse oxidativo oriundo da atividade de saltos. Por outro lado, em cavalos submetidos à modalidade de pentlato não foi detectada alteração significativa nos níveis de TBARS nos eritrócitos (BALOGH et al., 2001). Uma correlação positiva e significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de TBARS, e a contagem de neutrófilos segmentados no  $T_6$ , foi anteriormente descrita por Sentürk et al. (2005), quando estudaram as alterações hemodinâmicas e o desenvolvimento de estresse oxidativo em atletas humanos, relacionadas com o exercício, observando a indução de uma resposta semelhante à inflamatória como indicado pelo aumento da contagem de leucócitos e da porcentagem de granulócitos.

A correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre a concentração de TBARS nas membranas eritrocitárias e a atividade sérica de AST no  $T_R$ ,  $T_0$ , e  $T_6$ , como também a atividade sérica da CK no  $T_6$ , significa que nesses momentos os animais apresentaram maior atividade dessas enzimas. Possivelmente, existe uma associação entre a lesão muscular e os índices de estresse oxidativo, uma vez que fato semelhante ocorreu em estudos realizados em cavalos submetidos ao enduro eqüestre (WILLIAMS et al., 2004), bem como no exercício em esteira progressiva (SILVEIRA, 2005).

McBride e Kraemer (1999) observaram aumento significativo da atividade sérica da CK e AST após o exercício em atletas humanos e correlação positiva entre a atividade plasmática da AST e CPK, justificando que os radicais livres produzidos durante o exercício alteram a permeabilidade da membrana das células musculares permitindo o aumento da atividade sérica dessas enzimas.

A leucocitose, com aumento da população de granulócitos após o exercício, observada nesse experimento, também já havia sido observada por Korhonen et al. (2000), demonstrando aumento da atividade peroxidativa dos leucócitos, após sessão de exercícios.

## 5. CONCLUSÃO

O exercício a que os animais foram submetidos determinou a ocorrência de alterações dos constituintes do hemograma e da atividade das enzimas indicativa de lesão muscular (CK e AST), produzindo também um quadro de estresse oxidativo nas membranas eritrocitárias, traduzido pelo aumento dos níveis de TBARS.

Considerando o desempenho dos animais, bem como a sua adaptação ao exercício, os resultados demonstraram influência do exercício sobre os parâmetros hematológicos, a atividade de CK e AST, assim como sobre o marcador bioquímico para avaliação de estresse oxidativo. Esses resultados permitem concluir que o exercício de saltos produz ao longo dos anos alterações metabólicas clinicamente significativas, principalmente quando existe repetição das sessões de treinamento na rotina desses animais. Além disto, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico podem ser utilizadas como marcadores de estresse oxidativo em cavalos atletas. Os testes hematológicos, assim como as atividades das enzimas ligadas ao tecido muscular, se mostraram ferramentas fundamentais no monitoramento dos efeitos causados pelo exercício, em cavalos de salto.

## 6. REFERÊNCIAS

ART, T.; AMORY, H.; DESMECHT, D.; LEKEUX, P. Effect of show jumping on heart rate, blood lactate and other plasma biochemical values. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 9, p. 78 – 82, 1990.

AVELLINI, L.; CHIARADIA, E.; GAITI, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 123, p. 147 – 154, 1999.

BALOGH, N.; GAÁL, T.; RIBICZEYNÉ, P.S.; PETRI, Á. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 4, p. 214 – 218, 2001.

BASKURT, O.K.; MEISELMAN, H.J. Susceptibility of equine erythrocytes to oxidant-induced rheologic alterations, **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 10, p. 1301 – 1306, 1999.

BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 2-34.

CARLSON, G.P. Hematology and body fluids in the equine athlete: a review. In: GILLESPIE J.R.; ROBINSON N.E. (eds.) **Equine Exercise Physiology 2**. Davis: ICEEP Publications, p. 393-425, 1987.

CHIARADIA E.; AVELLINI L.; RUECA F.; SPATERNA A.; PORCIELLO F.; ANTONIONI M.T.; GAITI A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 119, p. 833–836, 1998.

DEATON, C.M.; MARLIN, D.J.; ROBERTS, C.A.; SMITH, N.; HARRIS, P.A.; KELLY, F.J.; SCHROTER, R.C. Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. **Equine Veterinary Journal Supplement**, n. 34, p. 58 – 65, 2002.

DOMINGUES JÚNIOR, M.; TOLEDO, P.S.; MANGONE, M.; MICHIMA, L.E.S.; FERNANDES, W.R. Avaliação das alterações hematológicas em cavalos da raça PSI submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **A Hora Veterinária**, v. 24, p. 41-44, 2004.

ESTEBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products. Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, n. 42, p. 407 – 421, 1990.

GARCIA, M.; GUZMAN, R.; CABEZAS, I.; MERINO, V.; PALMA, C.; PEREZ, R. Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas; **Archivos de Medicina Veterinaria**, n. 31; v.2; p. 212 – 228, 1999.

GÓMEZ, C.; PETRÓN, P.; ANDAUR, M.; PÉREZ, R.; MATAMOROS, R. Medición post-ejercicio de variables fisiológicas, hematológicas y bioquímicas em equinos de salto holsteiner. **Revista Científica**, v.14, n.3, p.244-253, 2004.

HARRIS, P.A.; MAYHEW, I.G. Musculoskeletal disease. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. (eds.) **Equine Internal Medicine**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p. 371 – 426.

HODGSON D.R.; ROSE R.J. Hematology and Biochemistry. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. (eds.) **The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1994, p 63 - 78.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986, 1221p.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993, 417 p.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.

KINNUNEN, S.; HYYPPÄ, S.; LAPPALAINEN, J.; OKSALA, N.; VENOJÄRVI, M.; NAKAO, C.; HÄNNINEN, O.; SEN, C. K.; ATALAY M. Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. **European Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 496 – 501, 2005.

KORHONEN, P.A.S.; LILIUS E.M.; HYYPPÄ, S.; RÄSÄNEN L.A.; PÖSÖ, A.R. Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in Standardbred trotters. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 47, p. 565 – 573, 2000.

KRAMER, J.W. Normal hematology of the horse. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Williams, 2000. p.1069-1074.

LARSON, H.J. **Introduction to probability theory and statistical inference**. 3 ed. United States of America: Wiley, 1982, 656 p.

LEKEUX, P.; ART, T.; LINDEN, A.; DESMECHT, D.; AMORY, H. Heart rate, hematological and serum biochemical responses to show jumping. **Equine Exercise Physiology**, v. 3, p. 385-390, 1991.

LOWRY, E.H.; ROSENBROUGH N.J.; FARR, L.L.; RANDDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, v. 1, p. 265-75, 1951.

LUMSDEN, J.H.; ROWE, R.; MULLEN, K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 44, p. 32 – 42, 1980.

MACHADO, L.P. **Eritrograma, glutaciona reduzida e superóxido dismutase eritrocitários e metahemoglobina em equinos da raça Árabe submetidos a exercícios em esteira: efeito da suplementação com vitamina E (dL-alfa-tocoferol)**. 98 f., 2006. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH, N.; DEATON, C.D.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; DUNSTER, C.; KELLY, F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1622S – 1627S, 2002.

MATOS, M.S.; MATOS P.F. **Laboratório clínico médico-veterinário**, 2 ed., Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988, 238 p.

McBRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J. Free radicals, exercise, and antioxidants. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 13, n. 2, p. 175–183, 1999.

McMENIMAN, N.P.; HINTZ, H.F. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 6, p. 482 - 484, 1992.

MILLS, P. C.; SMITH, N. C.; HARRIS, R. C.; HARRIS, P. Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. **Research in Veterinary Science**, v. 62, p. 11 – 16, 1997.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; OGISO, T. Antioxidant activity of adrenergic agents derived from catechol. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 2001 – 2006, 1998.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; MICHAUX, C.; CAYEUX, K.; DEFRAIGNE, J.; LEKEUX, P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy standardbred horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 1, n. 3, p. 211 – 220, 2004.

MOFFARTS, B.; PORTIER, K.; KIRSCHVINK, N.; COUDERT, J.; FELLMANN, N.; VAN ERCK, E.; LETELLIER, C.; MOTTA, C.; PINCEMAIL, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 113 – 121, 2007.

MUÑOZ-ESCASSI, B.; MARAÑÓN, G.; MANLEY, W.; SÁNCHEZ DE LA MUELA, M.; RIBER, C.; CASTEJON, F.; LEÓN, R.; GARCIA, C.; VARA, E. Exercise-induced changes on lipid peroxides and antioxidant enzyme level changes in plasma of show jumping and dressage horses. In: **Internacional Conference on Equine Exercise Physiology**, 2006, p 68 – 74.

OKINAKA, S.; KUMAGAI, H.; EBASHI, S.; SUGITA, H.; MOMOI, H.; TOYOKURA, Y.; FUJIE, Y. Serum creatine phosphokinase. Activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. **Archives of Neurology**, v. 4, p. 520–525, 1961.

PORTER, N.A. Chemistry of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 105, n. 32, p. 273 – 282, 1984.

PORTIER, K.; MOFFARTS, B.; FELLMAN, N.; KIRSCHVINK, N.; MOTTA, C.; LETELLIER, W.C.; RUELLAND, A.; VAN ERCK, E.; LEKEUX, P.; COUDER, J. The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.36, p. 279 – 284, 2006.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, p. 56-63, 1957.

REVINGTON, M. Haematology of the racing Thoroughbred 2: Haematological values compared to performance. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 145 – 148, 1983.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329 – 334, 1947.

SENTÜRK, U.K.; YALEIN, O.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; MEISELMAN, H.J.; BASKURT, O. K. Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects, **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 1272 – 1279, 2005.

SILVA, I.A.C.; DIAS R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Determinação das atividades séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em eqüinos de diferentes categorias de atividade. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.250-252, 2007.

SILVEIRA, V.F. **Malondialdeído, vitamina E, cortisol, hemograma e enzimas musculares em eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade**. 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SJÖDIN, B.; WESTING, Y.H.; APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 10, n. 4, p. 236 – 254, 1990.

SMITH, J.E.; ERICKSON, H.H.; DEBOWES, R.M.; CLARK, M. Changes in circulating equine erythrocytes induced by brief, high-speed exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 6, p. 444 – 446, 1989.

SNOW, D.H. Physiological factors affecting resting haematology. In: SNOW, D.H.; PERSSON, S.G.B.; ROSE, R.J. (eds.) **Equine Exercise Physiology**, Cambridge: Granta Editions, 1983, p. 318 – 323.

SPEIRS, V. C. **Clinical examination of horses**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, 358 p.

TOLEDO, P.S.; DOMINGUES JÚNIOR, M.; FERNANDES, W.R.; MAGONE M. Atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatina quinase, gama-glutamilttransferase, lactato desidrogenase e glicemia de cavalos da raça P.S.I. submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.8, n.2, p.73-77, 2001.

WHITAKER, J.F. A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH-NAD<sup>+</sup> system. **Clinica Chimica Acta**, v. 24; n. 1, p. 23-37, 1969.

WHITE, A.; ESTRADA, M.; WALKER, K.; WISNIA, P.; FILGUEIRA, G.; VALDÉS, F.; ARANEDA, O.; BEHN, C.; MARTÍNEZ R. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular e Integrative Physiology**, v. 128, n. 1, p. 99 – 104, 2001.

WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M.; SAKER, J.N.; WALDRON, J.N.; CRANDELL, K.M.; HOFFMAN, R.M.; HARRIS, P.A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 588 – 594, 2004.

### **3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E E SELÊNIO, COMO AGENTES ANTIOXIDANTES, SOBRE O QUADRO HEMATOLÓGICO, ENZIMAS MARCADORAS DE LESÃO MUSCULAR E ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, EM EQUÍNOS SUBMETIDOS À ATIVIDADE DE SALTO.**

#### **RESUMO**

Entre os mecanismos fisiopatológicos incriminados no aparecimento de lesões relacionadas ao exercício físico destacam-se as alterações dos constituintes sangüíneos bem como o envolvimento de produção de radicais livres, levando ao estresse oxidativo. Para a prevenção e tratamento de tais condições tem sido proposto o uso de suplementações a base de antioxidantes e entre eles destaca-se o tocoferol (vitamina E). O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da suplementação oral a base de vitamina E e selênio, como antioxidante, sobre o quadro hematológico, a atividade sérica de enzimas marcadoras de lesão muscular e o nível de substâncias derivadas da ação dos radicais livres sobre biomoléculas presentes na membrana de eritrócitos (TBARS) de cavalos, normalmente treinados e submetidos a uma prova de hipismo clássico, na modalidade salto. Para tanto, 20 cavalos foram distribuídos em dois grupos, onde em um deles foi administrado suplemento a base de vitamina E (2500 mg/dia) e selênio (300 mg/dia) por 45 dias (GT), enquanto o outro foi mantido como controle (GC). Foram colhidas amostras de sangue antes ( $T_R$ ) e após ( $T_0$ ) a realização do exercício e 6 ( $T_6$ ), 12 ( $T_{12}$ ) e 24 ( $T_{24}$ ), após o término da atividade de esforço. Foram avaliados os constituintes do hemograma, a atividade sérica das enzimas CK, AST e LDH e a concentração TBARS na membrana de eritrócitos. A suplementação utilizada apresentou efeito sobre alguns parâmetros do hemograma, onde o GT retornou aos níveis basais de número de hemácias e leucócitos, caracterizada por neutrofilia, em até 6 horas, sendo que no GC, tais valores retornaram aos níveis de repouso entre 12 e 24 horas; e para a AST, onde o GT retornou ao valor do repouso seis horas após a realização do exercício. No entanto não houve efeito da suplementação com vitamina E sobre as enzimas CK e LDH, bem como para o TBARS.

