

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CÃES *AMERICAN PIT BULL TERRIER* SUBMETIDOS A
EXERCÍCIO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E ESTUDO
COMPARATIVO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO
DE LACTATO**

Carolina Berkman

Médica Veterinária

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CÃES *AMERICAN PIT BULL TERRIER* SUBMETIDOS A
EXERCÍCIO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E ESTUDO
COMPARATIVO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO
DE LACTATO**

Carolina Berkman

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutorado em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

2015

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Carolina Berkman, nascida na capital Paulista, em 12 de agosto de 1981. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Camilo Castelo Branco - Campus Descalvado (2008). É mestre em Clínica Médica - área de morfologia e fisiologia do exercício (2011) e Doutoranda pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP campus de Jaboticabal pelo programa de Medicina Veterinária - Clínica Médica na área de morfologia e fisiologia comparada de equinos e cães atletas. Exerce atividades de pesquisa e desenvolvimento em desempenho atlético junto ao Departamento de Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ), sob co-orientação do Prof. Dr. Antonio de Queiroz Neto e orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz. É docente da Faculdade FASIPE, em Sinop/MT, responsável pelas disciplinas de Metodologia da Pesquisa e Fisiologia Humana para os cursos de Estética, Enfermagem, Odontologia, Nutrição e Psicologia. Atua como professora substituta em Diagnóstico por Imagem na Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT – campus Sinop.

“A persistência é o menor caminho para o êxito”

- Charles Chaplin

Para Marsel dedico esta obra, pois, além de ter sido um grande incentivador, generosamente presenteou-me com a idealização deste estudo, transformado em uma rica oportunidade de cultivar nossa admiração por estes cães magníficos que são os Pit Bulls.

*Aos infinitamente adorados Laura e Felipe,
meus passarinhos com enormes corações
leoninos, detentores da plena felicidade e da
bondade, da inocente lucidez e da
generosidade, fontes inesgotáveis de amor e
que fazem de mim uma pessoa melhor, apenas
por carregar a grande honra de ser sua mãe,
dedico.*

***A todos os Pit Bulls, impiedosamente
corrompidos pelo ser humano, dedico.***

AGRADECIMENTOS

Ao grande Amor da minha vida, Marsel de Carvalho Pereira. Por, generosamente, doar suas ideias e seu tempo para a elaboração e realização deste trabalho. Por, pacientemente me oferecer suporte, amor e dedicação em todos os momentos sem qualquer hesitação ou questionamento.

Ao LAFEQ (Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino) por ter financiado este estudo e a CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

À minha Família Acadêmica:

Ao Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, por ser um grande líder. Obrigada de todo o coração, por ter me acompanhado nesta intensa jornada, de forma tão dedicada na elaboração de cada artigo e no auxílio incomensurável em todas as etapas deste processo. Obrigada também pela integral disponibilidade, pelas palavras de tranquilidade e serenidade. Sua generosidade, humanidade e gentileza jamais serão esquecidas!

Prof. Dr. Antonio de Queiroz Neto. Obrigada por todas as horas disponíveis, auxílios, dicas, correções, apontamentos, sugestões, ensinamentos. É, de fato, um mentor. Obrigada por estar sempre pronto a auxiliar seus orientados de forma tão generosa.

Ao Prof. Dr. Alvimar José da Costa, fundador e coordenador do CPPAR – Unesp – Jaboticabal, por ter generosamente cedido cães experimentais para realização de nosso primeiro experimento piloto, nos proporcionando ajustes metodológicos importantes.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pela ímpar colaboração nas análises estatísticas inovadoras, elevando nosso estudo a um novo patamar.

À Dra. Flora Helena de Freitas D'Angelis pela colaboração na realização de análises laboratoriais.

Ao Ten. Cel. MV Dr. Otávio Augusto Soares pela disponibilidade e auxílio nas análises de Bland-Altman e por abrir portas a mais estudos em cães de trabalho.

Aos membros responsáveis pelo Canil Municipal: Dra. Maria Angélica Dias, Dra. Sonia Mara Neves Ferri e Funcionários, por abrirem as portas do setor e por confiarem plenamente em nosso trabalho e cuidado com os cães.

Aos sempre amigos e companheiros de trabalho

Aline Tempesta, por realizar as imagens termográficas e por documentar o experimento. Amiga de coração, sempre a postos.

Julia de Carvalho, por ajudar muito com o manejo e socialização dos animais, que esqueceram a “selvageria” depois de receberem tantos afagos e cuidados.

Kamirro Bacciotti Nardi. Nem tenho palavras para agradecer sua perseverança em nos ajudar mesmo depois de passar por momentos de “terror” enfrentando situações perigosas, mas controláveis. Nem mesmo agora parece engraçado. Pela confiança, persistência e amizade sincera, obrigada.

Nathalia de Almeida Giória, BRAÇO DIREITO! Em todas as situações, amiga verdadeira, que doou seu tempo, muito tempo, aliás, mais uma vez para nos auxiliar na execução difícil deste trabalho. Obrigada Nathy!

Paulo Fernandes Marcusso, por sempre muito pontual e extremamente profissional ao realizar junto com Thalita, as análises hematológicas de PPT e Ht no laboratório de Patologia Animal, do qual fazem parte.

Thalita Petrillo, por deixar que Vick e Tupã, seus lindos e IMENSOS Pit Bulls, nos ajudassem a ajustar os protocolos. Obrigada por ser INFALÍVEL no manejo diário dos Pits do canil, que naturalmente se tornaram perdidamente

apaixonados por você! Obrigada por ser tão amorosa e delicada com eles, uma verdadeira Médica Veterinária.

Ao Departamento de Patologia Animal da FCAV – Unesp – Jaboticabal por ceder equipamentos, materiais e seus orientados Thalita e Paulo.

Aos cães colaboradores do primeiro piloto, cedidos pelo CPPAR

Alegre Zero-meia, obrigada por ser tão meiga e colaborativa, seu rostinho de labrador nunca será esquecido.

Tímida Suzy-K-olha, seu jeito nos ensinou muito a desenvolver a criatividade, até que você quisesse entrar na esteira, obrigada.

Cai-cai, nos mostrou quais equipamentos deveríamos desenvolver para a segurança dos cães na esteira rolante. Obrigada pequena.

X-9 com seu jeitão de boxer, obrigada por nos dizer como adequar o estudo para cães bagunceiros como você.

Desconfiado Escadinha, apesar da cara de bravo, nos disse tudo sobre como lidar com toda essa desconfiança e como descobrir suas reais necessidades, um biscoito!

Nonato-canivete, embora temperamental, uma máquina de correr, nos ajudou muito a como desenvolver métodos de contenção e segurança em altas velocidades.

Aos Pit Bulls colaboradores deste estudo

Cojac. Bola branca de músculos. Toda a gentileza não cabia em seu pequeno coração. Obrigada pela paciência e por repetir todos os protocolos todas as vezes que solicitado em nosso segundo piloto. Todos os afagos do mundo não são suficientes para demonstrar nossa gratidão.

Gilda, você é simplesmente demais! Um olhar doce que só você tem e a incrível prontidão para o treino. Correr, correr e correr mais. Amamos você de todo coração. Você é uma grande e valente companheira.

Tuop, amor à primeira vista. Tanto amor que Gilda não deixou você ficar pra trás e tivemos que trazer você conosco. Tão versátil a ponto de ser capaz de escalar as paredes. Obrigada por se esforçar tanto SpiderDog!

Gigante Sadã, seu coração e vontade não cabiam em seu corpo de Troll.

Little Teets, pequena valente, apesar de não gostar da companhia de outros Pits, adorava um Ser Humano e parecia querer colaborar ao máximo. Obrigada Pequena!

Linda Khaleesi. Nunca esquecerei você, que, sem me conhecer mais do que dois dias, protegia-me como se fosse treinada a vida toda para isso. Obrigada tigresa!

Bobby, que apesar do tamanho avantajado e do ímpeto de labrador colaborou de maneira excepcional durante o experimento, nos fazendo rir de seus pinotes e do seu sorriso largo.

Ogro, apesar das mordiscadas incessantes durante as corridas, entendi que sem um calcanhar, correr não teria graça nenhuma para você. Sua simpatia e carisma conquistaram a todos.

Texugo. Sem uma bola, o mundo ao seu redor não fazia nenhum sentido. Obrigada por correr tanto atrás da bola. E por gostar de “Eye of Tiger”.

Cido. Tão forte quanto gentil. Lindíssimo e extremamente doce. Seus beijos não tinham fim. Obrigada por nos mostrar como um Pit Bull com cara de mal pode ser, em verdade, tão amável e calmo.

Jhonny, maravilhosamente bem-disposto, apesar de ter destruído as espumas da esteira rolante, fazia disso um estímulo para correr mais e mais e mais. Tão obstinado quanto dócil e pacífico. Também era fã de Eye of Tiger!

Todos os cães conseguiram um novo lar após este experimento, e até onde se sabe, continuam sendo tratados com todo o respeito que conquistaram ao mostrarem a verdadeira essência dos Pit Bulls, exemplos de força, perseverança, tranquilidade, beleza e confiança.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Respostas fisiológicas de cães *American Pit Bull Terriers* destreinados submetidos a exercício intenso

TABELA 1: Média \pm DP das temperaturas de algumas regiões anatômicas de cães saudáveis da raça *American Pit Bull Terrier* submetidos a exercício incremental em esteira..... 27

TABELA 2: Média \pm DP do hematócrito (Ht), da frequência cardíaca (FC), glicose (Glic), lactato plasmático (Lac), pH, PvCO₂, HCO₃⁻, BE e PvCO₂ de cães saudáveis da raça *American Pit Bull Terrier* submetidos a exercício incremental em esteira..... 27

TABELA 3: Correlações entre as variáveis que participam do controle ácido-base e do lactato plasmático..... 28

CAPÍTULO 3 - Determinação do limiar de lactato em cães: comparação de métodos

TABELA 1. Média (\pm DP), erro típico (ET) e coeficiente de variação (CV) das velocidades obtidas a partir um teste de exercício incremental de cães da raça *American Pit Bull Terrier*..... 38

CAPÍTULO 4 - Comparação do aparelho portátil i-STAT com o YSI 2300 para determinação da concentração de lactato em *American Pit Bulls Terrier* submetidos a exercício intenso em esteira

TABELA 1. Valores de concentração de lactato (média \pm DP, range (alcance)) no YSI 2300 (plasma e sangue) e i-Stat (cartuchos CG4⁺) em 8 *American Pit Bulls Terrier* submetidos a exercício em esteira rolante..... 50

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Potencial do *American Pit Bull Terrier* como modelo de estudo em fisiologia do exercício

FIGURA 1. American Pit Bull Terriers durante experimento em fisiologia do exercício nas dependências do Lafeq (Lafeq-Unesp-Jaboticabal). Esteira rolante de alta performance projetada para equinos (A); Pit Bull correndo na esteira durante protocolo experimental de esforço (B e C). Morfometria de exemplar de Pit Bull durante experimento (D); Pit Bull utilizando equipamento de monitoramento cardíaco Polar Equino® adaptado à peitoral anatômico (E). (Fotos pertencentes ao acervo dos autores)..... 5

CAPÍTULO 2 – Respostas fisiológicas de cães *American Pit Bull Terriers* destreinados submetidos a exercício intenso

FIGURA 1. Protocolo de exercício incremental. Inclinação (%); Velocidade ($m s^{-1}$); Tempo (min); Distância percorrida (m); Momentos de coletas sanguíneas (gota)..... 20

FIGURA 2. Exemplo do método utilizado para cálculo da média de temperatura ($^{\circ}C$) das regiões de cabeça, tórax, abdome e membros torácico e pélvico de cães *American Pit Bull Terrier* submetidos a exercício em esteira rolante. Fotografia realizada pela equipe do Lafeq..... 22

FIGURA 3. Cortes seriados histológicos do bíceps femoral de cães American Pit Bull Terriers. Secção transversal de um mosaico de fibras musculares. (A) Coloração de atividade mATPase após pré-incubação a pH 4,53 e incubação a pH 10,52. (B) Coloração de actividade mATPase após pré-incubação a pH 10,51 e incubação a pH 9,40. (C) coloração histoquímica de NADH-TR. (D) Imuno-histoquímica para a miosina de contração lenta. O tipo de fibra I = marrom, e tipo II = ausência de coloração, 200x..... 29

CAPÍTULO 3 - Determinação do limiar de lactato em cães: comparação de métodos

FIGURA 1. Limites de concordância entre V_{LL} vs V_2 (A) e V_{LL} vs V_4 determinado por meio da metodologia Bland e Altman. V_{LL} , velocidade relacionada ao limiar de lactato determinado por meio da inspeção visual da curva lactato-velocidade. V_2 e V_4 velocidades que as $[lactato]_s$ atingem 2 e 4 $mmol l^{-1}$, respectivamente. Os testes foram realizados em 7 cães da raça American Pit Bull Terrier..... 38

FIGURA 2. Determinação visual do limiar de lactato (A). Comparação entre dois cães, cão 4 possui maior capacidade de resistência devido a sua curva lactato-velocidade ser mais deslocada a direita (B). Linha de tendência representando o modelo matemático exponencial (C). Correlação com tendência positiva entre V_2

vs V_{LL} e V_4 vs V_{LL} . Os resultados foram obtidos a partir de um teste de exercício incremental realizado em esteira com 7 cães da raça American Pit Bull Terrier..... 40

CAPÍTULO 4 - Comparação do aparelho portátil i-STAT com o YSI 2300 para determinação da concentração de lactato em American Pit Bulls Terrier submetidos a exercício intenso em esteira

FIGURA 1. Gráficos de Bland-Altman, demonstrando o grau de concordância entre as concentrações de lactato determinados pelo analisador portátil i-Stat e o analisador de bancada YSI. As linhas superior e inferior tracejadas representam os limites superior e inferior respectivamente, e a linha central representa o viés médio..... 51

FIGURA 2. Regressão ordinária dos produtos mínimos da relação entre concentrações de lactato plasmático determinadas pelo analisador portátil i-STAT e pelo analisador de bancada YSI..... 52

FIGURA 3. Regressão ordinária dos produtos mínimos da relação entre concentração de lactato sanguíneo determinada pelo analisador portátil i-Stat e pelo analisador de bancada de referência YSI..... 52

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais: Potencial do <i>American Pit Bull Terrier</i> como modelo de estudo em fisiologia do exercício.....	1
RESUMO.....	1
CAPÍTULO 2 – Respostas fisiológicas de cães <i>American Pit Bull Terriers</i> destreinados submetidos a exercício intenso.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
Adaptação à esteira.....	19
Protocolo de Exercício Incremental.....	19
Amostras sanguíneas e momentos de coleta.....	20
Mensurações.....	21
Termografia.....	21
Análise Estatística.....	26
RESULTADOS.....	26
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 3 - Determinação do limiar de lactato em cães: comparação de métodos.....	35
RESUMO.....	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 4 - Comparação do aparelho portátil i-STAT com o YSI 2300 para determinação da concentração de lactato em <i>American Pit Bulls Terrier</i> submetidos a exercício intenso em esteira.....	42
ANTECEDENTES:.....	42
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS.....	49
DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	57

CAPÍTULO 1 – Potencial do *American Pit Bull Terrier* como modelo de estudo em fisiologia do exercício

RESUMO

A Fisiologia do Exercício é um ramo da ciência que elabora métodos e programas de condicionamento aplicados no controle, prevenção e tratamento de enfermidades, bem como explica os mecanismos adaptativos comparando espécies animais. A espécie canina ainda é pouco estudada em seu perfil atlético mais amplo, sendo as raças tradicionalmente escolhidas para este fim o Greyhounds, cães de trenó e Retrievers do Labrador. O American Pit Bull Terrier, apesar de sua popularidade mundial, tem sido negligenciado pela comunidade acadêmica, apesar de sua versatilidade comprovada por sua participação bem sucedida em diversos esportes. Esta revisão traz aspectos relevantes sobre a raça e sua origem, bem como sobre as expectativas de inovadores estudos com enfoque no Pit Bull como modelo experimental.

Palavras-chave: cães, esporte, experimentação, monitoramento.

A Fisiologia do Exercício é um ramo da ciência formada por três segmentos fundamentais. O primeiro tem a finalidade de aplicar conceitos elementares para elaboração de métodos e programas de condicionamento físico objetivando especificamente o aumento do desempenho físico¹. A segunda aplica conceitos utilizados na prescrição de programas de exercício físico com o objetivo de tratar, controlar e prevenir enfermidades relacionadas com a síndrome metabólica em indivíduos da espécie humana². Finalmente, a outra vertente está relacionada ao interesse acadêmico de elaborar hipóteses sobre os mecanismos de adaptação a partir da prescrição de intensidades de esforço além de comparar espécies animais.

