

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATIVIDADE PLASMÁTICA DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA EM EQUINOS PURO SANGUE ÁRABE
EM TREINAMENTO E DURANTE PROVA DE
RESISTÊNCIA**

Ana Maria Guerreiro Braga da Silva

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATIVIDADE PLASMÁTICA DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA EM EQUINOS PURO SANGUE ÁRABE
EM TREINAMENTO E DURANTE PROVA DE
RESISTÊNCIA**

Ana Maria Guerreiro Braga da Silva

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2012**

Silva, Ana Maria Guerreiro Braga da
S586a Atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina em equinos puro sangue árabe em treinamento e durante prova de resistência / Ana Maria Guerreiro Braga da Silva. – – Jaboticabal, 2012
xii, 57 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientadora: José Corrêa de Lacerda Neto
Banca examinadora: Tanja Maria Hess, Aureo Evangelista Santana
Bibliografia

1. Enzima conversora de angiotensina. 2. Treinamento. 3. Equino. 4. Enduro. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.766.1:636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA MARIA GUERREIRO BRAGA DA SILVA – Nascida na cidade do Rio de Janeiro, no dia dezesseis de outubro de mil novecentos e oitenta e dois, filha de Maria Edéa Guerreiro Giovanini Silva e Leônidas Solon Braga da Silva. Médica veterinária formada pela Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense em Julho de 2007. Em Fevereiro de 2008, ingressou no curso de Pós-Graduação da Universidade de Brasília, na modalidade Especialização em Medicina Veterinária sob a orientação da Prof. Dra. Roberta Ferro de Godoy, a qual concluiu e obteve o título de especialista em Clínica e Cirurgia de Grandes Animais em Janeiro de 2010. Em Agosto de 2010, após concurso de seleção, ingressou no curso de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto.

EPÍGRAFE

“É exatamente disso que a vida é feita, de MOMENTOS. Momentos que TEMOS que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família. Minha mãe, Maria Edea Guerreiro Giovanini Silva, meu pai, Leônidas Solon Braga da Silva, ao meu irmão, Thomáz Marciano Guerreiro Braga da Silva e meu cachorro, Bruno, pois sem o apoio deles não estaria onde estou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos animais, principalmente aos equídeos, motivo pelo qual me formei Médica Veterinária e, hoje me dedico a salvar suas vidas. Seres lindos, puros e majestosos que me fascinam todos os dias no trabalho e que me deram a chance de aprender e praticar meus conhecimentos.

A Deus por ter me guiado pelos melhores caminhos ao longo desses anos, dando-me mais segurança e certeza das minhas escolhas. Agradeço muito pelos momentos em que apenas um par de pegadas esteve presente durante a minha caminhada.

À minha Mammy, por todo carinho, amor, paciência e atenção dedicados a mim e por todo incentivo que me deu durante toda a minha vida, em especial nos últimos anos. Mãe, muito obrigada por me mostrar que tudo na vida é possível e que nunca devemos desistir dos nossos sonhos, que embora os caminhos sejam tortos e cheios de desafios, precisamos sempre olhar para frente e lutar por tudo que acreditamos, com humildade e muita garra. Certamente você é a pessoa mais batalhadora e amiga que conheço. Pessoa que podemos contar e muito companheira e sempre disposta a dar tudo de si por todos que ama. Agradeço a Deus por ter você em minha vida e ter o privilégio de dizer que sou sua filha. Espero corresponder as suas expectativas e que tenhas orgulho de mim. Mama, eu te amo!!!!!!!!!!

Ao meu pai, pela paciência, amor, carinho, atenção, paparicos e incentivos durante todo esse tempo. Embora nestes últimos quatro anos a distância tenha nos castigado bastante e a saudade às vezes parece não ter fim, sei que nos momentos mais difíceis posso contar com você, mesmo que seja para te ligar e chorar muito, ouvindo você dizer assim “Calma minha filha, já está acabando!”. Pai muito obrigado por tudo, eu te amo!!!!!!!!!!