**Palavras-chave:** Fisiologia do exercício, Cavalo atleta, Estresse oxidativo, Vitamina E.

## ***SUMMARY***

Among the main physiopathological mechanisms in the appearance of injuries related to the physical exercise, the involvement of free radicals is very important, mainly oxygen reactive species. They can lead to hematological and biochemical alterations related to injuries mediated by the physical effort. For the prevention and treatment of such conditions, the use of antioxidant supplementation, like tocopherol (vitamin E) and selenium has been considered for training animals and competitions of high impact. The aim of this research was to evaluate the influence of vitamin E and selenium oral supplementation on hematological parameters, the seric activity of muscular enzymes and the level of substances derived from oxidative stress on erythrocyte membranes of horses normally trained and submitted to a show jumping test. For this purpose, 20 horses with these characteristics were divided in two groups. One of them (GT) received oral supplementation of vitamin E (2500 mg/day) and selenium (300 mg/day) for 45 days and another one was kept as control (GC). Both groups were submitted to a standardized test of show jumping and samples of blood were collected in rest, immediately after, and 6, 12 and 24 hours after the end of the activity. The constituents of the hemogram, the seric activity of enzymes CK, AST, and LDH, and the level of an oxidative stress marker (TBARS) in erythrocyte membranes were evaluated. The number of erythrocytes and leukocytes returned to basal levels in GT after 6 hours. In GC, such values returned to rest levels between 12 and 24 hours. Despite these results, it was not possible to demonstrate other significant differences in the analyzed parameters between the two groups.

**Key words:** Exercise, Horse, Oxidative stress, Vitamin E, Selenium.

## 1. INTRODUÇÃO

O exercício físico é responsável por induzir vários processos biológicos que causam efeitos benéficos ao organismo. Todavia, dependendo do tipo, intensidade, frequência e duração, ou seja, quando ultrapassam os limites fisiológicos tornam-se prejudiciais para o organismo, e um dos principais eventos conseqüentes destes é a produção de radicais livres ou Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (JI, 1999).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) relacionadas ao exercício foi demonstrada por Sjödin et al. (1990), e entre os seus efeitos deletérios potenciais destaca-se a indução de lesões teciduais pela oxidação dos componentes celulares tais como as membranas lipídicas, entre outras. Dessa forma, o estresse oxidativo induzido pelo exercício contribui para acelerar o processo de fadiga e lesão da fibra muscular, levando à intolerância ao exercício e queda de desempenho atlético (MOFFARTS et al., 2004).

Estudos atuais têm destacado a importância dos antioxidantes na prevenção do desenvolvimento de doenças em humanos, como também em animais (URSO e CLARKSON, 2003). Uma das principais estratégias sugeridas para a prevenção do surgimento de estresse oxidativo oriundo do exercício, é a suplementação dietética com substâncias antioxidantes, com o objetivo de neutralizar a produção de EROs, e assim o desenvolvimento de lesões oxidativas. A vitamina E, desde o seu descobrimento em 1925, é o principal antioxidante biológico associado ao estresse oxidativo causado pelo exercício. Além disso, o selênio também tem sido utilizado como suplemento por fazer parte do sistema da glutathiona, que é um importante mecanismo antioxidante enzimático (WILLIAMS e CARLUCCI, 2006).

O estresse oxidativo oriundo do exercício determina alterações hematológicas, uma vez que foi demonstrado aumento da atividade peroxidativa dos leucócitos após sessão de exercícios (KORHONEN et al., 2000), como também alterações mecânicas nos eritrócitos oriundas de lesões das membranas determinadas pela ação de radicais livres, ao gerar diminuição da fluidez eritrocitária (BASKURT e MEISELMAN, 1999; PORTIER et al., 2006; MOFFARTS et al., 2007). Isto afeta a microcirculação da musculatura, causando lesão tecidual e conseqüentemente aumento da atividade das enzimas ligadas à lesão muscular (SENTÜRK et al, 2005).

Um dos modelos utilizados para estudo do efeito da suplementação como antioxidantes na alimentação de atletas é através da avaliação de sua influência sobre os constituintes sangüíneos e a atividade de enzimas musculares e de marcadores de estresse oxidativo. E nesse sentido já foram realizadas pesquisas em atletas humanos (VÁZQUEZ, 2002), bem como em cavalos de esporte, em teste de campo (WILLIAMS et al, 2004a) como em condições experimentais (SILVEIRA, 2005).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da suplementação oral de vitamina E e selênio como antioxidante, avaliando-se o quadro hematológico, a atividade de marcadores bioquímicos séricos de lesão muscular (Aspartato aminotransferase - AST, Creatinaquinase - CK e Lactato desidrogenase - LDH) e a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, em membranas de eritrócitos de cavalos atletas, mantidos na Região

Metropolitana de Salvador – BA, submetidos à prova de Hipismo Clássico, na modalidade de salto, sob condições naturais de competição.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

O grupo de animais utilizados para o experimento foi constituído por 20 equinos da raça Brasileira de Hipismo (BH), procedentes de clube eqüestre do Município de Salvador, mantidos em treinamento para provas de hipismo clássico. Os animais encontravam-se clinicamente saudáveis, com idade compreendida entre oito e 12 anos, com peso médio de 450 kg e diuturnamente submetidos a manejo sanitário e nutricional semelhantes, para provas de Hipismo Clássico, que incluía vermifugações a cada três meses, vacinação semestral contra as principais enfermidades infecto-contagiosas para equinos: Gripe Equina, Tétano e Encefalomielite Equina; além de vacinação anual contra a Raiva. A alimentação dos animais foi constituída por: água *ad libitum*, 7,5 kg de feno de capim Coast Cross (*Cynodon dactylon*), 7,5 kg de capim Elefante (*Pennisetum hybridum*) e ração comercial, a qual era ofertada na proporção de 1 a 1,5 % por kg de peso vivo, dividindo-a em duas refeições.

Todos os animais encontravam-se há mais de 120 dias sob regime de treinamento físico e técnico para provas de hipismo, o qual era constituído de três a quatro sessões de treinamento físico (passo, trote, galope) e uma a duas sessões de saltos, com descanso semanal, sem utilização de medicamentos no mesmo período. Ao final foram realizados exames físicos e hematológicos para certificar-se do estado clínico dos animais.

### 2.2 Delineamento experimental

Após um período de 90 dias de padronização do manejo alimentar e de treinamento, e 30 dias após a realização de uma prova de hipismo clássico, 20 animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos (grupo controle e grupo teste), constituídos cada um destes por 10 animais. Para o grupo teste foi adicionada à dieta produto à base de vitamina E e selênio por um período de 45 dias. A quantidade de suplemento adicionado à ração foi de 20 gramas por dia, dividida em duas administrações de 10 gramas, o que representa um total de 2500 mg de Vitamina E e 300 mg de selênio, diariamente, seguindo-se as orientações do fabricante, e observando-se no cocho, a total ingestão do produto pelos animais.

Quarenta e cinco dias após o período de suplementação, os 20 animais foram submetidos ao desafio que se constituiu de uma prova de hipismo clássico na categoria de 1,00 metro de altura. O tempo de aquecimento, o número de obstáculos bem como o grau de dificuldade foi padronizado e composto por 25 minutos de aquecimento, sendo 10 minutos ao passo, 10 ao trote e cinco minutos de galope com um total de seis saltos de preparação. A prova foi constituída de dupla passagem por uma pista de nove obstáculos, perfazendo um total de 18 saltos com duração de cerca de três minutos.

Dos dois grupos experimentais foram colhidas amostras de sangue com os animais ainda em repouso ( $T_R$ ), imediatamente após término do exercício ( $T_0$ ), e seis ( $T_6$ ), 12 ( $T_{12}$ ) e 24 ( $T_{24}$ ) horas, após a realização da prova hípica para avaliação do hemograma,

da atividade de enzimas marcadoras de lesão muscular (AST, CK e LDH) e do índice de peroxidação de biomoléculas (TBARS).

### 2.3 Colheita do material

Por punção da veia jugular externa foram colhidas duas amostras de sangue de cada animal, em tubos a vácuo contendo sal trissódico do ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA  $k_3$ ) a 10%, desta 5ml foi destinada às análises dos constituintes do hemograma e a outra também de 5 ml para a obtenção de hemolizado para a determinação das TBARS. Essas amostras foram acondicionadas sob refrigeração e imediatamente remetidas ao Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais Domésticos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (EMEV – UFBA), onde foram processadas. Para avaliação das atividades das enzimas moduladoras de lesão muscular - CK, AST e LDH, 10 ml de sangue foram colhidos em tubos sem EDTA, e em seguida mantidos em repouso à temperatura ambiente, para a retração do coágulo e obtenção do soro, o qual foi congelado a  $-40^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização das provas laboratoriais.

### 2.4 Análises laboratoriais

Foram realizados os exames que compõem o hemograma (eritrograma e leucograma), análises de proteínas plasmáticas totais, fibrinogênio plasmático, avaliação da atividade sérica de CK, AST, LDH e o índice de peroxidação de biomoléculas nas membranas de eritrócitos pela quantificação dos TBARS através da reação do TBA.

Realizou-se a contagem do número de eritrócitos em câmara de Neubauer, utilizando-se o líquido de Gower numa proporção de 1:200 como solução diluidora e o resultado foi expresso em número de células  $\times 10^6/\mu\text{L}$ . A técnica utilizada para a determinação do volume globular foi a do microhematócrito, usando-se tubos capilares de diâmetros homogêneos de 1mm e 7 mm, preenchidos com sangue até dois terços do seu volume, que após fechamento com massa específica, foram centrifugados durante cinco minutos, com uma força de 12000 G, e o resultado foi expresso em porcentagem (%). A concentração de hemoglobina foi determinada por meio do método da cianometahemoglobina, empregando-se o líquido de Drabkin, sendo expressa em  $g/dL$ . A determinação dos índices hematimétricos absolutos, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), e concentração da hemoglobina globular média (CHGM) foram calculados por meio dos dados obtidos da contagem do número de hemácias (He); concentração de hemoglobina (Hb) e determinação do volume globular (VG), conforme descritos por Birgel (1982), e os resultados expressos, respectivamente em fentolitros ( $fL$ ), picogramas ( $pg$ ) e porcentagem (%).

Para a contagem do número total de leucócitos, expresso em número de células/ $\mu\text{L}$ , adicionou-se 20 $\mu\text{l}$  de sangue total em 400 $\mu\text{l}$  de solução a 4% de ácido acético para posterior contagem em câmara de Neubauer. A seguir a contagem diferencial dos leucócitos foi realizado confeccionando-se esfregaços sangüíneos, corados pelo corante de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947), segundo recomenda Birgel (1982). Em cada esfregaço sangüíneo foram diferenciados 100 leucócitos, classificados de acordo com as suas características tintoriais em: neutrófilos, com núcleos em bastão e com núcleo segmentado, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos, apresentando-se o resultado

em números relativos; e os números absolutos de cada tipo de leucócito foram obtidos por cálculos matemáticos, e expressos em número de *células/μL* (MATOS e MATOS, 1988).

A concentração das proteínas totais foi realizada pelo método refratométrico, expressando-se os resultados em *g/dL* e o fibrinogênio plasmático foi também determinado por método refratométrico, após tratamento térmico do plasma, segundo preconizado por Jain (1993), expressando-se os resultados em *mg/dL*.

As determinações das atividades das enzimas foram realizadas através de sistema colorimétrico, utilizando-se kits comerciais, onde para a CK seguiu-se a técnica descrita por Okinaka *et al.* (1961); da AST a metodologia descrita por Reitman e Frankel (1957) e da LDH conforme descrito por Whitaker (1969).

O índice de peroxidação de biomoléculas, principalmente lipídios, foi avaliado pelo teor de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA), denominadas de TBARS, em membranas de eritrócitos, descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Para a determinação de proteínas nas amostras utilizou-se o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). As concentrações de TBARS foram expressos em *nM/mg de proteína* (MIURA *et al.*, 1998).

A determinação da concentração de vitamina E foi realizada em amostras de soro, as quais foram congeladas e remetidas para o Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina da Universidade Paulista de Ribeirão Preto – SP, pela utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em fluoroscopia de acordo com a metodologia descrita por Arnaud *et al.* (1991).