A avaliação do desempenho ou da aptidão atlética, por meio da mensuração de variáveis fisiológicas como a concentração de lactato plasmático, glicemia e frequência cardíaca pode ser realizada tanto em ambiente controlado, com o auxílio de equipamentos como esteira rolante³, quanto a campo, em situações reais ou simulações⁴.

A partir destas mensurações, a capacidade atlética de um indivíduo pode ser amplificada com a realização de exercícios específicos, como por exemplo, priorizando a utilização do metabolismo anaeróbio, que ressintetiza o ATP a partir da glicose proveniente de carboidratos, ou do metabolismo aeróbio, que necessita do oxigênio para formação de ATP, desta vez por meio da combustão de carboidratos e gorduras⁵.

Exercícios aeróbios são associados a atividades em baixa velocidade e longa duração, ao contrário dos exercícios anaeróbios, associados a atividades de curta duração e intensidade elevada, entende-se, velocidade ou peso⁶. A via

energética predominante dependerá tanto da intensidade do exercício quanto de sua duração⁷.

Mensurações do desempenho atlético por meio da lactatemia, por exemplo, são amplamente realizados em ratos⁸⁻¹², cavalos¹³⁻¹⁵ e humanos¹⁶⁻¹⁸.

A ciência evolui constantemente e transcendeu o esporte, na medicina humana permitiu que áreas como a cardiologia, nefrologia, fisioterapia, geriatria, nutrição, psicologia e enfermagem se beneficiassem dos conhecimentos adquiridos em fisiologia do exercício¹⁹⁻²³.

Na medicina veterinária, atletas da espécie equina são os maiores favorecidos com os avanços desta ciência, uma vez que são protagonistas de esportes clássicos como corrida^{24,25}, e outros como o trote²⁶, enduro²⁷, salto de obstáculos¹³, pólo²⁸ e adestramento²⁹, compondo modelos para estudos em fisiologia do exercício e mais especificamente, no delineamento ou visando o incremento das capacidades atléticas destes animais, elevando o nível das competições.

Já os a espécie canina foi por décadas utilizados como modelos experimentais, submetidos ao exercício, como método de avaliação das respostas fisiológicas frente a desafios como injúrias cardíacas induzidas³⁰, administração de fármacos³¹ e procedimentos cirúrgicos³² para extrapolação dos resultados para a espécie humana assim como Corneille Heymans que utilizou cães para demonstrar o papel de quimiorreceptores periféricos na regulação respiratória, trabalho pelo qual recebeu seu Prêmio Nobel em 1938³³.

As primeiras participações dos cães como modelo experimental em pesquisas no esporte, tiveram suas raças omitidas^{34,35}. Cães sem raça

definida (SRD) também foram amplamente utilizados como modelo ^{36-40,17}. Subsequentemente, com a evolução dos esportes caninos, os velocistas Greyhounds ⁴¹⁻⁴⁷ e cães de trenó ⁴⁸⁻⁵² ganharam notoriedade no estudo em fisiologia do exercício. Outros estudos foram delineados para raças específicas, como os Foxhounds ⁵³⁻⁵⁴, Beagles ⁵⁵⁻⁵⁷, Pastores Australianos ⁵⁸ e Retrievers do Labrador ⁵⁹⁻⁶¹, participantes de modalidades como farejamento, pastoreio e busca, respectivamente. Estudos também foram realizados para descrever respostas fisiológicas para determinadas atividades, como o Agility ⁶²⁻⁶⁴, bem como, busca e resgate⁶⁵.

Apesar da aparente disponibilidade para se trabalhar com cães em ambiente experimental, até o momento há poucos estudos em fisiologia do exercício com a espécie e principalmente sobre o American Pit Bull Terrier, raça escolhida por nós devido a sua popularidade mundial e por possuir um biotipo singular, com membros capazes de absorver mais energia nos ossos, evitando fraturas⁶⁶ e maior capacidade muscular, gerando mais força⁶⁷ garantindo maior capacidade anaeróbia quando comparado ao Greyhound, por exemplo. Além de ser uma raça bastante adaptável ao uso da esteira rolante, em estudos desenvolvidos por nós, esteira de alta performance destinada a equinos, bem como ao manejo e equipamentos utilizados para mensurações das variáveis fisiológicas (Figura 1).



Figura 1. American Pit Bull Terriers durante experimento em fisiologia do exercício nas dependências do Lafeq (Lafeq-Unesp-Jaboticabal). Esteira rolante de alta performance projetada para equinos (A); Pit Bull correndo na esteira durante protocolo experimental de esforço (B e C). Morfometria de exemplar de Pit Bull durante experimento (D); Pit Bull utilizando equipamento de monitoramento cardíaco Polar Equino® adaptado à peitoral anatômico (E). (Fotos pertencentes ao acervo dos autores).

A maioria das informações sobre a raça é difundida por meio de sítios na internet, documentários e livros, escritos em sua maioria por criadores ou entusiastas. O que nos motivou ainda mais para a realização deste estudo, quiçá o primeiro, que caracterizou as respostas fisiológicas induzidas pelo exercício intenso em esteira.

Como muitas raças modernas, é impossível ter certeza absoluta dos detalhes da história do American Pit Bull Terrier. No entanto, muitos entusiastas acreditam que as origens da raça remontam à antiguidade aonde a tribo Molossi selecionavam cães robustos e musculosos para guerra,

originando a classificação molossóides⁶⁸. Muito embora o Pit Bull não pertença a essa categoria (AKC).

Entre 50 d.C. a 410 d.C., a raça foi amplamente difundida por todo o Império Romano como cães de briga. Ao longo do caminho, foram inseridas raças européias originando os bulldogs. Quando os Normandos invadiram a Inglaterra, em 1066, introduziram um novo esporte chamado “isca”, onde açougueiros mantinham cães para lidar com touros indisciplinados conduzidos ao mercado de abate. Quando um touro exibia comportamento incontrolável, os cães mordiam seu focinho até o manipulador recuperar o controle do animal rebelde. Conseqüentemente, demonstrações públicas foram organizadas para mostrar as habilidades dos cães. Em 1835, esta prática tornou-se ilegal, em face disso surgiram outras atividades como o “ratting”, onde o cão era jogado em um foço (“pit”) com um variável número de ratos e corriam contra o relógio para determinar qual deles mataria o maior número de ratos no menor período de tempo⁶⁹.

Finalmente o desejo do público recaiu sobre a luta entre os cães, necessitando para tanto, animais menores e mais ágeis. Bulldogues de combate foram cruzados aos terriers, resultando o “bull-and-terrier”, mais comumente conhecido como o primeiro pitbull terrier criado especificamente para o combate entre cães. Os combatentes caninos passavam por um processo rigoroso do que os criadores chamavam de “treinamento” privando-os de contato normal com os seres humanos, com uma dieta de sangue e carne crua e mantendo-os em completa escuridão. Para aumentar a ansiedade pelo combate, seus manipuladores os obrigavam a correr em uma esteira rolante com um animal mais fraco à frente e fora do alcance, servindo de recompensa

ao final do exercício. Durante o curso de uma luta, esperava-se que os cães atacassem seus adversários sem medo ou hesitação, sinais contrários a esses eram interpretados como fraqueza ou desistência, culminando em sua morte pelas mãos o próprio manipulador ⁷⁰.

Em meados dos anos 1800, Pit Bulls foram levados aos Estados Unidos, trazidos do Reino Unido⁷¹. Quando os imigrantes ingleses vieram para a América juntamente com seus cães, as lutas tornaram-se comuns, contudo, com a marcha para o oeste, o pit bull assumiu uma função mais ampla, lidando com o gado e protegendo estes e seus proprietários de ladrões e animais selvagens⁶⁹.

Criadores e entusiastas estão ainda em busca do reconhecimento oficial. O American Kennel Club (AKC) foi criado em 1884 com o propósito de promover os interesses dos cães de raça pura e seus proprietários, patrocinando eventos destinados a testar diversas raças nas áreas de desempenho e conformação⁷².

Os eventos de desempenho, que incluíam categorias de trabalho, desporto e de pastoreio, representavam um problema imediato para o pit bull já que a função para a qual foram criados era ilegal. Assim como hoje é considerada aqui no Brasil, atividade classificada como crime de crueldade aos animais (art. 32 da Lei 9.605/98) com pena de 3 meses a 1 ano de detenção e multa (CBKC)

Apesar de ainda não ser reconhecido na Federação Cinológica Internacional (FCI) o AKC reconheceu o pit bull em 1936. Hoje, a AKC continua a incluir o Staffordshire Terrier americano em seu registro, embora,

ironicamente, esta tem se transformado em uma raça distinta de seu primo americano Pit Bull Terrier⁷².

Em 1898 o United Kennel Club (UKC) reconheceu o primeiro exemplar da raça, já com o nome de American Pit Bull Terrier, e em 1909 foi fundada nos Estados Unidos a ADBA (American Dog Breeders Association), uma associação exclusiva de criadores de cães raça American Pit Bull Terrier⁷³.

Atualmente, na medida do possível, tenta-se manter o American Pit Bull Terrier no formato original, com o incomparável e exclusivo “Gameness”, que é uma das principais características da raça, seguido de força muscular, agilidade e resistência. Sua força é desenvolvida tanto para deslocamentos horizontais como corridas, quanto verticais como saltos e escaladas em árvores⁷⁴.

O American Pit Bull Terrier tem ganhado muitos admiradores no Brasil e no mundo e tem sido respeitosamente inserido em uma variedade de funções na sociedade, como cão policial, cão de busca, cão de terapia e fazenda. Sem contar os esportes antes dominados por outras raças, como o Agility, o Flying Ball, Mergulho, tração, e os esportes criados para Pit bulls, como salto livre, salto em distância, escalada e skatedog. Apesar da publicidade ainda muito negativa, com treinamento e formação adequados o American Pit Bull Terrier pode ser um membro extremamente leal e valorizado da família.

Por todas estas razões, são necessários estudos adicionais em comportamento, fisiologia do exercício e desempenho atlético do American Pit Bull Terrier, objetivando mostrar as qualidades atléticas destes formidáveis cães e conseqüentemente minimizar o mito que o deprecia, mostrando que são

indivíduos sensíveis ao meio ambiente que os cercam, e que com dedicação e técnica podem aprender a ser bons cães de companhia ou de trabalho.

Importante informar que esta Tese foi elaborada sob a forma de capítulos, sendo que os mesmos foram formatados de acordo com as normas estabelecidas por cada periódico, medida prevista nas normas do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV. O segundo capítulo, que descreve algumas respostas observadas a partir de métodos como a hemogasometria, termografia e histoquímica muscular foi enviado para o periódico *Veterinary Record*. O terceiro capítulo que revela a determinação visual e por métodos fixos do limiar de lactato foi enviado para o *The Veterinary Journal*. Finalmente, no quarto capítulo, estudamos a comparação de duas metodologias para quantificação de lactato sanguíneo e plasmático e foi submetido para o *Veterinary Clinical Pathology*.

REFERÊNCIAS

- [1] Willmore, J.H.; Costill, D. L. Fisiologia do esporte e do exercício. Barueri: Manole, 2010.
- [2] Ehrman, J.E.; Gordon, P.M.; Visich, P.S.; Keteyian, S.K. Clinical exercise physiology. Champaign: Human Kinetics, 2009.
- [3] Ferraz, G.C.; Teixeira-Neto, A.R.; D'Angelis, F.H.F.; Lacerda-Neto, J.C.; Queiroz-Neto, A. Long-term creatine supplementation improves the aerobic capacity of horses. *Ciência Rural*, Santa Maria, 36, 2, 514-519, 2006.
- [4] Lindner, A.; Signorini, R.; Brero, L.; Arn, E.; Mancini, R.; Enrique, A. Effect of conditioning horses with short intervals at high speed on biochemical variables in blood. *Equine veterinary journal. Supplement*, v. 36, p. 88-92, 2006.
- [5] Gondim, F. J.; Zoppi, C. C.; Pereira-Da-Silva, L.; Macedo, D. V. Determination of the anaerobic threshold and maximal lactate steady state speed in equines using the lactate minimum speed protocol *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v.142, p.375-378, 2007.
- [6] Faude, O., Kindermann, W., Meyer, T. Lactate threshold concepts. How valid are they? *Sports Medicine*. 39, 469-490, 2009.

- [7] Spurway, N.C. Aerobic exercise, anaerobic exercise and the lactate threshold. *British Medical Bulletin*. 48, 3, 569-591, 1992.
- [8] Dubouchaud H., Eydoux N., Granier P., Préfaut C., Mercier J. Lactate transport activity in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles after acute exhaustive exercise. *Journal of Applied Physiology*. 87, 955-961, 1999.
- [9] Panveloski-Costa A.C., Papoti M., Moreira R.J., Seraphim P.M. Respostas lactacidêmicas de ratos ao treinamento intermitente de alta intensidade. *Revista Brasileira Medicina do Esporte*. 18, 122-125, 2012.
- [10] Araújo M.B., Vieira Jr R.C., Moura L.P., Costa Jr. M., Dalia R.A., Sponton A.C.S., Ribeiro, C., Mello M.A.R. Creatine supplementation in exercised rats: Effects on the aerobic capacity. *Open Journal of Animal Sciences*. 1, 21-26, 2013
- [11] Choi E.Y., Cho Y.O. The influence of different durations of aerobic exercise on fuel utilization, lactate level and antioxidant defense system in trained rats. *Nutrition Research and Practice*. 8, 27-32, 2014.
- [12] Tsumiyama W., Oki S., Umei N., Shimizu M.E., Ono T., Otsuka A. Evaluation of the lactate threshold during downhill running in rats. *Journal of Physical Therapy Science*. 26, 125-126, 2014.
- [13] Sabev S. Effect of the jumping activity in the course of training Exercise on the level of serum cortisol, blood lactate and heart rate in horses. *Trakia Journal of Sciences*. 9, 78-82, 2011.
- [14] Ferraz G.C., Brito H.C.D., Berkman C., Albernaz R.M., Araújo R.A., Silva M.H.M., D'Angelis F.H.F., Queiroz-Neto A.. Low dose of dichloroacetate infusion reduces blood lactate after submaximal exercise in horses. *Pesquisa Veterinária Brasileria*. 33, 57-60, 2013
- [15] Soares O.A.B., Ferraz G.C., Martins C.B., Dias D.P.M, Lacerda-Neto J.C., Queiroz-Neto A. Comparison of maximal lactate steady state with V₂, V₄, individual anaerobic threshold and lactate minimum speed in horses. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66, 39-46, 2014.
- [16] Bergman B.C., Wolfel E.E., Butterfield G.E., Lopaschuk G.D., Casazza G.A., Horning M.A., Brooks G.A. Active muscle and whole body lactate kinetics after endurance training in men. *Journal of Applied Physiology*. 87, 1684-1696, 1999.
- [17] Gladden L.B. Net lactate uptake during progressive steady-level contractions in canine skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 71. 514-520, 1991.
- [18] Gür E. A Comparison of blood lactate level and heart rate following a peak anaerobic power test in different exercise loads. *European Journal of Experimental Biology*. 2, 1854-1861, 2012.
- [19] Santos, N.; Costa, R.; KrueL, L. Efeitos de exercícios aeróbicos aquáticos sobre a pressão arterial em adultos hipertensos: revisão sistemática. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. 19,5, 548-558, 2014.