Ao meu irmão, minha Praguinha do coração!!!!!! Thomáz eu não tenho palavras para descrever o quanto me sinto feliz em tê-lo como irmão. Embora nem sempre concordamos um com o outro, sei que no fundo ambos querem o melhor para o outro. Nossa vida teve muitos altos e baixos, mas quero que saiba que mesmo sendo clichê, eu iria até o fim do mundo por você meu irmão. Eu te amo muito, muito mesmo!!!!!!

À toda a minha família por todo o carinho, amor dedicado e por todo o apoio proporcionado aos meus estudos, dando-me condições de aprender cada vez mais. Família amo muito todos vocês!!!!!!!!!!

À família Abreu Fialho por sempre acreditar em mim e se tornar uma segunda família. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Aos queridos ausentes, em especial para o meu Vovô Ortigão, pelo amor que me deram em vida e por toda a força que tenho certeza que ainda me proporcionam.

À tia Mariselva e tia Neuza que certamente compartilham dessa minha vitória. Obrigada pelo apoio incondicional e todo carinho e amor dedicados a mim.

Ao meu cachorro, Bruno, pelo companheirismo e por ser tão carinhoso. Sou muito feliz por ter te adotado e hoje não imagino minha vida sem você.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, por ter me aceitado como orientada de mestrado e proporcionado experiências ímpares durante este período, no qual muito pude aprender. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e o trabalho em equipe.

À Dra. Tanja Maria Hess, minha orientadora no primeiro estágio que fiz com eqüinos no Middleburgh Agriculture Research and Extension Center, pelo apoio e oportunidade que me deu antes e durante a faculdade, posteriormente na Residência e agora no Mestrado. Médica veterinária que me incentivou muito e me

deu a oportunidade de participar de muitos experimentos e abrir muitas portas durante minha vida acadêmica. Embora muitos digam que é uma pessoa difícil de lidar e muito brava, conheço uma pessoa muito amiga que está sempre disposta a ajudar todos que necessitam, dá broncas quando é preciso, incentiva e ensina para nos tornarmos melhores profissionais. Agradeço de coração tudo que ela fez (e ainda faz) por mim e por todo conhecimento adquirido com ela. Tanja muito obrigada por tudo, especialmente pela paciência! Tenho uma admiração muito grande por você.

À Dra Maria Fernanda de Mello Costa por todo o conhecimento compartilhado e pelo incentivo. Admiro muito essa médica veterinária pela sua garra e vontade de vencer. Muito obrigada por me ensinar que precisamos sempre estar estudando muito para melhor atender nossos pacientes. Todas as nossas conversas durante os páreos do JCB foram muito importantes pra mim. Agradeço muito pela conversa que tivemos no WEVA 2009 no Guarujá, pois me auxiliou bastante ao escrever o projeto de mestrado. Muito obrigada de coração!

À Dra. Christiane Becari, por todo apoio, desde o primeiro contato e principalmente durante o experimento, no laboratório, em virtude do avançado de sua gestação. Sua participação foi ímpar na realização da dosagem da atividade da ECA, parte fundamental do meu projeto. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, incentivo e por todos os momentos que me fez parar para pensar na metodologia a ser utilizada com o objetivo de elaborar o protocolo a ser realizado. Muito obrigada!

Ao meu eterno R2, hoje professor da UNB, Fábio Ximenes que tanto contribuiu para o meu aprendizado durante a residência e atualmente, por telefone, sempre que preciso de um conselho ou uma opinião sobre um caso clínico, me ensinando e compartilhando seu conhecimento. Muito obrigada meu amigo!!!!

A todos os médicos veterinários que me deram à oportunidade de, ao longo desses dois anos, aprender e praticar o meu conhecimento e que se tornaram além de colegas de profissão, amigos para a vida toda. Obrigada por tudo que me ensinaram, tenho certeza que aprendi muito com vocês.

Aos professores do departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, os quais sempre me atenderam com enorme carinho, respondendo e tirando todas as minhas dúvidas, sendo sempre muito receptivos. Muito obrigada!

À equipe do professor Juca, composta por Cristina Tovar, Lina Gomide, Álvaro Paiva, Deborah Dias, Kamila Gravena, André Desjardins, Nara Bernardi, Vinícius Canello, por todo apoio na realização deste projeto. Sem a colaboração de todos vocês este projeto não poderia ser realizado. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia – UNESP – Câmpus de Jaboticabal – especialmente para Renata Nagib, Cláudia e Paulo Silva pelo apoio e ensinamentos no laboratório.