## **2.5 Análise estatística**

O efeito do exercício foi analisado comparando-se os dados obtidos antes do exercício com os dados a cada tempo após o exercício pelo teste *t* pareado ou o teste não paramétrico de Wilcoxon. O efeito do tempo após o exercício foi analisado pelo teste de análise de variância (ANOVA) unilateral ou pelo teste de ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguidos do método de Student-Newman-Keuls. A comparação entre os dados do GC e do GT nos diferentes momentos foi realizada pelo teste *t*, quando esses mostraram distribuição normal. Quando o teste de normalidade falhou a comparação entre os grupos foi feita pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Verificou-se a existência de correlação entre os diferentes parâmetros, utilizando-se o teste de Pearson ou o de Spearman. Dados comparados que apresentaram valores de  $p < 0,05$  foram considerados como sendo significativamente diferentes. utilizando-se o programa SigmaStat (LARSON, 1982).

### 3. RESULTADOS

Os resultados dos valores das médias, dos desvios-padrão, medianas, percentis 25 e 75 dos constituintes sanguíneos, e dos parâmetros bioquímicos obtidos e utilizados para avaliação da influência da suplementação com vitamina E e selênio, como antioxidante, sobre o estresse oxidativo produzido pelo exercício em equinos, na modalidade salto, estão apresentados nas tabelas de 8 a 13.

Na tabela 8 foi possível verificar que a suplementação oferecida aos animais foi capaz de determinar um aumento significativo dos níveis séricos de vitamina E, ao se comparar os valores de médias obtidos antes e após a introdução do suplemento vitamínico na dieta no GC ( $11,56 \pm 2,57$  e  $11,13 \pm \mu\text{mol/L}$ ) e no GT ( $11,98 \pm 3,09$  e  $14,72 \pm 2,24 \mu\text{mol/L}$ ), respectivamente.

As tabelas 9 e 10, além da figura 7 (letras A a E), mostram os resultados do eritrograma, PPT e fibrinogênio. O número de hemácias, o volume globular, a concentração de hemoglobina, foram maiores e estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) imediatamente após o exercício ( $T_0$ ) nos dois grupos, refletindo também sobre os valores dos índices hematimétricos VGM e HGM.

Ao se analisar os valores das médias obtidas para o número de hemácias no  $T_{12}$  entre os dois grupos, observou-se que o GT obteve menor valor ( $7,56 \pm 0,87 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) que o GC ( $8,62 \pm 1,16 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), demonstrando o efeito da suplementação com vitamina E neste grupo. Além disso, ao se avaliar o efeito ao tempo em cada grupo no GT houve uma diminuição gradativa do número de hemácias e o retorno ao valor basal seis horas após o exercício ( $T_6$ ), enquanto que no GC este retorno ocorreu somente 24 horas após este ( $T_{24}$ ). Fato semelhante foi também observado na dinâmica da concentração de hemoglobina.

Nos esfregaços sanguíneos confeccionados não foram encontradas alterações morfológicas das hemácias.

Na análise dos resultados das PPT observa-se a influência do exercício nos dois grupos, caracterizado pelas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de médias obtidos antes ( $T_R$ ) e após ( $T_0$ ) o exercício. Com relação ao efeito do tempo em cada grupo o GT retornou ao valor basal 12 horas após a realização do exercício ( $T_{12}$ ), enquanto que no GC este retorno só ocorreu 24 horas ( $T_{24}$ ) após a realização do exercício, indicando a influência da suplementação com o  $\alpha$ -tocoferol e selênio na dieta. Com relação ao fibrinogênio não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, como também em relação ao tempo dentro de cada grupo avaliado.

Nas tabelas 11 e 12, assim como a figura 7 (letra F), apresentam-se os resultados do leucograma, demonstrando que o exercício causou efeito sobre o número de leucócitos totais no GC, uma vez que houve aumento significativo no  $T_R$  ( $8,89 \pm 1,61 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) em relação ao  $T_0$  ( $11,38 \pm 1,33 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), enquanto que no GT houve um aumento de pequena magnitude, que não foi estatisticamente significativo.

O número absoluto de neutrófilos obtidos no GC aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) imediatamente após o exercício ( $T_0$ ), retornando aos valores de repouso no  $T_6$ ,

enquanto que no GT este aumento ao longo do tempo foi de baixa magnitude e, portanto sem diferenças estatisticamente significativas.

A tabela 13 e a figura 8 expõem os resultados das análises bioquímicas (CK, AST e LDH) no GC e no GT, evidenciando-se a influência do exercício sobre as atividades das enzimas marcadoras de lesão músculo-esquelética (CK e AST), bem como sobre o índice de peroxidação de biomoléculas, avaliado pelo teor de substâncias reativas do TBARS em membranas das hemácias, sendo estes estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). Os valores de médias obtidos após a realização do exercício ( $T_0$ ) foram maiores do que os da fase de repouso ( $T_R$ ).

A atividade da CK não apresentou diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os grupos como também na avaliação do efeito do tempo dentro de cada grupo ao se avaliar a influência da suplementação da dieta de vitamina E e selênio. No entanto na avaliação da AST, o valor das médias entre os grupos, seis horas após a realização do exercício, foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), onde o GC ainda apresentava a influência do exercício, enquanto o GT já havia retornado ao valor basal, caracterizando assim o efeito da suplementação na dieta dos animais.

Na avaliação do TBARS observa-se que o retorno aos valores basais para ambos os grupos ocorreram 24 horas após a realização do exercício, demonstrando que a suplementação adicionada à dieta dos animais não apresentou influência que possam ser detectadas pelo TBARS.

**Tabela 8.** Dados sobre a concentração sérica de vitamina E ( $\mu\text{mol/L}$ ) de eqüinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e após o período de suplementação. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

	Grupo Controle	Grupo Teste
Antes da Suplementação	11,56 <sup>a</sup> $\pm$ 2,57 11,40; 9,90; 12,50	11,13 <sup>a</sup> $\pm$ 2,00 11,40; 10,60; 12,40
Após a Suplementação	11,98 <sup>a</sup> $\pm$ 3,09 11,50; 9,80; 14,10	14,72 <sup>b</sup> $\pm$ 2,24 14,40; 13,20; 15,70

Letras diferentes em linha significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes em coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9.** Dados sobre o número de hemácias (He) ( $\times 10^6/\mu L$ ), volume globular (VG) (%), e concentração hemoglobina (g/dL) obtidos de equínos submetidos à prova de Hipismo Clássico da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

Grupo		He ( $\times 10^6/\mu L$ )	VG (%)	Hb (g/dL)
T <sub>R</sub>	Controle	7,62 $\pm$ 1,31 7,40; 7,07; 8,31	31,30 $\pm$ 2,26 30,5; 30,0; 34,0	11,50 $\pm$ 0,94 11,2; 10,7; 12,6
	Teste	7,62 $\pm$ 1,03 7,61; 6,84; 8,20	30,50 $\pm$ 2,80 30,5; 29,0; 33,0	11,60 $\pm$ 1,00 11,9; 11,0; 12,2
T <sub>0</sub>	Controle	10,48 <sup>a</sup> $\pm$ 1,90 10,54; 8,92; 11,08	40,00 <sup>a</sup> $\pm$ 4,02 40,5; 38,0; 43,0	14,10 <sup>a</sup> $\pm$ 0,85 13,8; 13,4; 14,7
	Teste	11,68 <sup>a</sup> $\pm$ 1,06 11,78; 10,95; 12,53	38,60 <sup>a</sup> $\pm$ 5,45 39,0; 35,0; 43,0	15,20 <sup>a</sup> $\pm$ 1,50 15,5; 13,8; 16,1
T <sub>6</sub>	Controle	8,21 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,92 8,00; 7,61; 8,83	34,20 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,34 34,5; 32,0; 36,0	13,25 <sup>a</sup> $\pm$ 1,04 13,4; 12,8; 13,6
	Teste	7,87 <sup>b</sup> $\pm$ 0,95 7,52; 7,10; 8,76	33,80 <sup>a</sup> $\pm$ 1,68 34,5 <sup>b</sup> ; 32,0; 35,0	12,60 <sup>b</sup> $\pm$ 1,00 12,4; 11,7; 13,5
T <sub>12</sub>	Controle	8,62 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,16 8,71; 7,69; 9,64	34,90 <sup>b</sup> $\pm$ 3,63 35,0 <sup>b</sup> ; 32,0; 37,0	13,18 <sup>a</sup> $\pm$ 1,48 12,70; 12,2; 13,6
	Teste	7,56 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,87 7,52; 7,01; 7,95	33,30 $\pm$ 1,40 33,5 <sup>ab</sup> ; 33,0; 34,0	12,63 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,75 12,8; 12,0; 13,3
T <sub>24</sub>	Controle	7,55 <sup>b</sup> $\pm$ 1,23 7,35; 7,06; 8,13	31,50 <sup>b</sup> $\pm$ 2,41 31,50; 31,0; 33,0	11,53 <sup>b</sup> $\pm$ 0,58 11,4; 10,9; 12,2
	Teste	7,47 <sup>b</sup> $\pm$ 0,92 7,46; 6,88; 7,89	30,60 $\pm$ 2,90 30,5 <sup>b</sup> ; 28,0; 33,0	11,65 <sup>b</sup> $\pm$ 0,90 11,7; 11,1; 12,2

<sup>a</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>R</sub> no mesmo grupo. <sup>b</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>0</sub> no mesmo grupo. <sup>c</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparando GT com GC.

**Tabela 10.** Dados sobre as proteínas plasmáticas totais (PPT) (*g/dL*), fibrinogênio (*mg/dL*), volume globular médio (VGM) (*fL*), hemoglobina globular média (HGM) (*pg*) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) (%) obtidos de equinos submetidos à prova de Hipismo Clássico da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

	Grupo	VGM ( <i>fL</i> )	HGM ( <i>pg</i> )	CHGM (%)	PPT ( <i>g/dL</i> )	Fb ( <i>mg/dL</i> )
T <sub>R</sub>	Controle	41,75 $\pm$ 4,70 41,50; 39,70; 45,80	15,35 $\pm$ 2,02 14,80; 14,10; 16,30	36,77 $\pm$ 2,62 37,30; 35,70; 38,40	7,00 $\pm$ 0,23 7,05; 6,80; 7,20	250,00 $\pm$ 97,18 200,0; 200,0; 300,0
	Teste	40,40 $\pm$ 4,77 40,70; 38,50; 44,00	15,37 $\pm$ 1,80 15,70; 14,30; 16,10	38,15 $\pm$ 3,15 38,60; 36,00; 39,70	7,33 <sup>c</sup> $\pm$ 0,22 7,35; 7,20; 7,50	310,00 $\pm$ 145,00 300,0; 200,0; 400,0
T <sub>0</sub>	Controle	39,21 $\pm$ 8,05 38,70; 33,50; 44,80	13,75 $\pm$ 2,22 13,50; 12,00; 15,00	35,60 $\pm$ 4,68 34,70; 33,50; 36,70	7,40 $\pm$ 0,34 7,40 <sup>a</sup> ; 7,20; 7,60	350,00 $\pm$ 84,98 350,0; 300,0; 400,0
	Teste	33,20 <sup>a</sup> $\pm$ 4,89 34,10; 30,50; 36,10	13,07 <sup>a</sup> $\pm$ 1,48 13,20; 12,50; 14,00	39,90 <sup>c</sup> $\pm$ 5,60 39,10; 38,10; 41,20	7,63 <sup>a</sup> $\pm$ 0,30 7,70; 7,40; 7,80	400,00 $\pm$ 163,30 400,0; 300,0; 400,0
T <sub>6</sub>	Controle	42,00 $\pm$ 4,65 43,00; 39,60; 45,10	16,35 $\pm$ 2,38 16,70; 15,40; 18,00	38,80 $\pm$ 2,43 38,40; 37,20; 39,30	7,44 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25 7,40; 7,30; 7,60	340,00 $\pm$ 142,98 350,0; 200,0; 400,0
	Teste	43,42 <sup>b</sup> $\pm$ 5,30 44,10; 39,80; 48,10	16,26 $\pm$ 2,85 16,60; 12,50; 14,00	37,25 $\pm$ 2,75 38,30; 34,50; 38,60	7,55 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25 7,50; 7,40; 7,80	330,00 $\pm$ 141,80 300,0; 200,0; 400,0
T <sub>12</sub>	Controle	40,85 $\pm$ 4,95 40,30; 38,40; 44,00	15,40 $\pm$ 1,50 15,30; 14,60; 15,70	38,00 $\pm$ 4,37 37,30; 35,20; 41,50	7,19 $\pm$ 0,31 7,10 <sup>a</sup> ; 7,00; 7,40	300,00 $\pm$ 81,65 300,0; 200,0; 400,0
	Teste	44,45 <sup>ab</sup> $\pm$ 4,24 43,40; 42,20; 48,50	16,90 $\pm$ 2,20 16,10; 15,30; 18,50	37,95 $\pm$ 1,83 37,80; 36,50; 38,40	7,50 <sup>c</sup> $\pm$ 0,31 7,50; 7,20; 7,80	350,00 $\pm$ 85,00 350,0; 300,0; 400,0
T <sub>24</sub>	Controle	42,41 $\pm$ 5,70 42,50; 40,00; 47,00	15,57 $\pm$ 2,50 14,90; 13,90; 16,30	36,85 $\pm$ 4,20 37,40; 33,80; 38,30	7,08 <sup>b</sup> $\pm$ 0,26 7,10; 7,00; 7,20	250,00 $\pm$ 70,71 200,0; 200,0; 300,0
	Teste	41,30 <sup>b</sup> $\pm$ 4,75 41,50; 38,80; 44,90	15,70 <sup>a</sup> $\pm$ 1,56 16,10; 14,60; 16,20	38,10 $\pm$ 3,11 37,70; 36,00; 39,80	7,32 <sup>b</sup> $\pm$ 0,26 7,30; 7,1,0; 7,50	310,00 $\pm$ 87,55 300,0; 200,0; 400,0

<sup>a</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>R</sub> no mesmo grupo. <sup>b</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>0</sub> no mesmo grupo. <sup>c</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparando GT com GC.