- [20] Medeiros, T.E.; Silva, L.A.; Pavlak, J.L.L.; Malfatti, C.R.M. Efeito dose-dependente da maltodextrina na glicemia e resposta cardiovascular em diabéticos tipo 2 durante exercício aeróbico. 8, 45, 164-170, 2014.
- [21] Sousa, J.F.; Ribeiro, J.C.; Sá, C.C.; Novo, A.; Lopes, V.P. Efeitos de um programa de exercício aeróbico nos níveis de atividade física em pacientes hemodializados. *Motricidade*, 10, 2, 72-80, 2014.
- [22] Borges, L.J.; Benedetti T.R.B.; Mazo, G.Z. Exercício físico, déficits cognitivos e aptidão funcional de idosos usuários dos centros de saúde de Florianópolis. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. 13, 3, 167-177, 2008.
- [23] Fernandez, A.C.; Mello, M.T.; Tufik, S.; Castro, P.M.; Fisberg, M. Influência do treinamento eróbio e anaeróbio na massa de gordura corporal de adolescentes obesos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 10, 3, 152-158, 2004.
- [24] Bronsart, L.; Sides, R.H.; Bayly, W.M. A comparative study of interval and continuous incremental training in Thoroughbreds. *Comparative Exercise Physiology*. 6, 2, 49-57, 2009.
- [25] Berkman, C.; Teixeira, L.G.; Pereira, M.C.; Sampaio, R.C.; Bernardi, N.; Lacerda-Neto, J.C.; Queiroz-Neto, A.; Ferraz, G.C. Influence of distance exercised during submaximal training on race earnings for Thoroughbred racehorses. *Ciência Rural*. (no prelo), 2015.
- [26] Revold, T.; Mykkänen, A.K.; Karlström, K.; Ihler, C.F.; Pösö, A.R.; Essén-Gustavsson, B. Effects of training on equine muscle fibers and monocarboxylate transportes in Young Coldblooded trotters. *Equine Veterinary Journal*. 42, sup 38, 289-295, 2010.
- [27] Ferraz, G.C.; Teixeira-Neto, A.R.; Pereira, M.C.; Linardi, R.L.; Lacerda-Neto, J.C.; Queiroz-Neto, A. Influência do treinamento aeróbio sobre cortisol e glicose plasmáticos em equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62, 1, 23-29, 2010
- [28] Ferraz, G. C.; Soares, O. A. B.; Foz, N. S. B.; Pereira, M. C.; Queiroz-Neto, A. The workload and plasma ion concentration in a training match session of high-goal (elite) polo ponies. *Equine Veterinary Journal*, v. 42, p. 191-195, 2010b
- [29] Hawson, L.A.; McLean, A.N.; McGreegy, P.D. Variability of scores in the 2008 Olympic dressage competition and implications for horse training and welfare. *Journal of Veterinary Behavior*. 5, 170-176, 2010.
- [30] Sutton, D.C.; Davis, M.D. Effects of exercise on experimental cardiac infarction. *Archives of Internal Medicine (Chic)*. 48, 6, 1118-1125, 1931.
- [31] Haidet, G.C.; Musch, T.I.; Friedman, D.B. Ordway, G.A. Cardiovascular effects of dobutamine during exercise in dogs. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 257, 3, 954-960, 1989.
- [32] Kaciuba-Uscilko, H.; Brzezinska, Z.; Kobryn, A. Metabolic and temperature responses to physical exercise in Thyroidectomized dogs. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 40, 219-226, 1979.

- [33] Boron, Walter F. and Emile L. Boulpaep. Medical Physiology. Saunders, 2012, p. 555.
- [34] Brouha L., Cannon W.B., Dill D.B. The heart rate of the sympathectomized dog in rest and exercise. *Journal of Physiology*. 87, 345-359, 1936.
- [35] Wyatt H.L., Mitchell J.H. 1974 Influences of Physical Training on the Heart of Dogs *Circulation Research* 35, 883-889, 1974.
- [36] Chamberst W.H., Miliiorat A.T. Muscular exercise and nitrogen metabolism of dogs. *Journal of Biology Chemistry*. 77, 603-618, 1927.
- [37] Issekutz B.J.R., Shaw W.A.S., Issekutz A.C. Lactate metabolism in resting and exercising dogs. *Journal of Applied Physiology*. 40, 312-319, 1976.
- [38] Ordway G.A., Charles J.B., Randall D.C., Billman G.E., Wekstein D.R. Heart rate adaptation to exercise training in cardiac-denervated dogs. *Journal of Applied Physiology*. 52, 1586-1590, 1983.
- [39] Kuzon W.M., Rosenblatt, J.D, Pynn, B.R., Marchetti, P.J., Plyley, M.J., McKee, N.H. A Comparative Histochemical and Morphometric Study of Canine Skeletal Muscle. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 53, 125-132, 1989.
- [40] Gladden L.B., Crawford R.E., Webster M.J. Effect of blood flow on net lactate uptake during steady-level contractions in canine skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 72, 1826-1830, 1992.
- [41] Nold J.L, Peterson L.J, Fedde M.R. Physiological changes in the running Greyhound (*Canis Domesticus*): Influence of race length. *Comparative Biochemistry Physiology*. 100, 623-627., 1991.
- [42] Schmalzried R.T., Toll P.W., Devore J.J., Fedde M.R. Microcontroller-based system for collecting anaerobic blood samples from a running greyhound. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 37, 183-190, 1992.
- [43] Kesl, L.D., Engen, R.L. Effects of NaHCO₃ loading on acid-base balance, lactate concentration, and performance in racing greyhounds. *Journal of Applied Physiology*. 85, 1037-1043, 1998.
- [44] Epp T.S., Erickso H.H., Woodworth J., Poole D.C. Effects of oral L-carnitine supplementation in racing Greyhounds. *Equine and comparative exercise physiology*. 4, 141-147, 2007.
- [45] Windred A.J., Osmotherly P.G., McGowan C.M. Pre-race warm-up practices in Greyhound racing: a pilot study. *Equine and Comparative Exercise Physiology*. 4, 119–122, 2007.
- [46] Gillette R.L., Angle T.C., Sanders J.S., DeGraves F.J. An evaluation of the physiological effects of anticipation, activity arousal and recovery in sprinting Greyhounds. *Applied Animal Behaviour Science*, 130, 101–106, 2011.
- [47] Horvath S.J., Couto C.G., Yant K., Kontur K., Bohenko L., Lazbik M.C., Marín L.M., Hudson D., Chase J., Frye, M., DeNicola, D.B. Effects of racing on

reticulocyte concentrations in Greyhounds. *Veterinary Clinical Pathology*. 43, 15-23, 2014.

[48] Ready A.E., Morgan D.G. The Physiological Response of Siberian Husky Dogs to Exercise: Effect of Interval Training. *Canadian Veterinary Journal*. 25, 86-91, 1984.

[49] Stepien R. L., Hinchcliff K. W., Constable P. D., Olson J. Effect of endurance training on cardiac morphology in Alaskan sled dogs. *Journal of Applied Physiology*. 85, 1368-1375, 1998.

[50] Banse H.E., Sides R.H., Ruby B.C., Bayly W.M. Effects of endurance training on VO₂max and submaximal blood lactate concentrations of untrained sled dogs. *Equine and Comparative Exercise Physiology*. 4, 89–94, 2007.

[51] Gerth N., Sum S., Jackson S., Starck J.M. Muscle plasticity of Inuit sled dogs in Greenland. *The Journal of Experimental Biology*. 212, 1131-1139, 2009.

[52] Love S.B., Davis M.S, Goad C.,Murphy K., Aichele D.B., Fossum T.W. Predictive haematological and serum biomarkers for canine endurance exercise. *Comparative Exercise Physiology*. 7, 109–115, 2011.

[53] Musch T.I., Haidet G.C., Ordway G.A., Longhurst J.C., Mitchell, J.H. Dynamic exercise training in foxhounds I. Oxygen consumption and hemodynamic responses. *Journal of Applied Physiology*. 59, 183-189, 1985.

[54] Musch T.I., Haidet G.C., Ordway G.A., Longhurst J.C., Mitchell, J.H. Training effects on regional blood flow response to maximal exercise in foxhounds. *Journal of Applied Physiology*. 62, 1724-1732, 1987.

[55] Bove A.A., Hultgren P.B., Ritzer T.F., Carey, R.A. Myocardial blood flow and hemodynamic responses to exercise training in dogs. *Journal of Applied Physiology*. 46, 571-578, 1979.

[56] Kelley, K.M., Hamann, J.J., Navarre, C., Gladden, L.B. Lactate metabolism in resting and contracting canine skeletal muscle with elevated lactate concentration. *Journal of Applied Physiology*. 93, 865-867, 2002.

[57] Rivera N.L.M., Balcuchi M., Cordeiro E.C., Bueno M.C., Maiorka, A. Análise da concentração sanguínea de lactato em cães alimentados com ácido linoleico conjugado. *Anais do Zootec*. 1-4, 2005.

[58] Hampson B.A., McGowan C.M. Physiological responses of the Australian cattle dog to mustering exercise. *Equine and Comparative Exercise Physiology*. 4, 37-41, 2007.

[59] Matwichuk C.L., Taylor S.M., Shmon C.L., Kass P.H., Shelton D. Changes in rectal temperature and hematologic biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. *American Journal of Veterinary Research*. 60, 88-92, 1999.

[60] Steiss J., Ahmad H.A., Cooper P., Ledford C. Physiologic Responses in Healthy Labrador Retrievers during Field Trial Training and Competition. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 18, 147–151, 2004.

- [61] Ferasin L., Marcora S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *Journal Comparative Physiology B*. 179, 839–845, 2009.
- [62] Rovira S., Muñoz A., Benito M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Veterinary Clinical Pathology*. 36, 30-36, 2007.
- [63] Rovira S., Muñoz A., Benito M. Fluid and eletrolyte shifts and after agility competitions in dogs. *Journal Veterinary Medicine Science*. 69, 31-35, 2007.
- [64] Rovira S., Muñoz A., Benito M. Heart rate, electrocardiographic parameters and arrhythmias during agility exercise in trained dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 161, 307-313, 2010.
- [65] Rovira S., Munoz A., Benito M. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. *Veterinarni Medicina*. 53, 333–346, 2008.
- [66] Kemp T.J., Bachus K.N., Nairn J.A., Carrier D.R. Functional trade-offs in the limb bones of dogs selected for running versus fighting. *The Journal of Experimental Biology*. 208, 3475-3482, 2005.
- [67] Pasi, B.M.; Carrier, D.R. Functional trade-offs in the limb muscle of dogs selected for running vs. fighting. *Journal of Evolutionary Biology*. 16, 2, 324-332, 2003.
- [68] The Bulldog Information Library – Molossars. Disponível em: <<http://www.bulldoginformation.com/molossars-mastiff-type-dogs.html>> Acesso em 20 janeiro de 2015.
- [69] The Real Pit Bull. Disponível em: <<http://www.realpitbull.com/history.html>>. Acesso em 24 de novembro de 2014.
- [70] Fleig, D. 1996. *The History of Fighting Dogs*. Tradução de William Charlton. Ed. Neptune, NJ: TFH Publications, 141pp.
- [71] Clark A.R., Brace A.H. 1995. *The international encyclopedia of dogs*. New York: Nowel Book House.
- [72] American Pit Bull Registry. Disponível em: <<http://www.pitbullregistry.com/Pit%20Bull%20History.htm>>. Acesso em 12 de novembro de 2014.
- [73] American Dog Breeders Association. Disponível em: <http://www.adbadog.com/p_home.asp> Acesso em 11 de novembro de 2014.
- [74] A origem dos cães de combate. Disponível em http://www.hapk.com.br/apbt_historia_br.htm. Acesso em 05 setembro de 2014.

CAPÍTULO 2 – Respostas fisiológicas de cães *American Pit Bull Terriers* destreinados submetidos a exercício intenso

Resumo

Dez cães American Pit Bull Terriers realizaram um teste de exercício incremental (TEI) em esteira. Quantificaram-se a temperatura superficial de cinco regiões anatômicas. Determinaram-se o hematócrito (Ht), a frequência cardíaca (FC), lactatemia [LA] e glicemia [GLI], variáveis hemogasométricas e do equilíbrio ácido-base. Realizou-se biópsia do músculo bíceps femoral para análise histoquímica. Empregou-se análise de variância (ANOVA) e correlação de Pearson ($P < 0,05$). O exercício induziu aumento da temperatura corpórea e da FC. O Ht, [GLI] e pH não se alteraram. No momento da fadiga observou-se redução da PvCO₂, HCO₃⁻ e do excesso de base. Observou-se elevação da PvO₂ e [LA]. Correlações positivas foram observadas entre PvCO₂ e pH; PvCO₂ e HCO₃⁻; HCO₃⁻ e EB. Entre a PvO₂ e PvCO₂; PvO₂ e HCO₃⁻; lactato e PvCO₂; e lactato e HCO₃⁻ as correlações foram moderadas. Predominaram as fibras musculares do tipo II. O esforço intenso provocou mudanças relacionadas com o aumento da demanda de oxigênio e com a contribuição da via anaeróbia de produção muscular de ATP com evidente aparecimento da alcalose respiratória e a acidose metabólica. Estes resultados fornecem uma base de referência para comparação com outros cães da raça American Pit Bull Terriers.

Palavras-chave: Cão; Desempenho; Equilíbrio Ácido-base; Termografia; Histoquímica.

INTRODUÇÃO

É conceito clássico que o exercício físico provoca uma série de alterações reversíveis no organismo. Alguns estudos descreveram respostas fisiológicas de cães submetidos ao exercício durante competições caninas. A maioria destas pesquisas utilizou cães de corrida (Greyhounds), de trenó (Huskies Siberianos) ou de busca (Labradores Retrievers) (Ilkiw e outros 1989; Hinchcliff e outros 1993; Steiss e outros 2004).

Ao final de uma corrida, os cães Greyhounds podem atingir até 18 m s^{-1} numa distância de 800 m, sendo esta modalidade considerada de intensidade máxima que provoca alterações hematológicas, bioquímicas e do equilíbrio ácido-base, evidenciadas principalmente pelo hematócrito, que atinge 64%, [LA] de $28,9 \text{ mmol l}^{-1}$ e pH venoso de 6,997 (Ilkiw e outros 1989; Hinchcliff e outros 1993). Já em atividades que exigem velocidades menores como a busca, praticada por Labradores Retrievers, ocorrem elevações moderadas da [LA], atingindo $3,1 \text{ mmol l}^{-1}$. Diferente da corrida, neste tipo de exercício podem ocorrer, de modo concomitante, alcalose respiratória e acidose metabólica moderada (Matwichuk e outros 1999; Steiss e outros 2004). As mesmas alterações moderadas ocorre nos cães de *agility*, com [LA] de $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ acompanhada de um Ht igual a 52% (Rovira e outros 2007a). Em esteira rolante, numa intensidade submáxima de esforço, a 2 m s^{-1} , cães da raça Beagle atingiram uma [LA] de $2,47 \text{ mmol l}^{-1}$ e um Ht de 48% (Piccione e outros 2012).

Em cães, os estudos a campo (Rovira e outros 2007a; Rovira e outros 2007b; Rovira e outros 2008; Rovira e outros 2010) são comuns. Entretanto, testes de esforço realizados em esteira podem ser realizados com maior

controle das condições ambientais que podem interferir no resultado das variáveis fisiológicas. A obtenção destas variáveis pode ser utilizada como referência para estudos posteriores, notadamente, para avaliação de cães com redução de desempenho ou com colapso induzido pelo exercício (Steiss e outros 2004), intolerância ao exercício (Rovira e outros 2007a) ou das possíveis alterações benéficas provocadas por programas de condicionamento que objetivam o alto rendimento e/ou a saúde.

O monitoramento dos cães num ambiente laboratorial, equipado com esteira, pode ser ainda simplificado com a utilização de aparelhos portáteis (Steiss e outros 2004) que quantificam variáveis hemogasométricas e do equilíbrio ácido-base, a partir de uma quantidade reduzida de sangue.

Outras avaliações podem ser realizadas para a descrição de características morfométricas. A tipificação das fibras musculares por meio de técnicas como a histoquímica e a imunohistoquímica é uma delas. Sabe-se que a proporção de fibras musculares varia de acordo com a raça (Toniolo e outros 2007), sendo que a proporção de fibras tipo I, IIA IIB ou IIX e as capacidades oxidativa, glicolítica e do recrutamento das mesmas podem influenciar diretamente na resposta metabólica frente ao exercício (D'Angelis e outros 2008).

Outra ferramenta que pode ser utilizada é a termografia cutânea, pois durante o exercício a temperatura ($T^{\circ}\text{C}$) da pele pode estar relacionada ao trabalho muscular devido a eficiência da dissipação do calor corpóreo que acontece, em grande parte, por meio de ondas eletromagnéticas de frequência infravermelha (Xu e outros 2013), que depende do fluxo sanguíneo subcutâneo. Quesada e outros (2015) detectaram a relação entre temperatura

cutânea de algumas regiões anatômicas e a atividade muscular de ciclistas submetidos a um TEI em bicicleta estacionária.

Atualmente não encontramos, numa pesquisa bibliográfica online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), sobre a fisiologia do exercício realizados com cães *American Pit Bull Terriers*. Deste modo, nós monitoramos respostas fisiológicas por meio da quantificação da FC, [LA], [GLI] e de variáveis hemogasométricas. Ademais, nós fizemos termografia e tipificação muscular em cães American Pit Bull Terriers saudáveis e sedentários que foram submetidos a um TEI.

MATERIAL E MÉTODOS

Cães

A amostra foi composta por 10 cães American Pit Bull Terrier destreinados (sete machos e três fêmeas) com idade de 5 ± 2 anos, pesando 29 ± 3 kg, e altura de cernelha de 50 ± 4 cm, pertencentes ao canil municipal de Jaboticabal, São Paulo, Brazil. A partir de alguns critérios de seleção, como comportamento calmo, permissividade ao toque e baixa reatividade a ruídos ou pessoas estranhas, os cães foram escolhidos a partir de um total de 18 Pit Bulls. Os cães foram considerados hígidos, após exame físico, hematológico e anamnese. Todos os indivíduos foram aclimatados ao ambiente experimental e à atividade em esteira rolante (Galopper[®], Sahinco LTDA, SP - Brasil) pertencente ao Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ-UNESP/Jaboticabal). Durante todo o período experimental os cães permaneceram em seus alojamentos habituais, sem qualquer alteração na rotina alimentar, manejo ou realização de qualquer tipo de exercício físico. O

fornecimento de ração comercial foi realizado 2 h antes do teste de esforço. O estudo seguiu os princípios de ética em Experimentação Animal adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pelo comitê institucional de ética e uso de animais (CEUA – 01236/12).