**Tabela 11.** Dados sobre os constituintes do leucograma de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício de Hipismo Clássico, distribuídos segundo os valores absolutos (*células*  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

	Grupo	LT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Seg ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Linf ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Mon ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Eos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Bas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )
$T_R$	Controle	8,89 $\pm$ 1,61 9,25; 7,70; 9,85	5,62 $\pm$ 1,41 5,76; 4,73; 6,41	2,85 $\pm$ 0,85 2,72; 2,11; 3,48	0,14 $\pm$ 0,06 0,13; 0,09; 0,19	0,23 $\pm$ 0,11 0,25; 0,09; 0,31	0,04 $\pm$ 0,06 0,0; 0,0; 0,1
	Teste	9,61 $\pm$ 1,24 9,75; 8,60; 10,40	6,30 $\pm$ 0,82 5,97; 5,78; 6,43	3,05 $\pm$ 0,86 2,70; 2,51; 3,83	0,15 $\pm$ 0,05 0,13; 0,09; 0,20	0,18 $\pm$ 0,13 0,20; 0,12; 0,29	0,01 $\pm$ 0,03 0,0; 0,0; 0,0
$T_0$	Controle	11,38 <sup>a</sup> $\pm$ 1,33 11,63; 10,55; 12,35	7,06 <sup>a</sup> $\pm$ 1,14 6,91; 6,33; 7,90	3,90 <sup>a</sup> $\pm$ 0,63 3,96; 3,60; 4,20	0,20 $\pm$ 0,08 0,22; 0,12; 0,24	0,20 $\pm$ 0,12 0,19; 0,12; 0,24	0,01 $\pm$ 0,04 0,0; 0,0; 0,00
	Teste	10,93 $\pm$ 2,85 9,75; 8,66; 13,20	6,70 $\pm$ 1,47 6,09; 5,71; 7,89	3,80 <sup>a</sup> $\pm$ 1,46 3,52; 2,61; 5,00	0,14 $\pm$ 0,11 0,13; 0,08; 0,18	0,22 $\pm$ 0,20 0,21; 0,00; 0,31	0,05 $\pm$ 0,09 0,0; 0,0; 0,16
$T_6$	Controle	9,57 <sup>b</sup> $\pm$ 0,80 9,73; 8,95; 10,00	6,10 $\pm$ 0,82 6,00; 5,61; 6,48	3,04 $\pm$ 0,57 2,96; 2,72; 3,50	0,19 $\pm$ 0,08 0,19; 0,09; 0,29	0,20 $\pm$ 0,14 0,20; 0,08; 0,30	0,02 $\pm$ 0,04 0,0; 0,0; 0,08
	Teste	9,77 $\pm$ 2,17 9,65; 8,65; 10,80	6,17 $\pm$ 1,55 6,07; 4,72; 7,22	3,16 $\pm$ 1,03 3,02; 2,24; 3,81	0,16 $\pm$ 0,09 0,18; 0,08; 0,22	0,20 $\pm$ 0,13 0,26; 0,11; 0,29	0,05 $\pm$ 0,06 0,04; 0,0; 0,11
$T_{12}$	Controle	10,13 <sup>b</sup> $\pm$ 1,23 10,23; 9,75; 10,95	6,15 $\pm$ 0,85 6,05; 5,83; 6,58	3,52 <sup>a</sup> $\pm$ 0,94 3,73; 2,55; 4,44	0,21 $\pm$ 0,11 0,21; 0,01; 0,32	0,21 $\pm$ 0,13 0,21; 0,10; 0,33	0,02 $\pm$ 0,04 0,0; 0,0; 0,07
	Teste	9,94 $\pm$ 2,12 10,00; 9,30; 10,70	5,83 $\pm$ 1,17 6,05; 5,02; 6,22	3,56 $\pm$ 0,84 3,54; 3,35; 3,84	0,20 $\pm$ 0,09 0,20; 0,10; 0,29	0,26 $\pm$ 0,20 0,22; 0,14; 0,37	0,01 $\pm$ 0,04 0,0; 0,0; 0,0
$T_{24}$	Controle	8,95 <sup>b</sup> $\pm$ 1,57 9,13; 7,90; 9,75	5,67 <sup>b</sup> $\pm$ 1,25 5,95; 4,51; 6,61	2,82 $\pm$ 0,70 2,83; 2,21; 3,12	0,16 $\pm$ 0,07 0,17; 0,09; 0,22	0,22 $\pm$ 0,10 0,23; 0,09; 0,29	0,05 $\pm$ 0,07 0,0; 0,0; 0,1
	Teste	9,55 $\pm$ 1,10 9,80; 8,45; 10,60	6,26 $\pm$ 0,64 6,08; 5,74; 6,73	2,95 $\pm$ 0,73 2,86; 2,35; 3,76	0,15 $\pm$ 0,09 0,13; 0,08; 0,21	0,22 $\pm$ 0,13 0,20; 0,11; 0,31	0,01 $\pm$ 0,03 0,0; 0,0; 0,0

<sup>a</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento  $T_R$  no mesmo grupo. <sup>b</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento  $T_0$  no mesmo grupo. <sup>c</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparando GT com GC.

**Tabela 12.** Dados sobre os constituintes do leucograma de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós-exercício de Hipismo Clássico, distribuídos segundo os valores relativos (%). Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

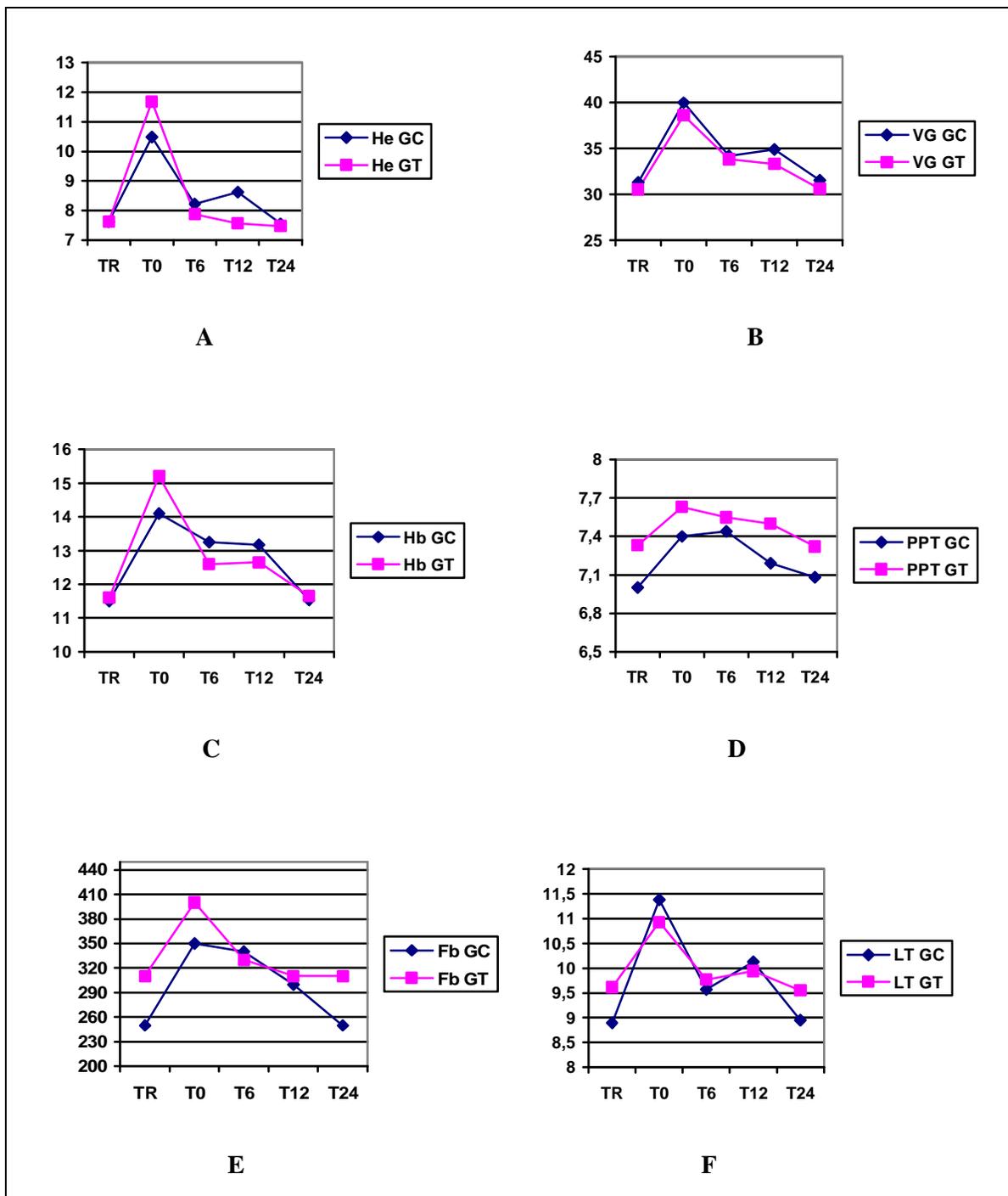
	Grupo	Seg (%)	Linf (%)	Mon (%)	Eos (%)	Bas (%)
T <sub>R</sub>	Controle	62,80 $\pm$ 9,10 61,5; 56,0; 70,0	32,30 $\pm$ 8,28 32,5; 26,0; 37,0	1,70 $\pm$ 0,82 1,50; 1,00; 2,00	2,60 $\pm$ 1,20 3,0; 1,0; 4,0	0,60 $\pm$ 0,84 0,00; 0,00; 1,00
	Teste	65,70 $\pm$ 5,70 67,5; 63,0; 69,0	31,30 $\pm$ 5,40 30,5; 26,0; 37,0	1,50 $\pm$ 0,52 1,5; 1,0; 2,0	2,00 $\pm$ 1,33 2,0; 1,0; 3,0	0,10 $\pm$ 0,31 0,0; 0,0; 0,0
T <sub>0</sub>	Controle	61,90 $\pm$ 5,20 62,5; 58,0; 64,0	34,40 $\pm$ 4,70 34,0; 32,0; 36,0	1,80 $\pm$ 0,63 2,00; 1,00; 2,00	1,70 $\pm$ 1,05 2,0; 1,0; 2,0	0,20 $\pm$ 0,42 0,0; 0,0; 0,0
	Teste	62,00 $\pm$ 6,60 60,0; 56,0; 68,0	34,00 $\pm$ 6,34 36,0; 28,0; 38,0	1,30 $\pm$ 0,82 1,5; 1,0 2,0	2,10 $\pm$ 2,07 2,0; 0,0; 3,0	0,50 $\pm$ 0,97 0,0; 0,0; 1,0
T <sub>6</sub>	Controle	63,70 $\pm$ 6,55 63,5; 59,0; 66,0	32,00 $\pm$ 5,95 33,5; 28,0; 36,0	2,00 $\pm$ 0,80 2,00; 1,00; 3,00	2,10 $\pm$ 1,37 2,0; 1,0; 3,0	0,30 $\pm$ 0,48 0,00; 0,00; 1,00
	Teste	63,20 $\pm$ 7,17 62,00; 60,0; 67,0	32,20 $\pm$ 6,80 33,0; 27,0; 35,0	1,60 $\pm$ 0,84 2,0; 1,0 2,0	2,20 $\pm$ 1,55 2,5; 1,0; 3,0	0,70 $\pm$ 0,82 0,5; 0,0; 1,0
T <sub>12</sub>	Controle	61,00 $\pm$ 7,70 59,50; 54,0; 64,0	34,50 $\pm$ 6,95 35,0; 31,0; 40,0	2,10 $\pm$ 1,00 2,50; 1,00; 3,00	2,10 $\pm$ 1,20 2,0; 1,0; 3,0	0,30 $\pm$ 0,48 0,00; 0,00; 1,00
	Teste	58,90 <sup>a</sup> $\pm$ 2,95 59,0; 57,0; 61,0	35,70 $\pm$ 3,26 34,5; 33,0; 38,0	2,00 $\pm$ 0,81 2,0; 1,0; 3,0	2,60 $\pm$ 1,65 2,0; 2,0; 4,0	0,10 $\pm$ 0,31 0,0; 0,0; 0,0
T <sub>24</sub>	Controle	63,20 $\pm$ 6,45 63,50; 58,0; 70,0	31,80 $\pm$ 5,85 31,5; 28,0; 37,0	1,90 $\pm$ 0,87 2,00; 1,00; 3,00	2,50 $\pm$ 1,27 2,5; 1,0; 4,0	0,60 $\pm$ 0,84 0,00; 0,00; 1,00
	Teste	65,70 $\pm$ 4,95 66,5; 65,0; 70,0	30,60 $\pm$ 4,75 30,0; 26,0; 35,0	1,60 $\pm$ 0,96 1,5; 1,0; 2,0	2,20 $\pm$ 1,23 2,5; 1,0; 3,0	0,10 $\pm$ 0,31 0,0; 0,0; 0,0

<sup>a</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>R</sub> no mesmo grupo. <sup>b</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>0</sub> no mesmo grupo. <sup>c</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparando GT com GC.