Adaptação à esteira

O procedimento foi realizado dentro do laboratório com os cães contidos por peitoral anatômico. A adaptação iniciou-se com os animais caminhando sobre a esteira desligada, acompanhados pelo condutor, seguida por sessões com velocidades baixas (1,5 a 2,0 m s⁻¹) e ao final da adaptação, atingindo velocidades altas (5 e 6 m s⁻¹) acrescida de vários graus de inclinação, sendo este conjunto de variáveis foram aleatoriamente combinadas de diversas maneiras, até que o cão não se assustasse mais com qualquer uma das variações de inclinação, velocidades ou ruídos. O protocolo consistiu de cinco sessões de 30 minutos cada, durante 5 dias consecutivos. Utilizaram-se brinquedos como bolinhas ou cordas, associados a reforço positivo com biscoitos.

Protocolo de Exercício Incremental

Após o aquecimento por 4 min numa velocidade de 1,0 m s⁻¹, as velocidades foram incrementadas com 5% de inclinação, a intervalos de quatro minutos, para 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 m.s⁻¹. A partir da última etapa de esforço, procedeu-se a desaceleração, retomando a velocidade para 1.0 m s⁻¹, por seis minutos, que correspondeu ao período de desaquecimento ativo. Seguido por mais 10 minutos de desaquecimento passivo. A fadiga foi determinada quando o cão demonstrou sua incapacidade de acompanhar o ritmo da esteira (Figura 1)

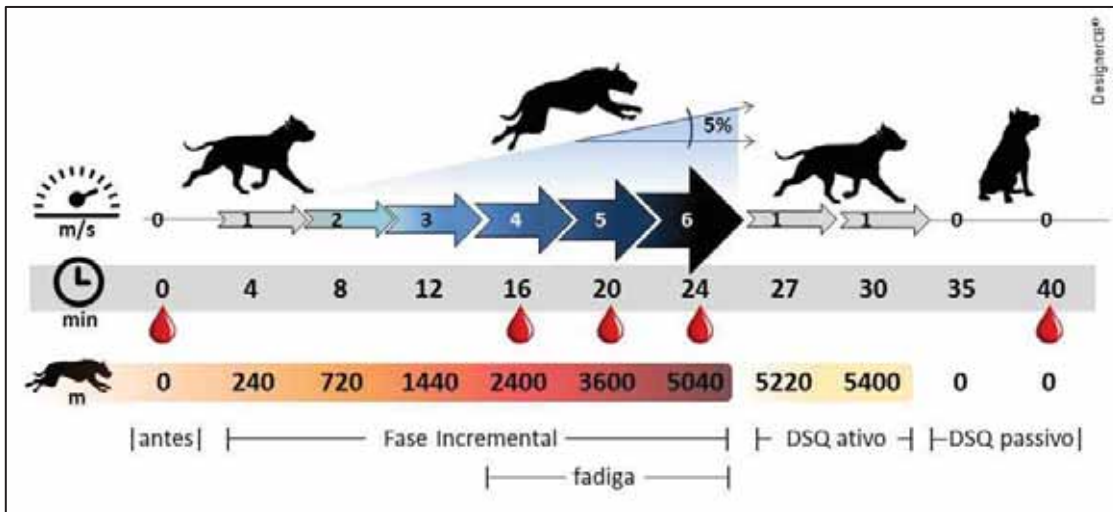


Figura 1. Protocolo de exercício incremental. Inclinação (%); Velocidade (m s^{-1}); Tempo (min); Distância percorrida (m); Momentos de coletas sanguíneas (gota).

Amostras sanguíneas e momentos de coleta

Fixou-se cateter (Insyte™ 16G, Becton Dickinson Industrias Cirúrgicas Ltda, SP - Brasil) no terço médio da veia cefálica esquerda de cada cão. Coletaram-se 2 ml de sangue nos momentos antes do exercício, imediatamente após a fadiga e no período de desaquecimento passivo. O exercício foi interrompido em 30 segundos para cada coleta. Para a quantificação das variáveis sanguíneas obteve-se, em cada etapa de esforço, 2 ml de sangue que foram acondicionados em tubos contendo fluoreto de sódio e mantidos sob refrigeração. Outra coleta de sangue foi realizada minimizando-se o tempo de contato com o oxigênio em seringas de 3,0 ml para determinação da hemogasometria.

Mensurações

As condições ambientais, T°C e umidade relativa do ar (URA), foram controladas com termohigrômetro digital portátil (HT-270 – Instrutherm- Itest Medição e Automação Ltda). O Ht foi quantificado imediatamente após a coleta por meio do método do microhematócrito. Para a análise da FC foi utilizado frequencímetro portátil (POLAR® Equino) adaptado para cães. As [LA] e [GLI] foram determinadas pelo método eletro-enzimático, com bioanalisador automático (YSI 2300 Stat Plus). As análises foram realizadas no máximo 30 minutos após a cada coleta. A hemogasometria foi quantificada imediatamente após a obtenção das amostras em analisador portátil i-STAT (cartuchos CG4⁺) que foi programado para funcionar a 37°C. As variáveis obtidas foram pH, pressão parcial venosa de dióxido de carbono (PvCO₂), pressão parcial venosa de oxigênio (PvO₂), dióxido de carbono total (tCO₂), excesso/déficit de base (EB), saturação de oxigênio (svO₂%) e concentração de bicarbonato (HCO₃⁻).

Termografia

As T°Cs superficiais corpóreas das regiões da cabeça, tórax, abdômen, membros torácicos e pélvicos do antímero esquerdo foram aferidas por termografia (FLIR 150®) ajustado com emissividade de 0,98 (BASILE e outros 2010). Para cada região anatômica monitorada escolheram-se cinco pontos aleatórios que foram utilizados para determinação da média aritmética da temperatura (Figura 2). A área da cabeça foi delimitada pelos músculos cutâneo da face, frontal e zigomático. A região torácica compreendeu os músculos serrátil dorsal e intercostais, localizados entre a primeira e a oitava

vértebra. No abdômen, os músculos iliocostal, longuíssimo lombar e oblíquo externo do abdome. No membro torácico a área estudada abrangeu os músculos superficiais localizados lateralmente ao braço e antebraço e no membro pélvico todos os músculos superficiais laterais da região da coxa.

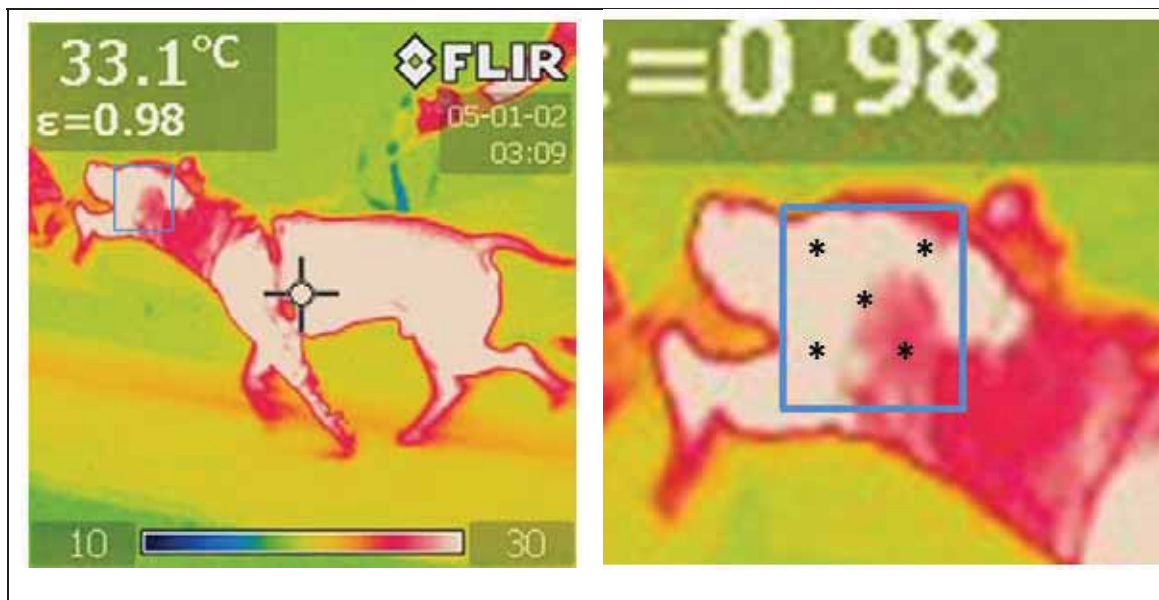


Figura 2. Exemplo do método utilizado para cálculo da média de temperatura (°C) das regiões de cabeça, tórax, abdome e membros torácico e pélvico de cães *American Pit Bull Terrier* submetidos a exercício em esteira rolante. Fotografia realizada pela equipe do Lafeq.

Tipificação Muscular

A tipificação foi realizada após as sessões de exercício na esteira. Para o procedimento de biopsia muscular, os cães permaneceram em jejum alimentar de 12 horas e hídrico por quatro horas. Ato contínuo, foram submetidos à medicação pré-anestésica com diazepam na dose de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ via endovenosa, seguido de $1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de xilazina associada a 10 mg kg^{-1} de cetamina, diluídos na mesma seringa, por via intravenosa. Após tricotomia e antissepsia, foi realizada biopsia incisional do ventre do músculo bíceps femoral (fragmento de $2,0 \times 0,5 \text{ cm}$). As amostras foram imediatamente congeladas em freezer -80°C para posterior análise. A síntese da musculatura

e subcutâneo foi realizada com fio absorvível multifilamentado de diâmetro 2-0 (Poliglactina 910) e dermorráfia com fio inabsorvível monofilamentado 2-0, pontos simples separado. Empregou-se terapia anti-inflamatória com cetoprofeno 5mg VO, na dosagem de 1mg mg kg^{-1} por três dias e terapia antimicrobiana com enrofloxacino pela via subcutâneo na dose de 5mg kg^{-1} durante três dias.

Histoquímica para atividade da mATPase miofibrilar

Para análise das fibras musculares quanto a sua capacidade glicolítica e oxidativa, as secções foram coradas para adenosina trifosfato miofibrilar (mATPase). A técnica histoquímica empregada foi do método de coloração metacromática da atividade da ATPase em miofibras, descrito por (D'angelis e outros 2014). Utilizou-se histoquímica para identificação das fibras oxidativas, oxidativas-glicolíticas e glicolíticas. Após o seccionamento, os cortes contidos na lâmina de vidro foram mantidos à temperatura ambiente, durante 30 a 40 minutos, para secagem e aderência à lâmina histológica. Eles foram fixados por 6 minutos à T°C ambiente (19 a 20°C) em formalina tamponada 5% pH 7,2 contendo 0,17 M de cloreto de sódio, 336 mM de sacarose e 0,13M de cacodilato de sódio. Após lavagens sucessivas, em tampão TRIS Base 21 mM pH 7,8 contendo 3,4 mM de cloreto de cálcio (ajuste de pH realizado com ácido clorídrico 5N, os cortes sofreram uma pré-incubação em meio ácido, pH 4,52 a 4,55) contendo 52 mM de acetato de potássio e 17,7mM de cloreto de cálcio, por cinco a seis minutos à T°C entre 19 a 20°C. Os cortes foram lavados, utilizando-se o mesmo tampão e o procedimento acima descrito, e incubados em meio alcalino (pH 10,50 à 10,55), contendo 40mM de glicina, 20mM de

cloreto de cálcio e 2,5mM de ATP à 37°C por 25 minutos. Após esses procedimentos, os cortes passaram por uma lavagem rápida com água destilada e incubados em solução aquosa de cloreto de cálcio 1% por três minutos, lavados rapidamente em água destilada, corados com azul de toluidina 1%, desidratados rapidamente em série de concentração crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados em entelan ou bálsamo do Canadá.

Histoquímica para potencial oxidativo-glicolítico das miofibras

O potencial oxidativo das fibras musculares esqueléticas foi avaliado por meio da técnica de nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase (NADH-TR) descrita por Novikoff e outros (1961). Para tanto, utilizou-se como marcador do padrão oxidativo, a enzima NADH (Sigma, SP). A técnica consistiu em incubar a amostra em solução que contém a enzima NADH e NBT (Nitro Blue tetrazolium) para formar o complexo NADH-TR. As lâminas contendo os cortes musculares foram mantidas à T°C ambiente durante 40 minutos, para secagem e aderência dos mesmos a lâmina histológica. Os cortes foram incubados durante 40 minutos em estufa a 37°C em solução contendo 8mg de NADHTR, 10mg de NBT e 10mL de tampão tris 0,2M pH 7,4. Em seguida, lavados em água destilada. Posteriormente, fixou-se em formol 5% tamponado pH 7,0, durante cinco minutos, seguidos de lavagem em água destilada e montados com xarope de Apathy. A análise imuno-histoquímica das fibras do músculo biceps femural direito foi utilizada para comprovar os dados histoquímicos. Para este método, duas secções seriadas transversais, de 12 µm de espessura, foram obtidas das mesmas amostras utilizadas para as análises histoquímicas e, simultaneamente, à confecção dos cortes para as

mesmas, utilizando-se criostato à -25°C . Os cortes foram submetidos ao método imunohistoquímico indireto (peroxidase anti-peroxidase: PAP) para marcação de fibras contendo miosina de contração lenta. Após secagem por 30 minutos à temperatura ambiente, os cortes foram fixados em formalina 3,5% por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este período, eles foram lavados em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 (duas vezes por dois minutos cada). Em seguida, foi realizado o bloqueio de peroxidases endógenas com 3 % de peróxido de hidrogênio em metanol, por 5 minutos. Após lavagem com tampão fosfato, os cortes foram incubados com soro inespecífico de coelho (1:50 em tampão fosfato) por 30 minutos à 4°C , em câmara úmida, para redução do background. Depois de retirado o soro, os cortes foram incubados com anticorpo primário monoclonal anti-slow myosin (1:4000 em tampão fosfato) por 2 horas e 30 minutos à 4°C , em câmara úmida. Os cortes foram lavados novamente com tampão fosfato (duas séries de quatro minutos, sob leve agitação), incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de cabra anti IgG de camundongo (1:100 em tampão fosfato) por 1 hora e 30 minutos à 4°C , em câmara úmida. Após nova lavagem com tampão fosfato (duas series de quatro minutos), os complexos antígeno-anticorpo foram revelados por incubação com diaminobenzidina (DAB - 0,2mg/1,5 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) contendo 2 a 3 gotas de peróxido de hidrogênio, à temperatura ambiente. A intensidade de coloração foi controlada visualmente ou sob microscópio. A reação de revelação foi bloqueada com a lavagem dos cortes com o tampão fosfato. Após contraste com hematoxilina férrica, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados com entelan. As fibras de contração lenta (tipo I) foram identificadas pela coloração dourada do

precipitado de DAB formado no complexo antígeno-anticorpo e as fibras de contração rápida (tipo II) foram identificadas pela ausência de coloração.

Análise Estatística

Utilizou-se o programa computacional Sigma Plot v.12, sendo que os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para avaliação da normalidade dos dados utilizou-se o teste de Shapiro-Wilks. Empregou-se análise de variância (ANOVA) de uma via para amostras repetidas no tempo, seguido pelo teste de Holm-Sidak, quando necessário. Para a variável pH empregou-se o teste de Friedman. Realizou-se correlação de Pearson entre todas as variáveis analisadas, sendo considerada correlação alta quando $0,6 < r < 1,0$, média com $0,4 < r < 0,5$ e baixa quando o valor de r foi menor que $0,39$. Para todas as análises estabeleceu-se o nível de significância em 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

A $T^{\circ}\text{C}$ e a URA mantiveram-se em $19,8 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$ (variação, 19,2-20,1%) e $62,5 \pm 0,52\%$ (variação, 62-63,4%). Oito cães atingiram a fadiga na etapa 5 m s^{-1} , um em 4 m s^{-1} e outro em 6 m s^{-1} . O tempo de fadiga variou entre 16 a 24 minutos e a distância percorrida entre 2400 a 5040 m. Todos os cães mostraram sinal de arquejo após a fadiga.

A tabela 1 revela que houve aumento da $T^{\circ}\text{C}$ corpórea superficial durante o esforço, com exceção dos membros torácicos. Não houve alteração do Ht ou da [GLI]. Houve elevação da FC ($P < 0,001$), no momento da fadiga e na recuperação em relação à antes do exercício.

TABELA 1: Média \pm DP das temperaturas de algumas regiões anatômicas de cães saudáveis da raça American Pit Bull Terrier submetidos a exercício incremental em esteira.

Localizações Anatômicas	Momentos		
	Antes	Fadiga	Recuperação
Cabeça	32,9 \pm 1,26	33,3 \pm 1,72	33,9 \pm 1,30*
Tórax	31,8 \pm 1,22	32,7 \pm 1,37*	33,3 \pm 1,09*
Abdome	31,1 \pm 1,26	32,4 \pm 1,74*	32,9 \pm 2,50*
Membro Torácico	31,3 \pm 1,50	32,3 \pm 1,32	32,7 \pm 1,64
Membro Pélvico	32,5 \pm 1,39	33,9 \pm 1,30*	34,1 \pm 1,80*

* Indica aumento em relação à antes do exercício (P < 0,05).

O pH não sofreu alteração (P = 0,358). No momento da fadiga observou-se redução da PvCO₂ (P=0,012), HCO₃⁻ (P=0,003) e do EB (P=0,004). Houve aumento da PvO₂ (P = 0,018) e da [LA] (P=0,002) (Tabela 2).

TABELA 2: Média \pm DP do hematócrito (Ht), da frequência cardíaca (FC), glicose (Glic), lactato plasmático (Lac), pH, PvCO₂, HCO₃⁻, BE e PvCO₂ de cães saudáveis da raça American Pit Bull Terrier submetidos a exercício incremental em esteira.

Variáveis	Momentos		
	Antes	Fadiga	Recuperação
Ht (%)	43 \pm 4	48 \pm 7	42 \pm 9
FC (bpm)	130 \pm 18	211 \pm 5*	137 \pm 28
Glic (mmol l ⁻¹)	4,51 \pm 0,28	4,58 \pm 0,56	4,72 \pm 0,91
Lac (mmol l ⁻¹)	1,75 \pm 0,86	4,61 \pm 3,03*	3,36 \pm 2,19
pH	7,46 \pm 0,06	7,53 \pm 0,14	7,45 \pm 0,19
PvCO ₂ (mmHg)	29 \pm 5,5	21,7 \pm 7,4*	24,5 \pm 7,8
HCO ₃ ⁻ (mmol l ⁻¹)	20,82 \pm 2,41	16,88 \pm 3,25*	18,46 \pm 1,84
BE	-2,5 \pm 2,8	- 5,6 \pm 2,9*	- 4,4 \pm 2,3
PvO ₂ (mmHg)	49,6 \pm 9,98	62,56 \pm 15,08*	53 \pm 11,94

* Indica alteração em relação à antes do exercício e ao período de recuperação (P < 0,05).

As correlações entre as variáveis relacionadas ao equilíbrio ácido-base e o [LA] estão apresentadas da Tabela 3. Correlações altas foram observadas entre PvCO₂ e pH; PvCO₂ e HCO₃⁻; HCO₃⁻ e EB. Entre a PvO₂ e PvCO₂; PvO₂ e HCO₃⁻; [LA] e PvCO₂; e [LA] e HCO₃⁻ as correlações foram moderadas.

TABELA 3: Correlações entre as variáveis que participam do controle ácido-base e do lactato plasmático.

	PvCO₂	HCO₃⁻	EB	PvO₂	Lactato
pH	-0,808*	-0,288	0,221	0.140	0,326
PvCO₂		0,718*	0,259	-0,425*	-0,568*
HCO₃⁻			0,832*	-0,441*	-0,564*
Excesso de base				-0,285	-0,343
PvO₂					0,319

* $p < 0.05$

As fibras musculares identificadas de acordo com a técnica de mATPase podem ser visualizadas na Figura 3A. Na técnica de coloração histoquímica NADH-TR (Figura 3 B), as fibras do tipo I são coradas em azul escuro, as do tipo II em azul intermediário e as do tipo III em azul claro. Enquanto na imunohistoquímica, fibras de contração lenta (tipo I) e fibras de contração rápida (tipo II) foram identificadas pela coloração marrom-dourado (Figura 3C). A frequência e a área total relativa das fibras do tipo I, IIA e IIX foram de 29.3, 30.7 e 40%; 29.32, 25.06 e 45.62%, respectivamente.

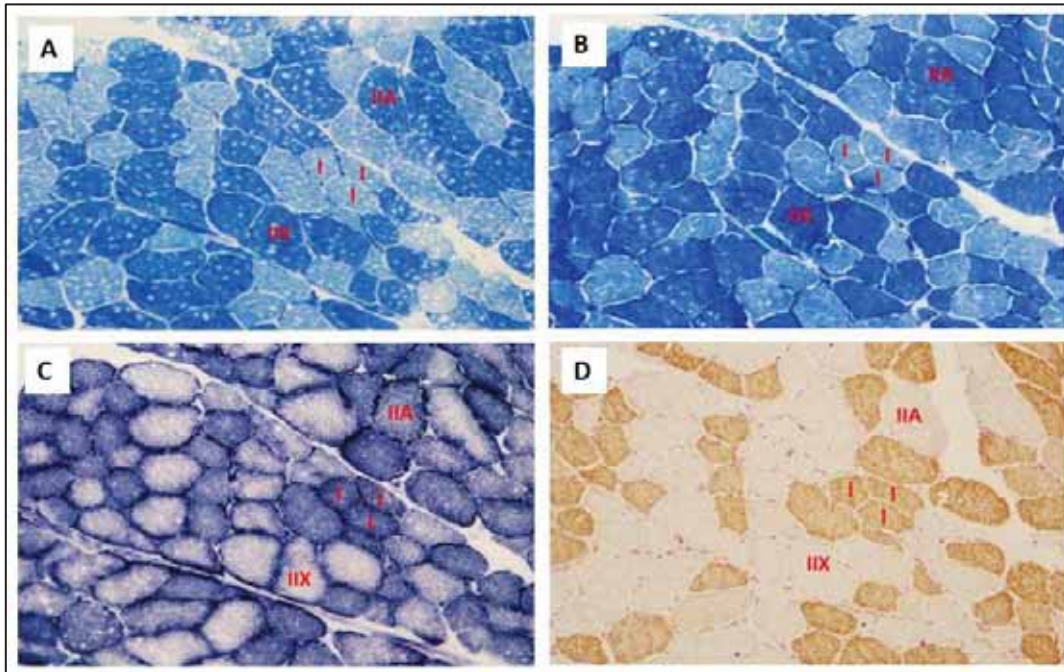


Figura 3. Cortes seriados histológicos do bíceps femoral de cães American Pit Bull Terriers. Secção transversal de um mosaico de fibras musculares. (A) Coloração de atividade mATPase após pré-incubação a pH 4,53 e incubação a pH 10,52. (B) Coloração de actividade mATPase após pré-incubação a pH 10,51 e incubação a pH 9,40. (C) coloração histoquímica de NADH-TR. (D) Imuno-histoquímica para a miosina de contração lenta. O tipo de fibra I = marrom, e tipo II = ausência de coloração, 200x.

DISCUSSÃO

A maioria das variáveis monitoradas teve alteração no momento imediatamente após a fadiga. A T°C ambiente e a URA da sala do laboratório mantiveram-se estáveis, sendo que o controle destes fatores permitiu minimizar as influências ambientais sobre variáveis fisiológicas como a T°C corpórea e a FC (McLaren e outros 2005). Nosso estudo pode ser utilizado como referência para a raça, no que tange os protocolos de exercício padronizados, bem como para aqueles casos relacionados com episódios de intolerância ao esforço ou no colapso induzido pelo exercício. Entretanto, como os valores iniciais da frequência cardíaca e do lactato plasmático foram relativamente elevados, em relação aos de referência para a espécie canina no repouso, podemos inferir

que, provavelmente, os cães tiveram um reflexo antecipatório a sala da esteira e ao início do exercício. O mesmo efeito foi relatado em cães da raça Labrador Retriever submetidos a esforço realizado a campo (Steiss e outros 2004).

O nosso protocolo de adaptação foi satisfatório, no que tange a prática de exercício em esteira. Contudo, devido a excitação verificada nos cães antes do exercício, que pode ser explicada pelo tempo de adaptação relativamente curto às condições laboratoriais, algumas abordagens alternativas para o registro das quantificações basais podem ser empregadas em estudos futuros, notadamente, que as coletas das amostras sejam realizadas no próprio canil (Steiss e outros 2004). No caso específico deste estudo talvez a aplicação deste procedimento apenas minimizasse o problema, pois os cães ficavam sob regime coletivo no canil e a simples chegada da equipe de pesquisadores provocava excitação nos cães.

O Ht, no momento da fadiga, não se elevou o suficiente para provocar diferença estatística. Isto pode ter ocorrido devido ao n amostral relativamente baixo. Em contrapartida, os da raça Greyhounds apresentaram hematócrito de até 64% após uma corrida (Ilkiw e outros 1989). Isso pode ser explicado facilmente pela velocidade atingida pelos Greyhounds (18 m s^{-1} em 800m) que supera àquelas atingidas por nossos Pit Bulls ($5-6 \text{ m s}^{-1}$ em 5.040m). A intensidade (velocidade) do esforço é um estímulo para ativação do sistema nervoso simpático com liberação de catecolaminas, que sensibilizam receptores adrenérgicos α_1 do baço, provocando contração esplênica aumentando o número de hemácias circulantes e a hemoglobinemia. Este efeito é benéfico, pois eleva a capacidade aeróbia devido ao aumento do transporte de oxigênio para o músculo esquelético (Ferraz e outros 2009).

Dentre as principais alterações momentâneas na homeostase de cães que praticam exercício, parece evidente que a elevação da temperatura corpórea possui importância considerável (Matwichuk e outros 1999; Steiss e outros 2004), sendo que a gênese desta alteração está relacionada com a energia química (ATP) utilizada durante a contração muscular que é convertida em calor. Os cães fazem a termorregulação basicamente por meio do arquejamento (Reece, 2005). Este mecanismo foi muito evidente em todos os cães ao final do exercício, sendo que os resultados obtidos a partir da avaliação termográfica indicaram aumento médio de 1,8°C (4,5%). Esta variação foi semelhante àquelas obtidas em outros tipos de exercício e raças como o Greyhounds (Ilkiw e outros 1989) e em Labrador Retriever (Steiss e outros 2004). Porém, nestes estudos avaliou-se a T°C retal. A partir da comparação destes resultados, evidencia-se uma relação próxima entre a variação da T°C cutânea com a retal relacionada ao exercício.

Os resultados das variáveis hemogasométricas e do equilíbrio ácido-base obtidos coincidiram com outros estudos (Matwichuk e outros 1999; Steiss e outros 2004). A correlação entre a PvCO₂ e HCO₃⁻ foi alta, sendo que a hiperventilação (arquejo) provocou hipocapnia venosa, provavelmente decorrente de alguns fatores, tais como a necessidade de oxigênio, de compensação respiratória devido a acidose metabólica (redução do bicarbonato e do excesso de base) e da termorregulação. A hipocapnia provoca tendência de elevação do pH venoso, indução de alcalose respiratória, devido ao aumento da razão bicarbonato/PCO₂. Já a elevação da PvO₂ pode ser explicada pelo incremento da temperatura corpórea que desloca a curva de

dissociação da oxi-hemoglobina para a direita, refletindo a mitigação da afinidade do O₂ pela hemoglobina (Robinson, 2013).

Durante o esforço intenso ocorre contribuição significativa da produção anaeróbia de ATP por meio do aumento da taxa da glicólise (Ferraz e outros 2013) devido a contração de fibras musculares do tipo II (IIA e IIX), que nos cães do presente estudo tiveram uma frequência e área média relativa aproximadamente de 70,7%. Este fato pode explicar o aumento da [LA] observado no presente estudo. Concomitante, ocorre acúmulo de íons H⁺ como subproduto do metabolismo anaeróbio (Robergs, 2001) provocando a acidose metabólica.

Do ponto de vista clínico a ocorrência de alcalose respiratória e acidose metabólica em conjunção com a hipertermia podem estar relacionadas à redução do desempenho atlético ou ao colapso induzido pelo exercício (Steiss e outros 2004). Porém, o clínico deve compreender que estas alterações são inerentes ao exercício, sendo que o grau destas mudanças está relacionado a intensidade e duração do esforço, condicionamento físico, bem como as condições ambientais que a atividade física é realizada. Os cães que apresentam intolerância ou colapso induzido pelo exercício podem possuir enfermidades prévias como desequilíbrio hidroeletrolítico, insuficiência cardíaca ou doença pulmonar.

Concluindo, o esforço intenso em esteira produziu mudanças significativas na temperatura, nos gases sanguíneos e no estado ácido-base que são consistentes com a contribuição das vias aeróbias e anaeróbias de resíntese de energia muscular. Estes valores obtidos num teste de esforço padronizado servem de referência para cães da raça American Pit Bull Terriers.

REFERÊNCIAS

- BASILE, R.C., BASILE, M.T., PEREIRA, M.C., FERRAZ, G.C. & QUEIROZ-NETO, A. (2010) Equine inflammatory process evaluation using quantitative thermographic methodology. *Ars Veterinaria*, 26, 77-81.
- D'ANGELIS, F.H., FERRAZ, G.C., SANTOS, E.B., STEQUE, M.F., FERINGER-JUNIOR, W.H. & QUEIROZ-NETO, A. (2014). Standardization of metachromatic staining method of myofibrillar ATPase activity of myosin to skeletal striated muscle of mules and donkeys. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34, 917-922.
- FERRAZ, G.C., TEIXEIRA NETO, A.R., D'ANGELIS, F.H.F., LACERDA NETO, J.C. & QUEIROZ-NETO, A. (2009) Hematological and cardiac alterations in Arabian horses submitted to incremental effort test in treadmill. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 46, 431-437.
- FERRAZ, G.C., BRITO, H.C.D., BERKMAN, C., ALBERNAZ, R.M., ARAÚJO R.A., SILVA, M.H.M., D'ANGELIS, F.H.F. & QUEIROZ-NETO A. (2013) Low dose of dichloroacetate infusion reduces blood lactate after submaximal exercise in horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33, 57-60.
- HINCHCLIFF, K.W., OLSON, J., CRUSBERG, C., KENYON, J., LONG, R., ROYLE, W. & BURR, J. (1993). Serum biochemical changes in dogs competing in a long-distance sled race. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202, 401-405.
- ILKIW, J.E., DAVIS, P.E. & CHURCH D.B. (1989). Hematologic, biochemical, blood-gas, and acid-base values in greyhounds before and after exercise. *American Journal Veterinary Research*. 50, 583-586.
- MATWICHUK, C.L., TAYLOR, S.M., SHMON C.L., KASS P.H. & SHELTON D. (1999) Changes in rectal temperature and hematologic biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. *American Journal of Veterinary Research* 60, 88-92.
- MCLAREN, C., NULL, J. & QUINN, J. (2005) Heat stress from enclosed vehicles: moderate ambient temperatures cause significant temperature rise in enclosed vehicles. *Pediatrics* 116, 109-112.
- NOVIKOFF, A.B., SHIN, W. & DRUCKER J. (1961) Mitochondrial localization of oxidation enzymes: staining results with two tetrazolium salts. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9, 47-61.
- PICCIONE, G., CASELLA, S., PANZERA, M., GIANNETTO, C., & FAZIO, F. (2012) Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained beagle dogs. *Experimental Animals* 61, 511-515.
- QUESADA, J. I. P., CARPES, F. P., BINI, R. R., PALMER, R. S., PÉREZ-SORIANO, P., & DE ANDA, R. M. C. O. 2015. Relationship between skin temperature and muscle activation during incremental cycle exercise. *Journal of Thermal Biology*, 48, 28-35.

- REECE, W. 2005. Functional anatomy and physiology of domestic animals. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.
- ROBERGS, R.A. (2001) Exercise-induced metabolic acidosis: where do the protons come from? *Sportscience* 5, 1-20.
- ROVIRA S., MUNOZ A. & BENITO M. (2008). Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs *Veterinarni Medicina*. 53, 333–346.
- ROVIRA S., Muñoz A. & Benito M. (2007a) Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Veterinary Clinical Pathology* 36, 30-36.
- ROVIRA S., MUÑOZ A. & BENITO M. (2007b) Fluid and eletrolyte shifts and after agility competitions in dogs. *Journal Veterinary Medicine Science*. 69, 31-35.
- ROVIRA S., MUÑOZ A., BENITO M. (2010) Heart rate, electrocardiographic parameters and arrhythmias during agility exercise in trained dogs *Revue de Médecine Vétérinaire*. 161, 307-313.
- STEISS, J., AHMAD, H.A., COOPER, P. & LEDFORD, C. (2004). Physiologic responses in healthy labrador retrievers during field trial training and competition. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 18, 147–151.
- TONIOLO, L., MACCATROZZO, L., PATRUNO, M., PAVAN, E., CALIARO, F., ROSSI, R., RINALDI, C., CANEPARI, M., REGGIANI, C. & MASCARELLO, F. (2007). Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292, C1915-C1926.
- XU, X., KARIS, A. J., BULLER, M. J., & SANTEE, W. R. (2013). Relationship between core temperature, skin temperature, and heat flux during exercise in heat. *European Journal of Applied Physiology* 113, 2381-2389.