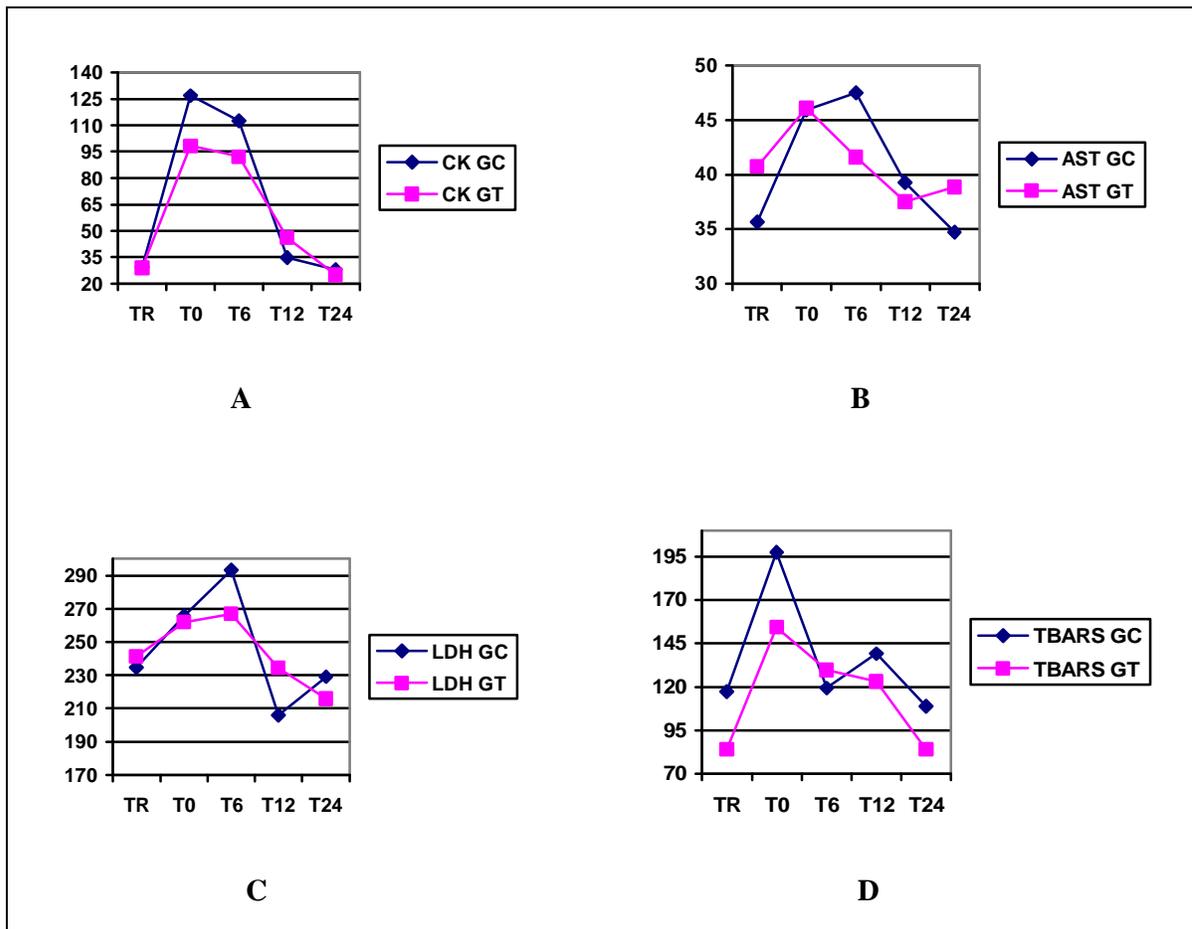
**Tabela 13.** Dados sobre a atividade das enzimas Creatina Quinase (CK), Aspartato Aminotransferase (AST), Lactato Desidrogenase (LDH) em *UI/L* e dos níveis de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em membrana de hemácias, expressos em *nM/mg de proteína*, de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, no Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC), antes e nos diferentes tempos pós exercício de Hipismo Clássico. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75 para todos os grupos. Salvador, 2008.

	Grupo	CK ( <i>UI/L</i> )	AST ( <i>UI/L</i> )	LDH ( <i>UI/L</i> )	TBARS ( <i>nM/mg de ptn</i> )
T <sub>R</sub>	Controle	29,21 $\pm$ 15,50 28,90; 22,20; 40,0	35,66 $\pm$ 6,38 36,40; 29,40; 41,90	234,69 $\pm$ 87,48 210,9; 201,0; 308,5	117,30 $\pm$ 66,27 105,80; 76,90; 153,80
	Teste	28,84 $\pm$ 21,82 16,50; 14,70; 45,20	40,73 $\pm$ 5,97 39,10; 36,60; 42,40	241,36 $\pm$ 51,00 247,8; 214,2; 261,0	83,97 $\pm$ 29,21 86,50; 70,50; 109,00
T <sub>0</sub>	Controle	126,96 <sup>a</sup> $\pm$ 42,22 128,20; 96,70; 164,10	45,93 <sup>a</sup> $\pm$ 3,14 46,00; 44,3; 48,20	265,53 $\pm$ 49,96 253,0; 247,4; 287,6	197,43 $\pm$ 81,12 189,10 <sup>c</sup> ; 147,40; 211,50
	Teste	98,31 <sup>a</sup> $\pm$ 36,57 86,50; 76,70; 109,30	46,07 <sup>a</sup> $\pm$ 6,76 43,60; 41,50; 51,10	261,88 $\pm$ 84,25 238,9; 197,7; 320,3	154,4 <sup>a</sup> $\pm$ 47,34 157,10; 121,80; 198,70
T <sub>6</sub>	Controle	112,63 <sup>a</sup> $\pm$ 48,77 108,00; 79,80; 141,10	47,52 <sup>a</sup> $\pm$ 4,53 47,20; 45,30; 49,60	293,39 $\pm$ 87,95 272,2; 244,9; 355,8	119,23 <sup>b</sup> $\pm$ 49,11 118,60; 76,90; 147,40
	Teste	92,12 <sup>a</sup> $\pm$ 31,71 102,90; 68,3; 111,60	41,60 <sup>c</sup> $\pm$ 4,53 39,50 <sup>b</sup> ; 39,00; 45,30	266,84 $\pm$ 63,76 246,9; 222,9; 308,4	129,5 <sup>a</sup> $\pm$ 46,50 118,60; 89,70; 153,80
T <sub>12</sub>	Controle	34,60 $\pm$ 19,62 27,60 <sup>b</sup> ; 22,40; 58,40	39,25 $\pm$ 3,45 39,5 <sup>b</sup> ; 36,60; 0; 41,80	205,79 $\pm$ 51,32 193,2; 171,3; 245,1	139,10 <sup>b</sup> $\pm$ 54,89 128,20; 109,00; 166,70
	Teste	46,01 <sup>b</sup> $\pm$ 26,50 37,10; 22,20; 71,20	37,50 $\pm$ 5,23 35,70 <sup>b</sup> ; 33,70; 41,5	234,21 $\pm$ 43,67 242,5; 221,4; 257,9	123,10 <sup>a</sup> $\pm$ 38,19 118,60; 102,60; 160,30
T <sub>24</sub>	Controle	27,78 $\pm$ 19,09 27,10 <sup>b</sup> ; 11,10; 40,6	34,74 $\pm$ 6,91 35,00 <sup>b</sup> ; 28,10; 40,80	229,13 $\pm$ 59,68 230,2; 204,9; 271,0	108,97 <sup>b</sup> $\pm$ 34,32 112,20; 83,3; 134,60
	Teste	24,94 <sup>b</sup> $\pm$ 17,39 31,80; 21,30; 38,40	38,85 $\pm$ 6,77 36,50 <sup>b</sup> ; 34,90; 40,60	215,65 $\pm$ 57,17 202,8; 173,5; 274,5	83,97 <sup>b</sup> $\pm$ 14,31 83,30; 76,90; 96,20

<sup>a</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>R</sub> no mesmo grupo. <sup>b</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparado com momento T<sub>0</sub> no mesmo grupo. <sup>c</sup> em coluna,  $p < 0,05$  comparando GT com GC.



**Figura 7.** Demonstração gráfica da dinâmica do número de hemácias (He) (*células*  $\times 10^6/\mu l$ ), do volume globular (VG) (%), da concentração de hemoglobina (Hb) (*g/dL*), das proteínas plasmáticas totais (PPT) (*g/dL*), do fibrinogênio (Fb) (*mg/dL*) e dos leucócitos totais (LT) (*células*  $\times 10^3/\mu l$ ), no Grupo Controle (GC) e Grupo Teste (GT), nos diferentes momentos. (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente.



**Figura 8.** Demonstração gráfica da dinâmica da atividade sérica de CK (U/L), AST (U/L), LDH (U/L) e dos níveis de TBARS em membranas eritrocitárias (nM/mg de proteína), no Grupo Controle (GC) e Grupo Teste (GT), nos diferentes momentos. (A), (B), (C) e (D), respectivamente.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da suplementação com vitamina E

A concentração de vitamina E observada nos animais deste experimento, tanto do GT como do GC, antes da suplementação, foram numericamente maiores do que os resultados reportados em outras pesquisas, em equinos hígidos, sem a adição de suplemento à dieta (AVELLINI et al, 1999; MOFFARTS et al., 2005; SILVEIRA, 2005; MACHADO, 2006). Este fato pode ser justificado pelo tipo de dieta, rotineiramente utilizado em animais que praticam o hipismo e se encontram em período de treinamento, a qual é rica em nutrientes tendo a vitamina E em sua composição (SICILIANO, 2004). A técnica utilizada neste experimento para dosar esta substância, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foi a mesma empregada nos estudos citados anteriormente. Além disto, o aumento da concentração sérica de  $\alpha$ -tocoferol após a suplementação significou que houve absorção deste nutriente pelo organismo, como também a técnica utilizada foi adequada para esta detecção. Esses resultados estão de acordo com o reportado por Siciliano et al. (1997), quando observaram aumento dessa substância no plasma de cavalos suplementados, quando comparados ao grupo de animais não suplementado. Porém, de acordo com Petersson et al. (1991), os níveis plasmáticos dessa substância não refletem seus teores na musculatura.

### 4.2 Avaliação do hemograma, proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio.

A influência do exercício sobre o eritrograma, caracterizado pelo aumento significativo do número total de hemácias e da concentração de hemoglobina, tanto no GT como no GC, foram observadas em outros experimentos (GARCIA et al., 1999; DOMINGUES JÚNIOR, 2004; SILVEIRA, 2005; MACHADO, 2006;). A análise do efeito do tempo após o exercício em cada grupo, onde no GT houve retorno mais precoce aos valores basais ( $T_6$ ) do que no GC ( $T_{24}$ ), além da diferença verificada entre os grupos no  $T_{12}$ , quanto ao número de hemácias, a concentração de hemoglobina, bem como as PPT, caracterizou a influência da suplementação sobre a dinâmica eritrocitária.

A dinâmica desses parâmetros não foi observada em estudo que utilizou cavalos da raça Árabe, suplementados com vitamina E, submetidos a exercícios em esteira progressiva (MACHADO, 2006), entretanto, em atletas humanos o grupo de indivíduos não suplementados, um dos efeitos imediatos que o exercício físico produziu, incluíram: aumento da contagem de eritrócitos, alterações na viscosidade sanguínea, na composição plasmática e nas propriedades mecânicas dos eritrócitos, uma hemodinâmica deletéria para a perfusão sanguínea e compatível com desenvolvimento de estresse oxidativo. Entretanto, no grupo de indivíduos suplementado com antioxidantes, essas alterações não foram observadas (SENTÜRK et al., 2005).

O eritrócito equino quando comparado ao eritrócito humano é mais sensível à injúria oxidativa e essa característica pode ter importância na perfusão sanguínea tecidual e na adaptação cardiovascular de cavalos, e dessa forma, o aumento do número de eritrócitos, ainda que moderado, tem relevância nas alterações fisiológicas e fisiopatológicas associadas ao estresse oxidativo (BASKURT e MEISELMAN, 1999). Segundo Moffarts et al. (2007) as EROs alteram as propriedades estruturais das membranas celulares de eritrócitos levando assim a uma redução da “capacidade deslizante” das hemácias de cavalos.