CAPÍTULO 3 - Determinação do limiar de lactato em cães: comparação de métodos

RESUMO

O limiar de lactato (LL) é utilizado tanto para avaliação como para a prescrição de programas de condicionamento. Sete cães da raça *American Pit Bull Terrier* realizaram um teste de exercício incremental (TEI). Determinou-se por meio de identificação a velocidade no limiar de lactato (V_{LL}). Quantificaram-se a V_2 e V_4 (velocidades que as $[lactato]_s$ atingem 2 e 4 $mmol\ l^{-1}$). Aplicou-se ANOVA, método de concordância de Bland e Altman e testes de confiabilidade. A V_{LL} não diferiu da V_2 e V_4 . O modelo matemático exponencial foi positivo ($R^2=0,93$). O viés médio foi de 0.62 e -0.07 $m\ s^{-1}$. A confiabilidade foi de 0.21 e 0.79. Estudos sobre a correlação da V_{LL} , V_2 , e V_4 , com a máxima fase estável de lactato (MAFEL) são necessários.

Palavras-Chave: cães, limiar de lactato, exercício incremental, esteira rolante.

INTRODUÇÃO

A relação exponencial entre a concentração de lactato plasmático [lactato] obtida a partir de um teste de exercício incremental (TEI) é uma ferramenta importante para o diagnóstico da capacidade de endurance e prescrição de programas de condicionamento (Faude et al., 2009; Soares et al., 2014). A deflexão da curva lactato-velocidade (CLV), caracterizada pelo aumento abrupto da [lactato] durante um TEI, representa o início do desequilíbrio entre a produção e a remoção de lactato. Em equinos a deflexão observada na CLV pode ocorrer entre [lactato]_s de 2,0 a 4,0 mmol l⁻¹ (Campbell et al., 2011). Essa deflexão é conhecida como *onset blood lactate accumulation* (OBLA, notadamente quando a [lactato] atinge 4 mmol l⁻¹) ou limiar de lactato (LL) (Miranda et al., 2014).

Numa pesquisa bibliográfica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), não encontramos nenhum estudo em cães que determinou o LL por meio da CLV. Um estudo sobre a confiabilidade de um TEI relatou resultados confiáveis e reproduzíveis sobre as [lactato]_s. Contudo, o TEI não provocou aumento abrupto das [lactato]_s em cães da raça Labrador retrievers (Ferasin e Marcora, 2009). Nós aplicamos um TEI em cães objetivando determinar o LL (ponto de deflexão) e sua velocidade relacionada (V_{LL}). Ademais, comparou-se a V_{LL} com os métodos fixos V₂ e V₄ (velocidades que as [lactato]_s atingem 2 e 4 mmol l⁻¹).

MATERIAL E MÉTODOS

Sete cães destreinados da raça *American Pit Bull Terrier* (quatro machos e três fêmeas) com idade de 5 ± 2 anos, peso corpóreo de 29 ± 3 kg foram

submetidos a um TEI em esteira. Os cães utilizaram peitoral anatômico para facilitar a contenção e a aclimatação consistiu em cinco sessões de 30 minutos na esteira por cinco dias consecutivos. Primeiramente, os cães foram conduzidos sobre a esteira desligada e, conforme se acostumavam com o equipamento, os cães caminhavam sobre a esteira em baixa velocidade (1,5 a 2,0 m s⁻¹) e o condutor que caminhava ao lado do cão gradualmente o encorajava a aumentar a velocidade.

Após o aquecimento por 4 min numa velocidade de 1,0 m s⁻¹, as velocidades foram incrementadas com 5% de inclinação, a intervalos de quatro minutos, para 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 m.s⁻¹. A temperatura (T°C) e umidade relativa do ar (URA) foram controladas com termohigrômetro (HT-270 – Instrutherm- Itest Medição e Automação Ltda). Fixou-se cateter (Insyte™ 16G, Becton Dickinson, SP - Brasil) no terço médio da veia cefálica esquerda de cada cão. Coletaram-se 2 ml de sangue 30 segundos após o término de cada etapa de esforço. Determinaram-se as [lactato]_s pelo método eletro-enzimático (YSI 2300, Yellow Springs Instruments, USA). Realizou-se análise estatística utilizando-se o programa computacional Sigma Plot v.12. Determinou-se por meio de identificação visual (Cunha et al., 2009) a V_{LL}. Por meio de função exponencial quantificaram-se a V₂ e V₄. Empregou-se análise de variância (ANOVA) para comparação das velocidades obtidas. Avaliou-se a confiabilidade por meio do erro típico (TE) e do coeficiente de variação (CV). Aplicou-se o método de Bland e Altman para determinação dos viéses médios e dos limites de concordância e correlação de Pearson entre V_{LL} versus V₂ e V_{LL} versus V₄. Para todas as análises estabeleceu-se o nível de significância em 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A T°C e URA foram de $19,8 \pm 0,18^\circ\text{C}$ (variação, 19,2-20,1%) e $62,5 \pm 0,52\%$ (variação, 62-63,4%). A V_{LL} não diferiu ($P= 0,463$) da V_2 e V_4 , sendo que os valores de ET e CV podem ser visualizados na Tabela 1.

TABELA 1. Média (\pm DP), erro típico (ET) e coeficiente de variação (CV) das velocidades obtidas a partir um teste de exercício incremental de cães da raça American Pit Bull Terrier.

Velocidades	M	ET	CV
V_{LL}	$2,90 \pm 0,58$	-	-
V_2	$2,27 \pm 1,18$	0,21 (0,14; 0,51)	27,2 (13-41)
V_4	$2,97 \pm 1,45$	0,79 (0,51; 1,74)	18,7 (8-28)

Não houve diferenças entre as velocidades (m s^{-1}). V_{LL} , velocidade relacionada ao limiar de lactato determinado por meio de identificação visual. V_2 e V_4 (velocidades que as $[\text{lactato}]_s$ atingem 2 e 4 mmol l^{-1} , determinadas por meio de regressão exponencial). CV foi expresso em porcentagem (%). Nas colunas ET e CV as comparações da segunda e terceira linhas são sempre entre V_{LL} vs V_2 e V_{LL} vs V_4 , respectivamente. Valores entre parênteses representam os limites de confiança inferiores e superiores a 95%.

O viés médio e os limites de concordância (Figura 1) foram relativamente estreitos, $0,62 \text{ m.s}^{-1}$ (95% IC -1,12 a $2,38 \text{ m.s}^{-1}$) para V_{LL} vs V_2 e $-0,07 \text{ m.s}^{-1}$ (95% IC -2,63 a $2,12 \text{ m.s}^{-1}$) para V_{LL} vs V_4 .

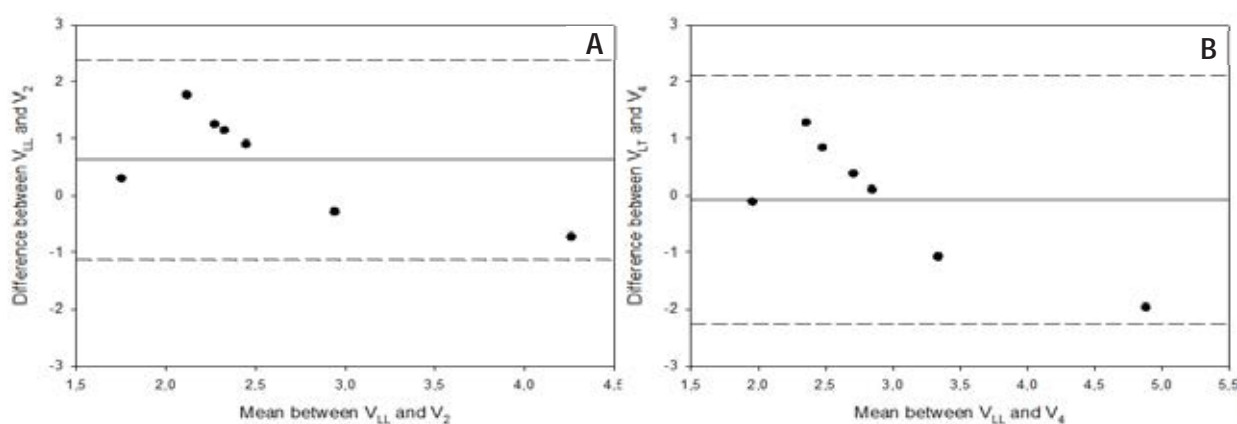


FIGURA 1. Limites de concordância entre V_{LL} vs V_2 (A) e V_{LL} vs V_4 determinado por meio da metodologia Bland e Altman. V_{LL} , velocidade relacionada ao limiar de lactato determinado por meio da inspeção visual da curva lactato-velocidade. V_2 e V_4 velocidades que as $[\text{lactato}]_s$ atingem 2 e 4 mmol l^{-1} , respectivamente. Os testes foram realizados em 7 cães da raça American Pit Bull Terrier.

A elevação abrupta da [lactato] e determinação visual da V_{LL} pode ser observada na Figura 2A. Exemplificando, o cão 1 possui melhor resistência ao exercício quando comparado ao cão 4, pois a sua CLV é mais deslocada para a direita, indicando maior capacidade de endurance e resistência a fadiga (Figura 2B). A regressão exponencial (Figura 2C) teve um coeficiente de determinação (R^2) positivo, indicando que o modelo matemático exponencial da CLV foi satisfatório. As correlações entre V_{LL} e V_2 e V_{LL} e V_4 (Figura 2D) apresentaram uma tendência de correlação positiva.

O principal achado deste estudo foi a identificação do LL em cães, a partir de um crescimento exponencial das [lactato]_s induzidas por um TEI. O período de adaptação contribuiu com o desempenho dos cães na esteira, melhorando a eficiência do movimento em relação às velocidades do TEI, contrariamente ao estudo realizado por Ferasin e Marcora, (2009).

O nosso resultado foi diferente daquele publicado por Ferasin e Marcora (2009), que aplicaram um protocolo de TEI semelhante em cães da raça Labradores retrievers. Eles não encontraram o ponto de deflexão da CLV, sendo que este achado foi imputado pela possível diferença existente em cães, no que tange a capacidade de transporte de lactato produzido pelo músculo e transportado para o sangue. Os autores especularam que o transporte de lactato pode ocorrer mais lentamente no cão, talvez pela densidade baixa dos transportadores de monocarboxilatos.

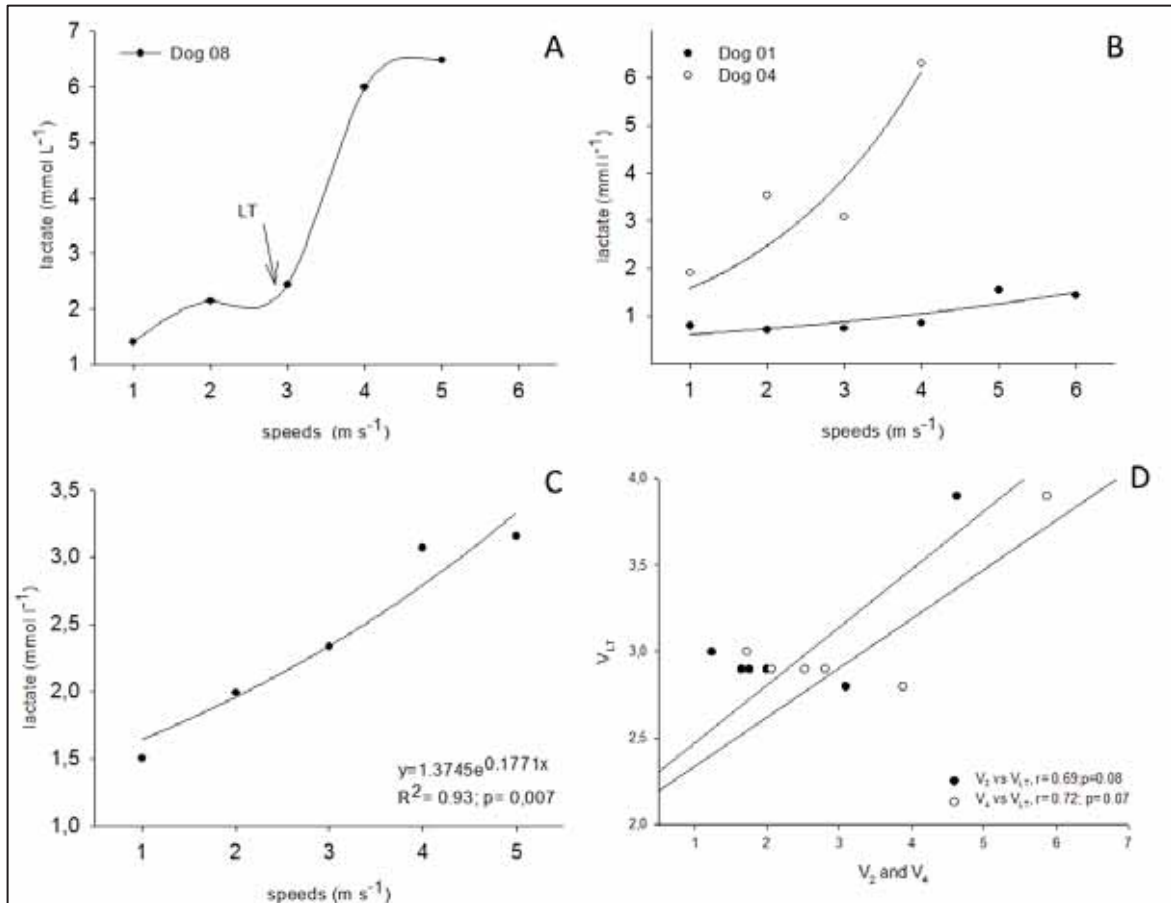


FIGURA 2. Determinação visual do limiar de lactato (A). Comparação entre dois cães, cão 4 possui maior capacidade de resistência devido a sua curva lactato-velocidade ser mais deslocada a direita (B). Linha de tendência representando o modelo matemático exponencial (C). Correlação com tendência positiva entre V_2 vs V_{LL} e V_4 vs V_{LL} . Os resultados foram obtidos a partir de um teste de exercício incremental realizado em esteira com 7 cães da raça American Pit Bull Terrier.

Outros fatores como a protocolo-dependência dos testes, condicionamento físico, raça, tipo de fibra muscular (Lindner et al., 2010; Miranda et al., 2014), podem influenciar no aumento da [lactato] nos cães submetidos a exercício. Indubitavelmente, a relação entre protocolo de esforço e todos os fatores citados é uma lacuna presente na literatura.

O método da inspeção visual (V_{LL}) teve uma concordância relativa com os métodos fixos. Os métodos fixos são intensamente utilizados em humanos e equinos (Soares et al, 2014). Na verdade, tanto a determinação visual como os

métodos fixos são metodologias utilizadas para predizer a máxima fase de lactato (MFEL), “método padrão ouro” para determinação da capacidade de endurance, que indica a maior contribuição possível do fornecimento de energia a partir da fosforilação oxidativa. Na prática, a predição da MAFEL, a partir do TEI e da CLV determina a maior intensidade de exercício que pode ser mantida por um período de tempo longo, sem a contribuição considerável do metabolismo anaeróbio e aumento da [lactato]. Esta abordagem é inexistente em cães, sendo que estudos futuros são necessários para elucidar qual método está mais correlacionado com a MAFEL.

REFERÊNCIAS

- Campbell, E.H., 2011. Lactate-driven equine conditioning programmes. *The Veterinary Journal*, 190, 199-207.
- Cunha, R.R., de Carvalho Cunha, V.N., Segundo, P.R., Moreira, S.R., Kokubun, E., Campbell, C.S.G., Simões, H.G., 2009. Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. *Cell biochemistry and function*, 27, 351-357.
- Ferasin L., Marcora S., 2009. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *Journal Comparative Physiology B*. 179, 839–845.
- Faude, O., Kindermann, W., Meyer, T., 2009. Lactate threshold concepts. *Sports Medicine*, 39, 469-490.
- Lindner, A.E., 2010. Maximal lactate steady state during exercise in blood of horses. *Journal of animal science*, 88, 2038-2044.
- Miranda, M.C.P.C.; Queiroz-Neto, A.; Silva-Júnior, J.R.; Soares, O.A.B.; Borgui, R.T.; Ferraz, G.C., 2014. Comparison of the lactate minimum speed and the maximal lactate steady state to determine aerobic capacity in purebred Arabian horses. *New Zealand Veterinary Journal*. 62, 15-20.
- Soares O.A.B., Ferraz G.C., Martins C.B., Dias D.P.M, Lacerda-Neto J.C., Queiroz-Neto A., 2014. Comparison of maximal lactate steady state with V₂, V₄, individual anaerobic threshold and lactate minimum speed in horses. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66, 39-46.

CAPÍTULO 4 - Comparação do aparelho portátil i-STAT com o YSI 2300 para determinação da concentração de lactato em American Pit Bulls Terrier submetidos a exercício intenso em esteira

Abreviaturas:

[lactate]: concentração de lactato

[lactate]_p: concentração plasmática de lactato

[lactate]_b: concentração sanguínea de lactato

CG4+: cartucho CG4+ do aparelho portátil i-STAT

$\dot{V}O_2$: Consumo de oxigênio

ANTECEDENTES: Informações sobre a validade do dispositivo portátil i-STAT e do seu cartucho CG4+ para determinação da [lactato] são escassas, principalmente em cães da raça American Pit Bulls submetidos a esforço físico.

Objetivos: Determinar a validade do dispositivo portátil i-STAT para quantificar a [lactato] em cães submetidos a esforço físico.

Animais: Cães da raça American Pit Bulls Terrier (n=8).

Métodos: Amostras de sangue venoso, obtidas durante esforço físico de velocidades crescentes em esteira, foram utilizadas para quantificação da [lactato] por meio de metodologia amperométrica, em aparelho i-STAT, cartuchos CG4+. Como referência, quantificaram-se, pelo método eletroenzimático, as [lactato]_p e [lactato]_b no aparelho de bancada YSI 2300. Para verificação do efeito do exercício sobre as [lactato]_b empregou-se o teste ANOVA para amostras repetidas no tempo seguido de teste de Tukey (P< 0.05). Regressão ordinária dos produtos mínimos, coeficiente de correlação e

gráficos de Bland-Altman foram utilizados para avaliar a validade e os vieses, fixo e proporcional, no i-STAT.

Resultados: Houve aumento da [lactato]_p em decorrência do esforço físico. Observou-se correlação entre o i-STAT e o YSI 2300, tanto no plasma ($r=0.97$) como no sangue ($r=0.88$) embora com grande variabilidade entre os equipamentos ($SD=2.05$ para o plasma e 2.58 para o sangue). O viés fixo foi pequeno (-0.25 mM) sendo detectado somente entre a [lactato]_b YSI 2300 versus i-STAT CG4+. Houve viés proporcional entre os instrumentos, sendo para a [lactato]_p YSI 2300 versus i-STAT CG4+ de 0.89 mM. Na comparação entre a [lactato]_b YSI 2300 versus i-STAT o viés proporcional foi de 1.22 mM.

Conclusão e Importância Clínica: Os valores de lactato obtidos pelo analisador portátil i-STAT tiveram alta correlação com as [lactato]_p e [lactato]_b obtidas pelo método de referência e, viés sistemático reduzido com a [lactato]_b, mas com grande variabilidade em ambas as comparações. O i-STAT pode ser utilizado em avaliações clínicas como os testes de esforço para avaliação de protocolos de treinamento ou da higidez de cães da raça American Pit Bulls Terrier.

Palavras chaves: análise de regressão dos produtos mínimos; YSI 2300; Exercício; validação.

INTRODUÇÃO

Em cães, a quantificação da concentração do lactato plasmático ($[\text{lactato}]_p$) ou sanguíneo ($[\text{lactato}]_b$) é uma ferramenta clínica importante, principalmente para o prognóstico de pacientes críticos que apresentam hipoperfusão tecidual sistêmica¹. Este biomarcador também foi relacionado com alterações clínicas, bioquímicas e hematológicas de cadelas com piometra². Outra aplicação comum da $[\text{lactato}]$ é na avaliação fisiológica da resistência durante a prática de exercício físico, sendo considerada uma importante variável para avaliação do efeito do exercício em cães³, ratos⁴, humanos⁵ e equinos⁶.

Na espécie canina, a maioria dos estudos que quantificou a $[\text{lactato}]$, tanto para avaliação do prognóstico de pacientes críticos como em relação à prática de exercício, utilizaram como metodologia de determinação os analisadores portáteis^{1,3,7} ou analisadores de gases sanguíneos^{8,9}. Numa pesquisa bibliográfica online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) não foi possível encontrar estudos clínicos ou sobre fisiologia do exercício, em cães, que determinaram a $[\text{lactato}]$ por meio do método eletro-enzimático utilizando o bio analisador de bancada YSI 2300 Stat Plus Glucose and Lactate (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio, USA). Entretanto, esta metodologia é costumeiramente empregada em estudos relacionados com a prática de exercício físico em equinos^{6,10} e humanos¹¹.

Alguns estudos com a espécie canina avaliaram a precisão dos lactímetros portáteis. Um estudo comparou o aparelho portátil Accutrend (Bohering, Mannheim, Germany), dispositivo que funciona por meio de tiras, com o aparelho Rapidlab 865, um analisador sanguíneo de gases¹. Outro

estudo¹² comparou o analisador portátil de lactato Lactate-Scout (Senslab, Leipzig, Germany) com uma metodologia de espectrometria (Konelab 30i, Thermo Electron Corp, Vantaa, Finland). Para avaliação da validade dos equipamentos portáteis a maioria dos estudos com cães utilizaram a combinação dos gráficos de Bland-Altman com a Regressão dos quadrados mínimos.

Com relação ao exercício físico, um estudo determinou respostas fisiológicas relacionadas ao exercício agudo (competição) em Labradores Retrievers sendo utilizado para determinação da [lactato] um equipamento portátil I-STAT (Heska Corporation, Fort Collins, CO, USA) por meio de cartuchos CG4+¹³. Outro relatou o efeito do exercício moderado em esteira sobre variáveis fisiológicas em cães destreinados da raça Beagle³ sendo que a [lactato] foi determinada pelo dispositivo portátil Accutrend®.

Em bovinos que apresentaram várias enfermidades¹⁴ determinou-se a validade de 4 equipamentos portáteis para quantificação da [lactato]_b utilizando-se como referência o método colorimétrico-enzimático (ELISA), sendo que o i-STAT apresentou mais precisão. Apesar de vários estudos que foram realizados com cães, sobre a validade de equipamentos portáteis para dosagem da [lactato], até a presente data, nós não conhecemos nenhum relato na literatura sobre um método de referência para quantificação da [lactato] em cães. Desta maneira, nós determinamos a validade do analisador portátil I-STAT, cartucho CG4+, para quantificação da [lactato], utilizando como equipamento de referência o bio analisador YSI 2300, em cães da raça American Pit Bull Terrier submetidos a exercício intenso em esteira.

Quantificaram-se possíveis vieses fixos e/ou proporcionais por meio da regressão ordinária dos produtos mínimos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cães

A amostra foi composta por 8 cães da raça American Pit Bull Terrier (sete machos e três fêmeas) com idade média de 5 ± 2 anos, peso corpóreo médio de 29.1 ± 3 kg, pertencentes ao canil municipal de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Todos os indivíduos foram aclimatados ao ambiente experimental e à atividade na esteira rolante (Gallop[®], Sahinco LTDA, SP - Brasil) pertencente ao Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ-UNESP/Jaboticabal). Durante todo o período experimental os cães permaneceram em seus alojamentos habituais, sem qualquer alteração na rotina alimentar, manejo e sem realização de qualquer tipo de exercício físico.

Adaptação à esteira

Todo o procedimento foi realizado dentro do laboratório, com os cães sempre utilizando peitoral anatômico para facilitar a contenção. A aclimação consistiu em cinco sessões na esteira rolante com duração de 30 minutos cada, durante cinco dias consecutivos. Primeiramente, os cães foram conduzidos sobre a esteira desligada. À medida que se habituaram ao equipamento foram conduzidos sobre a esteira ligada em velocidades baixas ($1,5$ a $2,0 \text{ m s}^{-1}$), sendo que o condutor acompanhou o cão caminhando ao seu

lado e, gradualmente, foram estimulados a andar em velocidades crescentes, com inclinação, orientado por um condutor segurando a guia ao lado da esteira.

Protocolo de exercício

Todos os cães realizaram um exercício com velocidades crescentes na esteira com duração total de 20 minutos. Empregou-se uma etapa de aquecimento durante 4 minutos na velocidade de 1.0 m s^{-1} , que foi incrementada, a intervalos de 4 minutos, para 2.0; 3.0; 4.0 e 5.0 m.s^{-1} . A partir desta última etapa de esforço, procedeu-se a desaceleração, retomando a velocidade para 1.0 m s^{-1} , por 3 minutos, que correspondeu ao período de desaquecimento ativo. Toda a fase de esforço físico, com incremento da velocidade, foi realizada com a esteira a 5% de inclinação.

Amostras sanguíneas

Fixou-se cateter (Insyte™ 16G, Becton Dickinson Industrias Cirúrgicas Ltda, SP - Brasil) no terço médio da veia cefálica esquerda de cada cão. Coletaram-se 3 ml de sangue nos momentos antes do exercício, ao final das etapas 4 e 5 m s^{-1} e após o desaquecimento ativo. Para a quantificação da [lactato] no aparelho YSI 2300 acondicionou-se 2 ml de sangue em tubos de pressão negativa contendo fluoreto de sódio mantidos sob refrigeração. Para o equipamento YSI 2300 o volume aspirado de sangue ou plasma foi de 25µl. Para a análise da [lactato] com o i-STAT, utilizou-se 100 ul de sangue, volume indicado por Dascombe et al., (2007)¹⁵.

Equipamentos

Para a determinação da validade do i-STAT Plus, utilizamos o analisador de bancada para Lactato e Glicose da Yellow Springs 2300 (Yellow Springs, Ohio, USA) como equipamento de referência. Este bio analisador utiliza metodologia enzimática eletroquímica ligada à membrana. A L-lactato-oxidase é imobilizada numa membrana fina colocada sobre uma sonda eletroquímica. A enzima catalisa a conversão de L-lactato em piruvato e peróxido de hidrogênio. Este último é oxidado no ânodo de platina, para medir a concentração de lactato no sangue total ou plasma. Uma nova membrana foi usada para esta análise. Os analisador foi inicialmente calibrado usando soluções de 5, 15 e 30 mmol/L e o controle de qualidade automático foi efetuado a cada 45 minutos utilizando uma solução de 5 mmol/L.

O analisador portátil i-STAT Plus utiliza um sistema de mensuração amperométrica, que é a detecção de íons numa solução com base em corrente elétrica. A enzima lactato oxidase, imobilizada no bio sensor de lactato presente no cartucho (EG4+) converte seletivamente o lactato em piruvato e depois em peróxido de hidrogênio, este, quando libertado é oxidado no eletrodo de platina para produzir a corrente proporcional a concentração de lactato presente na amostra.

Análise estatística

Calcularam-se a média e o desvio padrão (D.P) para todos os momentos analisados. Dados de normalidade foram verificados usando o teste Shapiro-Wilk. O efeito do exercício sobre a [lactate] foi avaliado por análise de variância

simples (One way ANOVA) para amostras repetidas utilizando o software SAS para procedimentos gerais lineares (SAS Institute Inc., 1988, Cary, North Carolina) por teste de Tukey quando necessário, com o objetivo de determinar diferenças significativas para cada amostra no tempo e analisadores.

Dois métodos foram utilizados para verificar a validade da utilização do aparelho I-STAT para a quantificação da [lactato]. Primeiro, para permitir uma comparação dos nossos resultados com outros estudos construíram-se os gráficos de Bland-Altman com nível de confiança de 95%, abordagem amplamente utilizada neste tipo de estudo. Contudo, como os vieses fixo e proporcional não podem ser determinados, de maneira independente, a partir da abordagem de Bland-Altman, empregou-se a regressão ordinária dos produtos mínimos. Assim, a validade e a precisão foram determinadas a partir do coeficiente de correlação (Pearson) em combinação com a presença e grau de vieses. Determinou-se o grau de viés fixo por meio do intervalo de confiança (IC) a 95% do y-interceptor. Se o valor zero estiver incluído no IC do interceptor, não existirá viés fixo. O viés proporcional foi determinado a partir do IC a 95% para a inclinação (“*slope*”) da reta. Neste caso, se o IC incluir o valor de 1.0 não existirá viés proporcional. Importante ressaltar que a AORPM foi utilizada ao invés da regressão dos quadrados mínimos, pois foi considerado a presença de erro em ambos os analisadores de bancada e portátil^{16,17}. Para todos os testes, foi aceito um nível de significância de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Os valores de lactato durante o exercício incremental de velocidade variaram de 0.84 a 6.88 mM, sendo que os valores médios obtidos a partir dos

analisadores, nos momentos de avaliação, podem ser visualizados na Tabela 1. Em relação ao aumento da intensidade de esforço houve aumento ($P = 0.043$), na etapa 5 m s^{-1} , na $[\text{lactato}]_p$ quantificada pelo YSI 2300. Nas outras determinações houve tendência de aumento, na mesma etapa de esforço, sendo $P = 0.066$ e 0.154 para o i-STAT CG4+ e $[\text{lactato}]_b$ determinada pelo YSI 2300, respectivamente.

TABELA 1. Valores de concentração de lactato (média \pm DP, range (alcance)) no YSI 2300 (plasma e sangue) e i-Stat (cartuchos CG4⁺) em 8 American Pit Bulls Terrier submetidos a exercício em esteira rolante.

Métodos	Concentração de Lactato (mM)			
	Momentos das coletas			
	Antes	4 m s^{-1}	5 m s^{-1}	Recuperação
Plasma YSI	2.09 ± 0.94 (0.97-3.6)	3.69 ± 1.95 (0.84-6.31)	$3.81 \pm 1.99^*$ (1.54-6.88)	2.84 ± 1.44 (1.28-5.05)
Sangue YSI	1.64 ± 0.66 (0.89-2.8)	2.74 ± 1.48 (1.12-5.44)	3.14 ± 1.28 (1.81-5.30)	2.00 ± 0.94 (1.04-3.71)
i-STAT	1.79 ± 0.91 (0.87-1.45)	3.13 ± 1.76 (0.93-5.69)	3.44 ± 1.71 (1.8-6.1)	2.30 ± 1.16 (0.85-4.7)

*indica aumento na relação com o exercício.

Todo o conjunto de dados foi comparado pelo gráfico de Bland-Altman, sendo que as diferenças médias entre as $[\text{lactato}]_b$ estão ilustradas pela Figura 1 A e B. A diferença média entre a $[\text{lactato}]_p$ YSI 2300 versus i-ISTAT CG4+ foi de -1.32 mM . Já a diferença média entre a $[\text{lactato}]_b$ YSI 2300 versus i-istat CG4⁺ foi próxima de zero (-0.48 mM), enquanto as diferenças entre os métodos tiveram uma grande variabilidade (DP = 2.05 e 2.58 , respectivamente).

Como revelam as Figuras 1 e 2, apesar da grande variabilidade verificada entre os valores quantificados, as mensurações pareadas foram altamente correlacionadas entre si. A regressão dos produtos mínimos indicou

um viés fixo pequeno (y -intercept = -0.25 mM; 95% CI -0.09 para -0.40) somente na comparação entre $[\text{lactato}]_b$ YSI 2300 versus I-istat CG4+. Não houve viés fixo (95% IC -0.24 para 0.06) para a $[\text{lactato}]_p$ YSI 2300 versus I-istat CG4+. Houve viés proporcional em ambas às comparações, sendo para a $[\text{lactato}]_p$ YSI 2300 versus I-istat CG4+ de 0.89 mM (95% IC 0.88 para 0.94). Na comparação entre a $[\text{lactato}]_b$ YSI 2300 versus I-istat CG4+ o viés proporcional foi de 1.22 mM (95% IC 1.17 para 1.28).

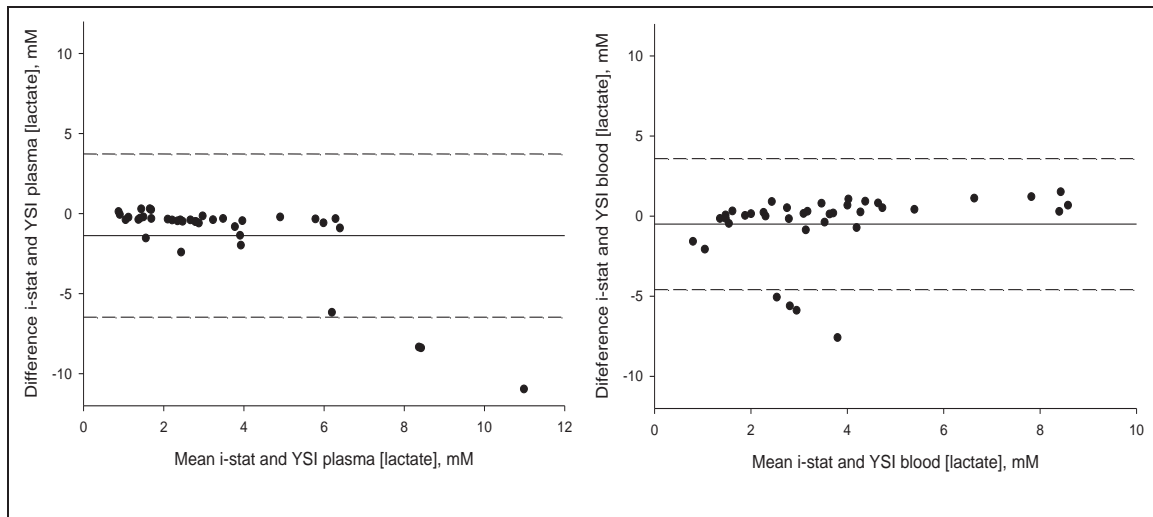


FIGURA 1. Gráficos de Bland-Altman, demonstrando o grau de concordância entre as concentrações de lactato determinados pelo analisador portátil i-Stat e o analisador de bancada YSI. As linhas superior e inferior tracejadas representam os limites superior e inferior respectivamente, e a linha central representa o viés médio.