As alterações da dinâmica do número de hemácias e da concentração de hemoglobina influíram sobre os índices hematimétricos, quando no GT houve diminuição significativa do VGM e HGM logo após o exercício e diferenças significativas entre os valores de CHGM entre o GT e GC no mesmo momento, onde os animais suplementados apresentaram maiores valores para esse índice. Valor mais alto de VGM e mais baixo de CHGM no GC, pode ser explicado pela dinâmica de maior taxa de remoção e reposição de eritrócitos, uma vez que as células mais jovens são maiores e possuem menor concentração de hemoglobina, já que a vitamina E pode apresentar efeito protetor sobre a estabilidade das membranas, levando assim à manutenção de hemácias maduras, portanto, menores quanto ao diâmetro e com maior CHCM no GT (MACHADO, 2006), entretanto de acordo com Balarin et al. (2006), o VGM é um método limitado para a avaliação morfológica das hemácias em equinos devido a sua subjetividade.

O aumento das PPT logo após o exercício está relacionado com a hemoconcentração, devido à diminuição do volume plasmático (JAIN, 1986), além de o exercício ser o responsável pelo trânsito de líquidos do espaço extracelular para o intracelular (HODGSON e ROSE, 1994)

Em relação ao leucograma, no presente estudo houve aumento significativo do número total de leucócitos, acompanhado do aumento do número absoluto de neutrófilos segmentados no GC, logo após o término do exercício, com retorno aos valores de repouso no momento T<sub>6</sub>; entretanto, esta dinâmica não foi observada no GT, mesmo havendo aumento nos valores numéricos da contagem total dessa célula. Esta cinética encontra-se de acordo com os resultados reportados em outros experimentos (SNOW, 1983, KORHONEN et al., 2000) e se contrapõem aos experimentos realizados em cavalos da raça Árabe, submetidos ao exercício progressivo em esteira (MACHADO, 2006), quando animais suplementados e não suplementados atingiram os valores basais após 24 horas, além de não haver diferenças também entre os valores de média desses parâmetros hematológicos. Já é conhecido que o estresse oxidativo, oriundo do exercício, pode estar ligado às alterações hematológicas pelo aumento da atividade peroxidativa dos neutrófilos (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Além disto, o exercício induz aumentos transitórios das catecolaminas plasmáticas e do cortisol, que levam à mobilização dos linfócitos do baço e também estimulam a demarginação dos neutrófilos (SENTÜRK et al, 2005).

Portanto, diante dos resultados obtidos para a dinâmica leucocitária no GT e as considerações supracitadas, possivelmente a suplementação antioxidante oferecida aos animais do GT foi capaz de prevenir alguns mecanismos de resposta propostos para ativação leucocitária oriunda do exercício. A vitamina E é uma molécula com propriedades estabilizantes de membranas celulares e tem função mediadora da resposta imune e inflamatória (BAALSRUD e OVERNES, 1986; CHEW, 1996; HINTZ, 2000). O  $\alpha$ -tocoferol leva à diminuição da produção de prostaglandinas, podendo atuar como mensageiro intracelular, e como um transdutor capaz de informar à célula de sua situação oxidativa (FERNÁNDEZ et al., 2002). Ainda assim esta análise deve ser interpretada com cautela uma vez que neste experimento as diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas com relação ao efeito do tempo dentro do GC.

### **4.3 Avaliação da atividade das enzimas marcadoras de lesão muscular**

O exercício determinou aumento de atividade sérica de CK e da AST em ambos os grupos, possivelmente pelo mecanismo de aumento da permeabilidade das paredes celulares em função do exercício (SICILIANO et al., 1997). A CK é a enzima mais sensível para indicação de lesão muscular (KANEKO et al., 1997). Aumento fisiológico da atividade da CK, possivelmente, ocorre em razão da hipóxia, além de outros fatores (HARRIS e MAYHEW, 1998).

A resposta de atividade sérica de CK foi anteriormente observada em cavalos de salto (LEKEUX et al., 1991), no entanto a suplementação com vitamina E e selênio não produziu efeito sobre a atividade desta enzima. Resultado semelhante foi obtido em outros experimentos utilizando equinos de outras atividades esportivas (SICILIANO et al., 1997; CHIARADIA et al., 1998; KINNUNEN et al., 2005), assim como em experimento que utilizou como antioxidante o ascorbato (WHITE et al., 2001), como também em pesquisas realizadas no Brasil, em cavalos da raça Árabe, submetidos à exercício em esteira progressiva (MACHADO, 2006).

Na avaliação da AST, o valor das médias entre os grupos, seis horas após a realização do exercício, foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), onde o GC ainda apresentava a influência do exercício, enquanto o GT já havia retornado ao valor basal, caracterizando assim o efeito da suplementação na dieta dos animais. Essa afirmação precisa ser interpretada com cautela uma vez que a AST não é uma enzima marcadora específica da musculatura esquelética.

Não foi possível observar influência do exercício sobre a atividade sérica da LDH em nenhum dos grupos estudados.

### **4.3. Avaliação do índice de peroxidação de biomoléculas.**

O aumento da concentração de TBARS após o exercício em ambos os grupos foi anteriormente observado em equinos submetidos a exercício em diferentes modalidades de esforço (AVELLINI et al., 1999; WHITE et al., 2001; SILVEIRA, 2005; MACHADO, 2006; MUÑOZ-ESCASSI et al., 2006). Entretanto, a suplementação com a vitamina E não apresentou influências que possam ser atribuídas à sua ação antioxidativa, durante o período de avaliação deste experimento. O exercício é capaz de gerar radicais livres e peroxidação lipídica, e depende da intensidade da atividade e, a eliminação dos produtos da peroxidação lipídica, é um processo lento (CHIARADIA et al., 1998).

Os resultados obtidos nesta pesquisa foram semelhantes ao de outras que não encontraram efeitos da suplementação de vitamina E sobre a concentração de TBARS em cavalos submetidos a diferentes tipos de exercício (McMENIMAN e HINTZ, 1992; CHIARADIA et al., 1998; HARGREAVES et al., 2002; MARLIN et al., 2002; WILLIAMS et al., 2004a; BERGERO et al., 2004). Por outro lado, outras pesquisas conseguiram demonstrar efeito antioxidante da suplementação com vitamina E caracterizada por níveis significativamente menores de TBARS e MDA (AVELLINI et al., 1999; MOFFARTS et al., 2005; MACHADO, 2006), e além de outros marcadores de estresse oxidativo (WILLIAMS et al., 2004b). Em outros experimentos, a utilização

de outros antioxidantes preveniu o estabelecimento do estresse oxidativo (MILLS et al., 1997; WHITE et al., 2001; TROMBETTA e FALASCHINI, 2003).

Marlin et al. (2002) observaram aumento significativo da concentração de TBARS no plasma logo após, e até 16 horas da realização do exercício, e os níveis de vitamina E se mostraram inalterados, enquanto a atividade de CK e AST aumentaram após o exercício. Diante de tal observação justificaram que esses achados não foram suficientes para demonstrar o estresse oxidativo clássico, uma vez que os antioxidantes e os marcadores bioquímicos de estresse oxidativo da circulação podem não refletir o estado muscular, que é o local de maior produção de EROs durante o exercício.

Williams e Carlucci (2006) não observaram efeito de suplementação com vitamina E sobre marcadores de estresse oxidativo em cavalos submetidos a exercícios intensos e afirmaram que a suplementação de vitamina E acima dos níveis recomendados, não parece ser benéfica para o controle do estresse oxidativo e do balanço oxidativo, em cavalos submetidos a exercícios intensos.

## **5. CONCLUSÃO**

A suplementação antioxidante pode minimizar um dos mecanismos geradores de EROs durante o exercício, levando à discreta atenuação na geração do marcador bioquímico de estresse oxidativo na membrana de eritrócitos, sem, no entanto, prevenir o desenvolvimento do estresse oxidativo em resposta ao exercício.

Os parâmetros hematológicos, os marcadores bioquímicos de lesão muscular, assim como os níveis de TBARS na membrana de hemácias, se mostraram como ferramentas úteis na avaliação do efeito do exercício sobre a homeostase de cavalos de hipismo, submetidos ao exercício de salto. Por outro lado, os dados de dinâmica eritrocitária, leucocitária e de PPT se mostraram mais sensíveis para demonstração da influência da suplementação antioxidante sobre a resposta ao exercício do que os marcadores de lesão muscular e de estresse oxidativo utilizados.

## 6. REFERÊNCIAS

ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, D.; FAVIER, D. Simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 572, p. 103-116, 1991.

AVELLINI, L.; CHIARADIA, E.; GAITI, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 123, p. 147 – 154, 1999.

BAALSRUD, K.J.; OVERNES, G. Influence of vitamin E and selenium supplement on antibody production in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, n.6, p. 472-474, 1986.

BALARIN, M.R.S.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C.B.; FONTEQUE, J.H. Valores da amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) em eqüinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 637 - 641, 2006.

BASKURT, O.K.; MEISELMAN, H.J. Susceptibility of equine erythrocytes to oxidant-induced rheologic alterations, **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 10, p. 1301 – 1306, 1999.

BERGERO, D.; MIRAGLIA, N.; SCHIAVONE, A.; POLIDORI, M.; PROLA, L. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids and Vitamin E on serum oxidative status in horses performing very light exercise, **Journal of Animal Science**, v.3, p. 141 – 145, 2004.

BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 2-34.

CHIARADIA E.; AVELLINI L.; RUECA F.; SPATERNA A.; PORCIELLO F.; ANTONIONI M.T.; GAITI A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 119, p. 833–836, 1998.

CHEW, B.P. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, p. 103-114, 1996.

DOMINGUES JÚNIOR, M.; TOLEDO, P.S.; MANGONE, M.; MICHIMA, L.E.S.; FERNANDES, W.R. Avaliação das alterações hematológicas em cavalos da raça PSI submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **A Hora Veterinária**, v. 24, p. 41-44, 2004.

ESTEBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products. Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, n. 42, p. 407 – 421, 1990.

FERNANDÉZ, C.F.; FEBLES, C.S.; BERNABEU, A.S.; TRIANA, B.E.G. Funciones de la vitamina E. Actualización. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 40, n. 1, p. 28-32, 2002.

GARCIA, M.; GUZMAN, R.; CABEZAS, I.; MERINO, V.; PALMA, C.; PEREZ, R. Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas; **Archivos de Medicina Veterinaria**, n. 31; v.2; p. 212 – 228, 1999.

HARGREAVES, B.J.; KRONFELD, D.S.; WALDRON, J.N.; LOPES, M.A.; GAY, L. S.; SAKER, K.E.; COOPER, W.L., SKLAN, D.J.; HARRIS, P.A. Antioxidant status of horses during two 80-km endurance races. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1781S - 1783S, 2002.

HARRIS, P.A.; MAYHEW, I.G. Musculoskeletal disease. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. (eds.) **Equine Internal Medicine**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p. 371 – 426.

HINTZ, H.F. Equine nutrition update. In: **AAEP Annual Convention**, v. 46, 2000, p. 62 – 79.

HODGSON D.R.; ROSE R.J. Hematology and Biochemistry. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. (eds.) **The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1994, p 63 - 78.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986, 1221p.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993, 417 p.

JI, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Experimental Biology and Medicine**, v. 222, p. 283-292, 1999.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.

KINNUNEN, S.; ATALAY, M.; HYYPÄ, S.; LEHMUSKERO, A.; HÄNNINEN, O.; OKSALA, N. Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse, **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 4, p. 415 – 421, 2005.

KORHONEN, P.A.S.; LILIUS E.M.; HYYPÄ, S.; RÄSÄNEN L.A.; PÖSÖ, A.R. Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in Standardbred trotters. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 47, p. 565 – 573, 2000.

LARSON, H.J. **Introduction to probability theory and statistical inference**. 3 ed. United States of America: Wiley, 1982, 656 p.

LEKEUX, P.; ART, T.; LINDEN, A.; DESMECHT, D.; AMORY, H. Heart rate, hematological and serum biochemical responses to show jumping. **Equine Exercise Physiology**, v. 3, p. 385-390, 1991.

LOWRY, E.H.; ROSENBROUGH N.J.; FARR, L.L.; RANDDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, v. 1, p. 265-75, 1951.

MACHADO, L.P. **Eritrograma, glutationa reduzida e superóxido dismutase eritrocitários e metahemoglobina em eqüinos da raça Árabe submetidos a exercícios em esteira: efeito da suplementação com vitamina E (dL-alfa-tocoferol)**. 98 f., 2006. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH, N.; DEATON, C.D.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; DUNSTER, C.; KELLY, F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1622S – 1627S, 2002.

MATOS, M.S.; MATOS P.F. **Laboratório clínico médico-veterinário**, 2 ed., Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988, 238 p.

McMENIMAN, N.P.; HINTZ, H.F. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 6, p. 482 - 484, 1992.

MILLS, P. C.; SMITH, N. C.; HARRIS, R. C.; HARRIS, P. Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. **Research in Veterinary Science**, v. 62, p. 11 – 16, 1997.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; OGISO, T. Antioxidant activity of adrenergic agents derived from catechol. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 2001 – 2006, 1998.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; MICHAUX, C.; CAYEUX, K.; DEFRAIGNE, J.; LEKEUX, P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy standardbred horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 1, n. 3, p. 211 – 220, 2004.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidants status in trained thoroughbred horses. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 1, p. 65 – 74, 2005.