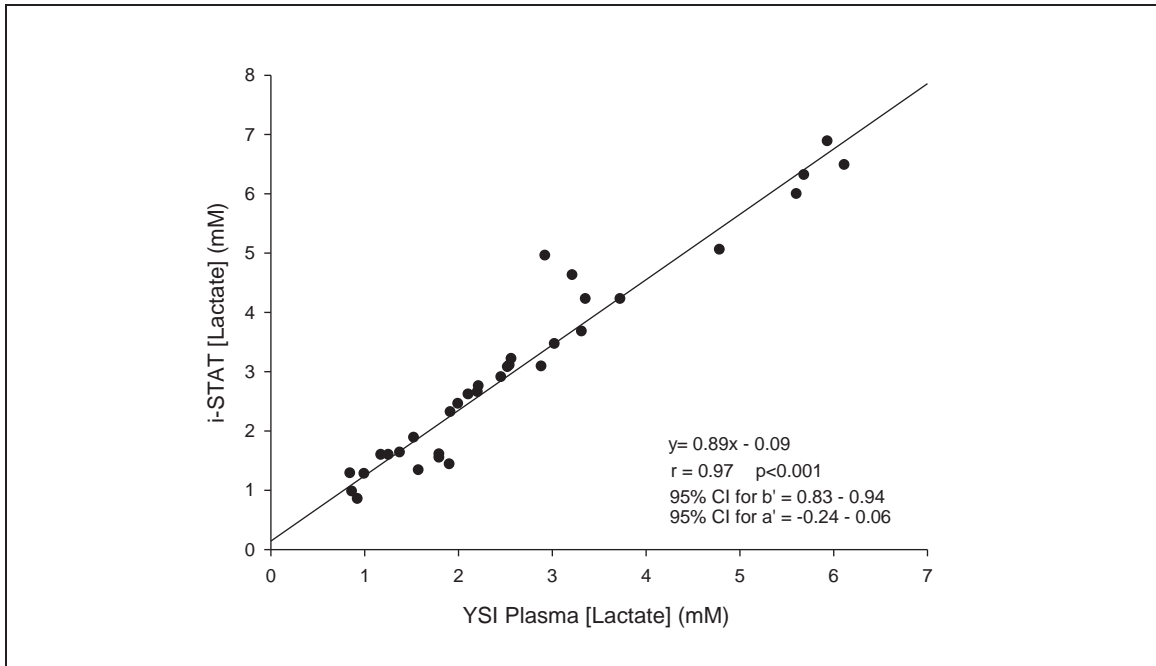


FIGURA 2. Regressão ordinária dos produtos mínimos da relação entre concentrações de lactato plasmático determinadas pelo analisador portátil i-STAT e pelo analisador de bancada YSI.

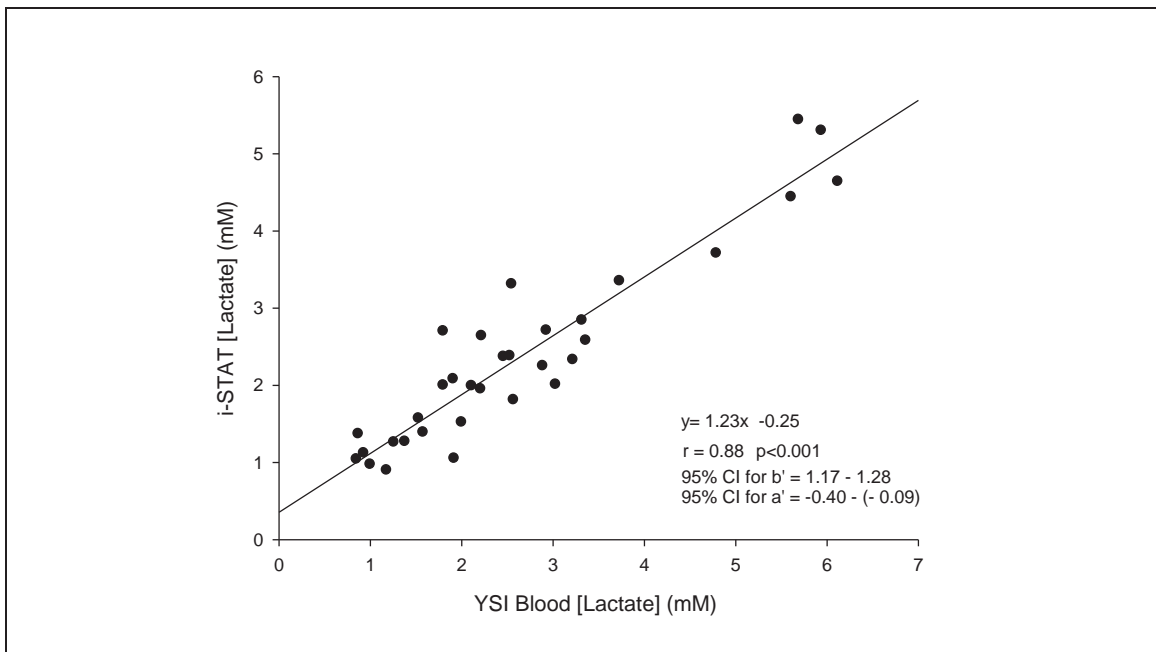


Figura 3. Regressão ordinária dos produtos mínimos da relação entre concentração de lactato sanguíneo determinada pelo analisador portátil i-Stat e pelo analisador de bancada de referência YSI.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo experimental com cães da raça *American Pit Bulls Terrier* que realizaram esforço físico em esteira com mensuração da [lactato]. Cabe informar que todos os cães se adaptaram de modo satisfatório à esteira, sendo que a aceitabilidade a prática de exercício foi muito boa. Os principais achados desta pesquisa foram a existência de uma diferença média, vieses fixo e proporcional, relativamente reduzidos, no que tange o i-STAT, em relação a [lactato]_b obtida pelo YSI 2300. Este achado indicou que o i-STAT CG4⁺ possuiu uma relação linear em relação ao aparelho YSI 2300, na comparação com a [lactato]. Este aspecto é consubstanciado pelo estudo com atletas da espécie humana que comparou a validade de outro aparelho portátil para a quantificação de lactato com o YSI 2300¹⁷.

Nas metodologias utilizadas, os cães que participaram do presente estudo produziram valores máximos de [lactato] de 6.88, 5.30 e 6.1 mM, ([lactato]_p YSI 2300, [lactato]_b YSI 2300 e i-STAT CG4+, respectivamente). Estes resultados são consideravelmente maiores, quando comparados com outros estudos em cães, que utilizaram o exercício como estímulo para produção de lactato^{3,18}. Estes autores avaliaram a [lactato] em cães da raça Beagle ou Labrador Retriever submetidos a um teste de esforço submáximo, com velocidades moderadas e crescentes em esteira. A possível explicação para a não indução de aumentos abruptos obtidos por estes estudos^{3,18} na [lactato]_b, seria explicado por uma capacidade lenta de transporte de lactato pela espécie canina, possivelmente por transportadores de monocarboxilatos, do compartimento muscular para o leito vascular. Contudo, isto deve ser visto com parcimônia, pois é conceito clássico que o incremento da velocidade eleva

a produção muscular de lactato devido à elevação da taxa da glicólise⁶ em decorrência da contração de fibras musculares rápidas como as do tipo IIA e IIX, que já foram identificadas em cães¹⁹. Portanto, nos parece que, durante um teste de esforço, a variável velocidade (intensidade) é uma variável central para o aumento da [lactato]. Comparativamente, na espécie equina, além da intensidade de esforço, a quantidade de produção de lactato em decorrência da atividade física está relacionada também à aptidão racial, idade, sexo²⁰ e grau de condicionamento²¹.

Ainda sobre um possível contraste entre cães e outras espécies, como atletas da espécie humana, em relação ao aumento da [lactato], em decorrência de um teste de esforço, e sua utilização para identificação do limiar de lactato¹⁸, nossa experiência indica que concentrações próximas às atingidas pela maioria dos cães que participaram do presente estudo são suficientes para determinação do limiar de lactato. Outros estudos com cães submetidos a esforço físico também atingiram [lactato] próximas aos nossos resultados^{13,22}.

Outro ineditismo deste estudo na Clínica Veterinária foi a escolha da regressão ordinária de produtos mínimos com o objetivo de caracterizar a relação entre as mensurações produzidas pelo cartucho CG4+ com o nosso analisador de referência, o YSI 2300. Estudos clínicos com pacientes da espécie canina utilizaram a combinação entre os gráficos de Bland-Altman com a regressão dos quadrados mínimos para determinar o grau de concordância entre vários analisadores portáteis^{1,7,23}. A diferença média entre os analisadores, como determinada por meio dos gráficos de Bland-Altman, é obtida pela interação dos vieses fixos e proporcionais. Deste modo, a diferença média entre os métodos não reflete inteiramente a validade ou o viés fixo do

dispositivo. Em algumas situações pode se determinar a presença de viés proporcional ou a redução da linearidade. Além disso, a utilização somente da regressão dos quadrados mínimos para descrever o nível de viés proporcional, por meio da inclinação da reta, pode produzir resultados distorcidos, pois todo o erro é atribuído somente à variável dependente, ou seja, os resultados obtidos pelo analisador portátil. Portanto, com o emprego da regressão ordinária de produtos mínimos, com a finalidade de comparar duas metodologias, evita estas duas limitações, permitindo uma determinação mais precisa de qualquer viés fixo ou proporcional^{16,17,24}.

Uma aplicação clínica importante da [lactato] se dá nas avaliações realizadas por meio de testes de esforço, tanto na esteira como no campo. Podem ocorrer alterações fisiológicas benéficas tanto em cães hígidos como em enfermos. As mudanças mais evidentes são a melhora nas variáveis relacionadas ao lactato e aumento do $\dot{V}O_2$, que podem ocorrer em decorrência da prescrição de protocolos de programas de condicionamento físico guiados pelo limiar de lactato²³. Contudo, erros na mensuração da [lactato] podem produzir, indevidamente, melhoras sub ótimas e redução da eficácia dos protocolos de treinamento¹⁷. O presente estudo indicou viés médio e fixo (-0,48 e -0,25 mM) relativamente reduzido do equipamento i-STAT, em relação aos resultados da [lactato]_b obtidos pelo equipamento de bancada YSI 2300. Alguns relatos da espécie canina, que compararam a [lactato] mensurada a partir de analisadores portáteis e que foram comparados com outros dispositivos de bancada, revelaram valores de lactato com viés médio variando de -0,31 a 0,66 mM^{1,7,23}.

As duas comparações, plasma e sangue total, revelaram viés proporcional reduzido com o i-STAT indicando linearidade satisfatória entre os instrumentos¹⁷. O mesmo não ocorreu com o analisador manual Accutrend¹. Entretanto, esta comparação foi realizada com outro modelo de equipamento de bancada. Outros estudos com a espécie canina são necessários para comparação entre o Accutrend e o YSI 2300, tendo em vista que estudos com espécie equina foram realizados com o objetivo de comparar os dois métodos^{25,26}.

Concluindo, parece viável a utilização do cartucho CG4+ para quantificações da lactatemia relacionadas a prática de exercício em cães, pois teve boa concordância com o equipamento de bancada YSI 2300.

REFERÊNCIAS

1. Stevenson CK, Kidney BA, Duke T, Snead ECR, Jackson ML. Evaluation of the Accutrend for lactate measurement in dogs. *Vet Clin Path* 2007; 36: 261-266.
2. Hagman, R, Reezigt, BJ, Ledin, HB, Karlstam, E.. Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. *Acta Vet Scan* 2009, 51:1-9.
3. Piccione, G, Casella, S, Panzera, M, Giannetto, C, Fazio, F. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained beagle dogs. *Exp Anims* 2012, 61:511-515.
4. Tsumiyama, W, Oki, S, Umei, N, Shimizu, ME, Ono, T, Otsuka, A. Evaluation of the Lactate Threshold during Downhill Running in Rats. *J Phys Ther Sci* 2014; 26: 125-126.
5. Gür, E. A Comparison of Blood Lactate Level and Heart Rate Following a Peak Anaerobic Power Test in Different Exercise Loads. *Euro J Exp Bio* 2012; 2:1854-1861.
6. Soares, OAB, Ferraz, GC, Martins, CB, Dias, DPM, Lacerda-Neto, J C, Queiroz-Neto, A. Comparison of maximal lactate steady state with V2, V4, individual anaerobic threshold and lactate minimum speed in horses. *Arq Bras Med Vet Zoo* 2014, 66:39-46.
7. Thorneloe C, Bedard C, Boysen S. Evaluation of a handheld lactate analyzer in dogs. *Can Vet J* 2007;48:283–288.
8. McMichael, MA, Lees, GE, Hennessey, J, Sanders, M, Boggess, M. Serial plasma lactate concentrations in 68 puppies aged 4 to 80 days. *Vet Emerg Crit Care* 2005; 15:1, 17-21.
9. Stevenson, CK, Kidney, BA, Duke, T, Snead, E C, Mainar-Jaime, RC, Jackson, ML Serial blood lactate concentrations in systemically ill dogs. *Vet Clin Path* 2007; 36:234-239.
10. Ferraz, G. C., Brito, H. C., Berkman, C., Albernaz, R. M., Araújo, R. A., Silva, M. H. et al., Low dose of dichloroacetate infusion reduces blood lactate after submaximal exercise in horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2013; 33:57-60.
11. Simões, HG, Asano, RY, Sales, MM, Browne, RAV, Arsa G, et al. Type 2 Diabetes Elicits Lower Nitric Oxide, Bradykinin Concentration and Kallikrein Activity Together with Higher DesArg9-BK and Reduced Post-Exercise Hypotension Compared to Non-Diabetic Condition. *PloS one* 2013; 8: e80348.
12. Ferasin L, Dodkin SJ, Amodio A, Murray JK, Papasouliotis K. Evaluation of portable lactate analyser (Lactate Scout) in dogs. *Vet Clin Path* 2007; 36: 36-39.
13. Steiss, J, Ahmad, HA, Cooper, P, Ledford, C. Physiologic responses in healthy Labrador Retrievers during field trial training and competition. *J Vet Intern Med* 2004;18:147-151.
14. Karapinar, T, Kaynar, O, Hayirli, A, Kom, M.. Evaluation of 4 Point-of-Care Units for the Determination of Blood I-Lactate Concentration in Cattle. *J Vet Intern Med* 2013; 27:1596-1603.
15. Dascombe, BJ, Reaburn, PRJ, Sirotic, AC, Coutts, AJ. The reliability of the i-STAT clinical portable analyser. *J Sci Med Sport* 2007;10:135-140.

16. Ludbrook J. Statistical techniques for comparing measurers and methods of measurement: a critical review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:527–36.
17. Hart, S, Drevets, K, Alford, M, Salacinski, A, Hunt, BE. A method-comparison study regarding the validity and reliability of the Lactate Plus analyzer. *BMJ open* 2013, 3:1-7.
18. Ferasin, L., & Marcora, S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B* 2009; 179: 839-845.
19. D'Angelis, FH, Silva, MA, Albernaz, R M, Ferraz, GC, Boleli, IC, Lacerda-Neto, JC, Queiroz-Neto, A. Preliminary Study on Age-and Sex-Dependent Alterations in the Composition of Skeletal Muscle Fibers of Brasileiro de Hipismo Horses. *J Equine Vet Sci* 2008;28:22-27.
20. Ferraz, GC, D Angelis, FHF, Teixeira-Neto, AR, Freitas, EVV, Lacerda-Neto, J C, Queiroz-Neto, A.. Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test. *Arq Bras Med Vet Zoo* 2008;60:256-259.
21. Rovira S, Muñoz A, Benito M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet Clin Path* 2007;36:30-36.
22. Ludbrook J. Comparing methods of measurements. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997;24:193–203.
23. Lindner A. Measurement of plasma lactate concentration with Accusport. *Equine Vet J*. 1996;28:403–405.
24. Evans DL, Golland LC. Accuracy of Accusport for measurement of lactate concentrations in equine blood and plasma. *Equine Vet J* 1996;28:398-402.