MOFFARTS, B.; PORTIER, K.; KIRSCHVINK, N.; COUDERT, J.; FELLMANN, N.; VAN ERCK, E.; LETELLIER, C.; MOTTA, C.; PINCEMAIL, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 113 – 121, 2007.

MUÑOZ-ESCASSI, B.; MARAÑÓN, G.; MANLEY, W.; SÁNCHEZ DE LA MUELA, M.; RIBER, C.; CASTEJON, F.; LEÓN, R.; GARCIA, C.; VARA, E. Exercise-induced changes on lipid peroxides and antioxidant enzyme level changes in plasma of show jumping and dressage horses. In: **Internacional Conference on Equine Exercise Physiology**, 2006, p 68 – 74.

OKINAKA, S.; KUMAGAI, H.; EBASHI, S.; SUGITA, H.; MOMOI, H.; TOYOKURA, Y.; FUJIE, Y. Serum creatine phosphokinase. Activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. **Archives of Neurology**, v. 4, p. 520–525, 1961.

PETERSSON, K.H.; HINTZ, H.F.; SCHRYVER, H.F.; COMBS, G.F. The effect of vitamin E on membrane integrity during submaximal exercise, **Equine Exercise Physiology**, v. 3, p. 315 – 322, 1991.

PORTIER, K.; MOFFARTS, B.; FELLMAN, N.; KIRSCHVINK, N.; MOTTA, C.; LETELLIER, W.C.; RUELLAND, A.; VAN ERCK, E.; LEKEUX, P.; COUDER J. The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.36, p. 279 – 284, 2006.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, p. 56-63, 1957.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329 – 334, 1947.

SCHNEIDER, C.D; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 303 – 313, 2004.

SENTÜRK, U.K.; YALEIN, O.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; MEISELMAN, H.J.; BASKURT, O. K. Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects, **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 1272 – 1279, 2005.

SICILIANO, P.D. Vitamin E and immune function in horses. In: **Mild-Atlantic Conference**, 2 ed., 2004, p. 206 – 210.

SICILIANO, P.D.; PARKER, A.L.; LAWRENCE, L.M. Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. **Journal of Animal Science**, v.75, n.6, p.1553-1560, 1997.

SILVA, I.A.C.; DIAS R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Determinação das atividades séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em eqüinos de diferentes categorias de atividade. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.250-252, 2007.

SILVEIRA, V.F. **Malondialdeído, vitamina E, cortisol, hemograma e enzimas musculares em equinos da raça Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade.** 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SJÖDIN, B.; WESTING, Y.H.; APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 10, n. 4, p. 236 – 254, 1990.

SNOW, D.H. Physiological factors affecting resting haematology. In: SNOW, D.H.; PERSSON, S.G.B.; ROSE, R.J. (eds.) **Equine Exercise Physiology**, Cambridge: Granta Editions, 1983, p. 318 – 323.

TROMBETTA, M.F.; FALASCHINI, A. Influence of L-carnitine on fitness and oxidative stress parameters in trotter horses subjected to Laval's test. **Italian Journal of Animal Science**, v. 2, p. 231 – 236, 2003.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41 – 54, 2003.

VÁZQUEZ, M.R. **Influencia de la dieta afro-baiana sobre el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico extenuante.** 342 f., 2002. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Universidad de León, Espanha.

WHITAKER, J.F. A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH-NAD<sup>+</sup> system. **Clinica Chimica Acta**, v. 24; n. 1, p. 23-37, 1969.

WHITE, A.; ESTRADA, M.; WALKER, K.; WISNIA, P.; FILGUEIRA, G.; VALDÉS, F.; ARANEDA, O.; BEHN, C.; MARTÍNEZ R. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular e Integrative Physiology**, v. 128, n. 1, p. 99 – 104, 2001.

WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M.; SAKER, J.N.; WALDRON, J.N.; CRANDELL, K.M.; HOFFMAN, R.M.; HARRIS, P.A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 588 – 594, 2004.

WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T. M.; SAKER, K.E.; HARRIS P.A. Lipoic acid and vitamin E supplementation to horses diminishes endurance exercise induced oxidative stress, muscle leakage, and apoptosis. In: **Conference on Equine Sports Medicine and Science**, 2004, p. 105-119.

WILLIAMS, C.A.; CARLUCCI, S.A. Oral vitamin E supplementation on oxidative stress and antioxidant status in intensely exercised horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 36, p. 617 – 621, 2006.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hipismo é uma atividade capaz de determinar alterações significativas nos cavalos submetidos à rotina de treinamentos e competições, predispondo-os a lesões musculares e com desenvolvimento de estresse oxidativo, gerados pelo exercício.

O quadro hematológico, as proteínas plasmáticas, a atividade de enzimas relacionadas com a lesão muscular (CK e AST) e o índice de peroxidação de biomoléculas (TBARS) constituem-se em importantes marcadores para avaliarem-se as conseqüências fisiopatológicas causadas pelo exercício, portanto devem ser incluídos nos protocolo clínico de avaliação de animais que praticam esporte eqüestre.

Uma vez que o exercício exerce influência sobre os constituintes sangüíneos, em cavalos atletas, o conhecimento sobre os valores dos parâmetros do hemograma, bem como a sua dinâmica fisiológica nas diversas fases da atividade física, devem ser utilizados, para monitoramento do condicionamento físico dos animais, e não somente como auxílio ao diagnóstico de enfermidades.

O tipo de exercício aos quais os animais são submetidos, bem como a sua intensidade apresentam influência sobre a cinética do quadro leucocitário, e sendo a relação leucócitos/neutrófilos e leucócitos/linfócitos devem consideradas e interpretadas adequadamente, de acordo com a modalidade do esporte eqüestre.

A determinação das concentrações das proteínas plasmáticas totais e do fibrinogênio devem ser realizadas concomitante com o eritrograma, uma vez que estes parâmetros conduzem a informações sobre a hemoconcentração, contribuindo para melhor interpretação dos diferentes escores de desidratação, um quadro clínico que ocorre comumente após a realização de exercícios.

Em programas de treinamento eficientes, a atividade das enzimas marcadoras de lesão muscular (CK e AST) deve ser incluída para avaliar o condicionamento físico do eqüino, considerando que a atividade dessas enzimas eleva-se em função do exercício e diminuem com a continuidade do treinamento.

Devido ao grande número de pesquisas realizadas e os diferentes resultados sobre a utilização dos TBARS como marcador de estresse oxidativo, como também a ação antioxidante de suplementação com a vitamina E em cavalos, a influência de fatores de variabilidade, tais como: raça, sexo, idade, e condicionamento físico, devem ser mais estudados para melhor interpretação desses resultados.

A realização desta pesquisa contribuiu para o conhecimento dos valores de alguns constituintes hematológicos de cavalos atletas, criados no Estado da Bahia. Ainda que o número de animais seja baixo, para caracterizar valores de referência, e até que outros trabalhos semelhantes sejam realizados, tais resultados podem ser utilizados como auxílio de condicionamento físico e de diagnóstico de eqüinos mantidos em hípicas da região, diante da comprovação científica da influência dos fatores de variabilidade sobre os constituintes sangüíneos. Os valores obtidos nesta pesquisa não refletem as diferenças devidas à condições climáticas e manejos sanitário e nutricional.

## 5. REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.G. The influence of exercise on serum enzyme levels in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.7, n.3, p.160-165, 1975.

ARAÚJO, M.B.; PRADA, F.J.A.; MELLO, M.A.R. Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade do esforço. **Motriz Rio Claro**, v. 12, n. 3, p. 307 – 312, 2006

ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, D.; FAVIER, D. Simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 572, p. 103-116, 1991.

ART, T.; AMORY, H.; DESMECHT, D.; LEKEUX, P. Effect of show jumping on heart rate, blood lactate and other plasma biochemical values. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 9, p. 78 – 82, 1990.

AVELLINI, L.; SILVESTRILLI, M.; GAITI, A. Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. **Veterinary Research Communications**, v. 19, p. 179 – 184, 1995.

AVELLINI, L.; CHIARADIA, E.; GAITI, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 123, p. 147 – 154, 1999.

BAALSRUD, K.J.; OVERNES, G. Influence of vitamin E and selenium supplement on antibody production in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, n.6, p. 472-474, 1986.

BALARIN, M.R.S.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C.B.; FONTEQUE, J.H. Valores da amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) em eqüinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 637 - 641, 2006.

BASKURT, O.K.; MEISELMAN, H.J. Susceptibility of equine erythrocytes to oxidant-induced rheologic alterations, **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 10, p. 1301 – 1306, 1999.

BALOGH, N.; GAÁL, T.; RIBICZEYNÉ, P.S.; PETRI, Á. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 4, p. 214 – 218, 2001.

BIRD, R.P.; DRAPER, H.H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 35, p. 299 – 305, 1984.

BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 2-34.

BERGERO, D.; MIRAGLIA, N.; SCHIAVONE, A.; POLIDORI, M.; PROLA, L. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids and Vitamin E on serum oxidative status in horses performing very light exercise, **Journal of Animal Science**, v.3, p. 141 – 145, 2004.

BLACKMORE, D. J. The biochemistry and haematology of inherent performance. In: SNOW, D.H.; PERSSON, S.G.B.; ROSE, R.J. (eds.) **Equine Exercise Physiology**, Cambridge: Granta Editions, 1983, p. 344-353.

CARLSON, G.P. Hematology and body fluids in the equine athlete: a review. In: GILLESPIE J.R.; ROBINSON N.E. (eds.) **Equine Exercise Physiology 2**. Davis: ICEEP Publications, p. 393-425, 1987.

CHEW, B.P. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, p. 103-114, 1996.

CHIARADIA E.; AVELLINI L.; RUECA F.; SPATERNA A.; PORCIELLO F.; ANTONIONI M.T.; GAITI A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 119, p. 833–836, 1998.

CLAYTON, H.M. Training show jumpers. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. (eds.) **The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**. Philadelphia:W.B. Saunders, 1994, p. 429 – 438.

COSTA, J.N. **Leucograma, metabolismo oxidativo de neutrófilos, proteinograma e imunoglobulinas de bovinos da raça Holandesa (Bos taurus): influência da idade e da suplementação com vitamina E (acetato de DL – alfa – tocoferol)**. 2000. 217f. Tese – (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DEATON, C.M.; MARLIN, D.J.; ROBERTS, C.A.; SMITH, N.; HARRIS, P.A.; KELLY, F.J.; SCHROTER, R.C. Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. **Equine Veterinary Journal Supplement**, n. 34, p. 58 – 65, 2002.

DEATON, C.M.; MARLIN, D.J. Exercise-associated oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, n. 3, p. 278 – 291, 2003.

DOMINGUES JÚNIOR, M.; TOLEDO, P.S.; MANGONE, M.; MICHIMA, L.E.S.; FERNANDES, W.R. Avaliação das alterações hematológicas em cavalos da raça PSI submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **A Hora Veterinária**, v. 24, p. 41-44, 2004.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 4, p. 353-363, 1993.

DURFINOVÁ, M.; BRECHTLOVÁ, M.; LISKA, B.; BAROSKÁ, Z. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues. **Chemical Papers**, v. 61, n. 4, p. 321 – 325, 2007.

ESTEBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products. Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, n. 42, p. 407 – 421, 1990.

FERNANDES, W.R. **Alterações dos parâmetros do eletrocardiograma e da crase sanguínea em equinos das raças Árabe e Mangalarga, bem como de mestiços, submetidos à prova de enduro**. 1994. 73p. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERNANDÉZ, C.F.; FEBLES, C.S.; BERNABEU, A.S.; TRIANA, B.E.G. Funciones de la vitamina E. Actualización. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 40, n. 1, p. 28-32, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61 – 68, 1997.

FEDERAÇÃO HÍPICA DA BAHIA. Disponível em <<http://www.fhb-ba.com.br/>>. Acesso em 06 de março de 2008.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S.T.A.; VEIGA, A.P.M.; MARTINS, D.B.; EMANUELLI, M., P.; OLIVEIRA, L.S.S. Atividade sérica das enzimas AST, CPK e GGT em cavalos Crioulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.10, p.1561-1565, 2006.

GARCIA, M.; GUZMAN, R.; CABEZAS, I.; MERINO, V.; PALMA, C.; PEREZ, R. Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas; **Archivos de Medicina Veterinária**, n. 31, v.2, p. 212 – 228, 1999.

GÓMEZ, C.; PETRÓN, P.; ANDAUR, M.; PÉREZ, R.; MATAMOROS, R. Medición post-ejercicio de variables fisiológicas, hematológicas y bioquímicas em equinos de salto holsteiner. **Revista Científica**, v.14, n.3, p.244-253, 2004.

HARRIS, P.A.; MAYHEW, I.G. Musculoskeletal disease. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. (eds.) **Equine Internal Medicine**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p. 371 – 426.

HARGREAVES, B.J.; KRONFELD, D.S.; WALDRON, J.N.; LOPES, M.A.; GAY, L. S.; SAKER, K.E.; COOPER, W.L., SKLAN, D.J.; HARRIS, P.A. Antioxidant status of horses during two 80-km endurance races. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1781S - 1783S, 2002.

HINTZ, H.F. Equine nutrition update. **Proceedings of the 46th AAEP Annual Convention**, v. 46, p. 62 – 79, 2000.

HODGSON D.R.; ROSE R.J. Hematology and Biochemistry. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. (eds.) **The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1994, p 63 - 78.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2003. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=t&o=20>> Acesso em 06 de março de 2008.

IGLESIAS, B.F.; CATALÁ, A. Rat, equine and bovine erythrocyte ghosts exposed to t-butyl hydroperoxide as a model to study lipid peroxidation using a chemiluminescence assay. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 19 – 27, 2005.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993, 417 p.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986, 1221p.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515 – 540, 1990.

Ji, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Experimental Biology and Medicine**, v. 222, p. 283-292, 1999.

JIMÉNEZ, M.H.; CERRILLA, M.E.O.; PERALTA, M.C.; HARO, J.G.H., DÍAZ-CRUZ, A.; PERRUSQUÍA, R.G. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animals domésticos. **Interciencia**, v. 30, n. 12, p. 728 – 734, 2005.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.

KINNUNEN, S.; HYYPPÄ, S.; LAPPALAINEN, J.; OKSALA, N.; VENOJÄRVI, M.; NAKAO, C.; HÄNNINEN, O.; SEN, C. K.; ATALAY M. Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. **European Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 496 – 501, 2005a.

KINNUNEN, S.; HYYPPÄ, S.; LEHMUSKERO, A.; OKSALA, N.; MÄENPÄÄ, P.; HÄNNINEN, O.; ATALAY, M. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, p. 550 – 556, 2005b.

KINNUNEN, S.; ATALAY, M.; HYYPPÄ, S.; LEHMUSKERO, A.; HÄNNINEN, O.; OKSALA, N. Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse, **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 4, p. 415 – 421, 2005c.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; FARNIR, F.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breeds. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v. 36, p. 239 – 244, 2006.

KORHONEN, P.A.S.; LILIUS E.M.; HYYPPÄ, S.; RÄSÄNEN L.A.; PÖSÖ, A.R. Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in Standardbred trotters. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 47, p. 565 – 573, 2000.

KRAMER, J.W. Normal hematology of the horse. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**, 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Williams, 2000. p.1069-1074.

LARSON, H.J. **Introduction to probability theory and statistical inference**, 3 ed. United States of America: Wiley, 1982, 656 p.

LAWRENCE, L.A. Nutrient requirements and balancing rations for horses. **Animal and Poultry Sciences**, v. 1, p. 1 – 16, 2000.

LEAL, B.B.; ALVES, G.E.S.; ROSCOE, M.P.; PAGLIOSA, G.M.; FARIA, E.P.; LIMA, J.T.M.; FALEIROS, R.R.; MARVAL, C.A.D. Efeitos terapêuticos de um composto à base de vitamina E e selênio em equinos submetidos a orquiectomia em condições de campo. **A Hora Veterinária**, n. 153, p. 43 – 46, 2006.

LEKEUX, P.; ART, T.; LINDEN, A.; DESMECHT, D.; AMORY, H. Heart rate, hematological and serum biochemical responses to show jumping. **Equine Exercise Physiology**, v. 3, p. 385-390, 1991.

LOWRY, E.H.; ROSENBROUGH N.J.; FARR, L.L.; RANDDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, v. 1, p. 265-75, 1951.

LUMSDEN, J.H.; ROWE, R.; MULLEN, K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 44, p. 32 – 42, 1980.

MACHADO, L.P. **Eritrograma, glutationa reduzida e superóxido dismutase eritrocitários e metahemoglobina em equinos da raça Árabe submetidos a exercícios em esteira: efeito da suplementação com vitamina E (dL-alfa-tocoferol)**. 98 f., 2006. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH, N.; DEATON, C.D.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; DUNSTER, C.; KELLY, F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1622S – 1627S, 2002.

MATOS, M.S.; MATOS P.F. **Laboratório clínico médico-veterinário**, 2 ed., Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988, 238 p.

McARDLE, A.; VASILAKI, A; JACKSON, M. Exercise and muscle ageing: cellular and molecular mechanisms, **Ageing Research Reviews**, v.1, p. 79 – 93, 2002.

McBRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J. Free radicals, exercise, and antioxidants. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 13, n. 2, p. 175–183, 1999.

McMENIMAN, N.P.; HINTZ, H.F. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 6, p. 482 - 484, 1992.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995, 308 p.

MILLS, P. C.; SMITH, N. C.; HARRIS, R. C.; HARRIS, P. Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. **Research in Veterinary Science**, v. 62, p. 11 – 16, 1997.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; OGISO, T. Antioxidant activity of adrenergic agents derived from catechol. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 2001 – 2006, 1998.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; MICHAUX, C.; CAYEUX, K.; DEFRAIGNE, J.; LEKEUX, P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy standardbred horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 1, n. 3, p. 211 – 220, 2004.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidants status in trained thoroughbred horses. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 1, p. 65 – 74, 2005a.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; VAN ERCK, E.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Assessment of the oxidant-antioxidant blood balance in a field exercise test in standardbred and eventing horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 2, n. 4, p. 253 – 261, 2005b.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Effect of exercise on blood oxidant/antioxidant markers in standardbred horses: comparison between treadmill and race track tests. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v. 36, p. 254 – 257, 2006.

MOFFARTS, B.; PORTIER, K.; KIRSCHVINK, N.; COUDERT, J.; FELLMANN, N.; VAN ERCK, E.; LETELLIER, C.; MOTTA, C.; PINCEMAIL, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 113 – 121, 2007.

MUÑOZ-ESCASSI, B.; MARAÑÓN, G.; MANLEY, W.; SÁNCHEZ DE LA MUELA, M.; RIBER, C.; CASTEJON, F.; LEÓN, R.; GARCIA, C.; VARA, E. Exercise-induced changes on lipid peroxides and antioxidant enzyme level changes in plasma of show jumping and dressage horses. In: **Internacional Conference on Equine Exercise Physiology**, 2006, p 68 – 74.

NRC. **Nutrient requirements of horses**. 5 ed., Washington: National Academy Press, 1989.

OKINAKA, S.; KUMAGAI, H.; EBASHI, S.; SUGITA, H.; MOMOI, H.; TOYOKURA, Y.; FUJIE, Y. Serum creatine phosphokinase. Activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. **Archives of Neurology**, v. 4, p. 520–525, 1961.

PERSSON, R.G.B. The significance of haematological data in the evaluation of soundness and fitness in the horses. In: SNOW, D.H.; PERSSON, S.G.B.; ROSE, R.J. (eds.) **Equine Exercise Physiology**, Cambridge: Granta Editions, 1983, p. 324 – 327.

PETERSSON, K.H.; HINTZ, H.F.; SCHRYVER, H.F.; COMBS, G.F. The effect of vitamin E on membrane integrity during submaximal exercise, **Equine Exercise Physiology**, v. 3, p. 315 – 322, 1991.

PORTER, N.A. Chemistry of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 105, n. 32, p. 273 – 282, 1984.

PORTIER, K.; MOFFARTS, B.; FELLMAN, N.; KIRSCHVINK, N.; MOTTA, C.; LETELLIER, W.C.; RUELLAND, A.; VAN ERCK, E.; LEKEUX, P.; COUDER J. The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.36, p. 279 – 284, 2006.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, p. 56-63, 1957.

REVINGTON, M. Haematology of the racing Thoroughbred 2: Haematological values compared to performance. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 145 – 148, 1983.

RONEUS, B.O.; HAKKARAINEN, R.V.; LINDHOLM, C.A.; TYOPPONEN, J. T. Vitamin E requirements of adult standardbred horses evaluated by tissue depletion and repletion. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, n. 1, p. 50 – 58, 1986.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329 – 334, 1947.

SCHNEIDER, C.D; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 303 – 313, 2004.

SENTÜRK, U.K.; GÜNDOZ, F.; KURU, O.; AKTEKIN, M.R.; KIPMEN, D.; YALÇIN, Ö.; BOR-KÜÇÜKATAY, M.; YESILKAYA, A.; BASRKUT, K. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1999 – 2004, 2001.

SENTÜRK, U.K.; YALEIN, O.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; MEISELMAN, H.J.; BASKURT, O. K. Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects, **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 1272 – 1279, 2005.

SICILIANO, P.D.; PARKER, A.L.; LAWRENCE, L.M. Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. **Journal of Animal Science**, v.75, n.6, p.1553-1560, 1997.

SICILIANO, P.D. Vitamin E and immune function in horses. In: **Mild-Atlantic Conference**, 2 ed., 2004, p. 206 – 210.

SILVA, I.A.C.; DIAS R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Determinação das atividades séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em eqüinos de diferentes categorias de atividade. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.250-252, 2007.

SILVEIRA, V.F. **Malondialdeído, vitamina E, cortisol, hemograma e enzimas musculares em eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade**. 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SINGH, R.K.; KOOREMAN, K.M.; BABBS, C.F.; FESSLER, J.F.; SALARIS, S.C.; PHAM, J. Potential use of simple manganese salts as antioxidant drugs in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 10, p. 1822 – 1829, 1992.

SJÖDIN, B.; WESTING, Y.H.; APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 10, n. 4, p. 236 – 254, 1990.

SLATER, T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 105, n. 33, p. 283 – 293, 1984.

SNOW, D.H. Physiological factors affecting resting haematology. In: SNOW, D.H.; PERSSON, S.G.B.; ROSE, R.J. (eds.) **Equine Exercise Physiology**, Cambridge: Granta Editions, 1983, p. 318 – 323.

SNOW, D.H.; GASH, S.P.; RICE D. Field observations on selenium status, whole blood glutathione peroxidase and plasma gamma glutamyl transferase activities in thoroughbred racehorses. In: **International Conference on Equine Exercise Physiology**, San Diego, p. 494 – 505, 1986.

SMITH, J.E.; ERICKSON, H.H.; DEBOWES, R.M.; CLARK, M. Changes in circulating equine erythrocytes induced by brief, high-speed exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 6, p. 444 – 446, 1989.

SPEIRS, V. C. **Clinical examination of horses**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, 358 p.

STRADAIOLI, G.; MAGISTRINI, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for determination of malondialdehyde in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 347 – 350, 2002.

TOLEDO, P.S.; DOMINGUES JÚNIOR, M.; FERNANDES, W.R.; MAGONE M. Atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatina quinase, gama-glutamyltransferase, lactato desidrogenase e glicemia de cavalos da raça P.S.I. submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.8, n.2, p.73-77, 2001.

TROMBETTA, M.F.; FALASCHINI, A. Influence of L-carnitine on fitness and oxidative stress parameters in trotter horses subjected to Laval's test. **Italian Journal of Animal Science**, v. 2, p. 231 – 236, 2003.

TYLER-MCGOWAN, C.M.; GOLLAND, L.C.; EVANS, D.L.; HODGOSON, D.R.; ROSE, R.J. Haematological and biochemical responses to training and overtraining. **Equine Veterinary Journal Supplement**; n. 30, p. 621 – 625, 1999.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41 – 54, 2003.

VÁZQUEZ, M.R. **Influencia de la dieta afro-baiana sobre el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico extenuante**. 342 f., 2002. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Universidad de León, Espanha.

WHITE, A.; ESTRADA, M.; WALKER, K.; WISNIA, P.; FILGUEIRA, G.; VALDÉS, F.; ARANEDA, O.; BEHN, C.; MARTÍNEZ R. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular e Integrative Physiology**, v. 128, n. 1, p. 99 – 104, 2001.

WHITAKER, J.F. A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH-NAD<sup>+</sup> system. **Clinica Chimica Acta**, v. 24; n. 1, p. 23-37, 1969.

WILLIAMS, C.A.; HESS, T.M.; KRONFELD, D.S.; WALDRON, J.E.; SAKER, K.E.; HOFFMAN, R.M.; HARRIS, P.A. Vitamin intake and oxidative stress in endurance horses. In: **Equine Nutrition and Physiology Symposium**, n.8, v. 18, 2003, p. 134-135.

WILLIAMS, C.A. Antioxidant supplementation and oxidative stress in the exercising horse. **Mild-Atlantic Nutrition Conference**, n. 2, p. 195 – 205, 2004.

WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M.; SAKER, J.N.; WALDRON, J.N.; CRANDELL, K.M.; HOFFMAN, R.M.; HARRIS, P.A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 588 – 594, 2004a.

WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T. M.; SAKER, K.E.; HARRIS P.A. Lipoic acid and vitamin E supplementation to horses diminishes endurance exercise induced oxidative stress, muscle leakage, and apoptosis. In: **Conference on Equine Sports Medicine and Science**, 2004b, p. 105-119.

WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M.; SAKER, K.E.; WALDRON, J. E.; CRANDELL, K.M.; HARRIS, P.A. Comparison of oxidative stress and antioxidant status in endurance horses in three 80-km races. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 2, p. 153 – 157, 2005.

WILLIAMS, C.A.; CARLUCCI, S.A. Oral vitamin E supplementation on oxidative stress and antioxidant status in intensely exercised horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 36, p. 617 – 621, 2006.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.M.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 1/2, p. 202–226, 1999.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)