Aos enfermeiros e estagiários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP – Câmpus de Jaboticabal – pelos ensinamentos e experiências práticas que tanto me ensinaram.

À banca de qualificação do mestrado pelas críticas construtivas e observações realizadas, fazendo que o corpo desse trabalho tivesse maior coesão e ressaltasse os resultados obtidos, contribuindo de uma forma ímpar. Muito obrigada!

Às minhas queridas amigas da Cúpula: Bruna Palmeiras, Carine Durão e Rossana Ribeiro. Agradeço por todo apoio, carinho, atenção e amizade. Amo muito todas vocês!

Às minhas queridas amigas Daniela Queiroz (Tekila), Cínthia Lhamas, Luisa Gouvêa, Tatiane Poló, Kalina Simplício, Letícia Anaí, Andressa Nogueira, Cassia Coelho, Maristela Lopes e Sílvia Napoleão, por todo apoio e ajuda durante a minha vida em Jaboticabal. Por todos os ensinamentos, dedicação e carinho. Obrigado por terem sido pessoas tão amigas e dispostas a me ajudar sempre. Minha vida aqui no interior não teria sido tão legal como foi sem vocês. Muito obrigada amores!!!!!!

Aos meus amigos do Rio de Janeiro, em especial para Ana Júlia Mendes e Aretha Campos, por todo o amor, amizade e por toda a força que me proporcionaram para que eu continuasse seguindo sempre em frente: com certeza o apoio de todos vocês, mesmo a distância, fez toda diferença.

Aos queridos amigos conquistados aqui em Jaboticabal durante o período de mestrado que me deram tanto apoio quando precisei. Muito obrigada!

E por último, mas não menos importante, agradeço o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida a mim e pelo auxílio financeiro de todo o projeto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
I.INTRODUÇÃO	1
II.REVISÃO DE LITERATURA	3
III.MATERIAL E MÉTODOS	18
III.1.Animais	18
III.2.Teste de esforço físico progressivo (TEP)	19
III.3.Protocolo de treinamento (PT)	21
III.4.Teste de resistência (TR)	22
III.5.Exame físico (EF)	22
III.6.Colheita de amostras de sangue	23
III.7.Análises laboratoriais	24
III.7.1.Hemograma	24
III.7.2.Lactato.....	25
III.7.3.Enzima conversora de angiotensina	26

III.8.Análise estatística	28
IV.RESULTADOS.....	29
IV.1.Teste de esforço progressivo (TEP).....	30
IV.2.Treinamento.....	31
IV.3.Teste de resistência (TR).....	32
IV.3.1.Exame físico (EF).....	33
IV.3.2.Hemograma.....	35
IV.3.3.Lactato.....	36
IV.3.4.Enzima conversora de angiotensina.....	37
V.DISSCUSSÃO.....	40
VI. CONCLUSÕES.....	47
VII.REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG I = angiotensina I

ANG II = angiotensina II

ATP = adenosina trifosfato

Bpm = batimentos por minuto

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

DC = débito cardíaco

ECA = enzima conversora de angiotensina

EDTA = ácido etilenodiaminatetraacético

EPM = erro padrão da média

EF = exame físico

FC = frequência cardíaca

FEI = Fédération Equestre Internationale

FR = frequência respiratória

g = gauge

h = hora

Hb = hemoglobina total

Ht = hematócrito

Km = quilômetro

m = metros

mpm = movimentos por minutos

m/s = metros por segundo

PSA = Puro Sangue Árabe

PT = protocolo de treinamento

s = segundo

SRA = sistema renina angiotensina

T = momentos do teste de esforço progressivo

TEP = teste de esforço progressivo

TR = teste de resistência

UNESP = Universidade Estadual Paulista

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Protocolo utilizado em ambos os testes de esforço progressivo a campo de equinos. Águas da Prata, 2011.....	20
Tabela 2. Resumo dos momentos de colheita de sangue de equinos para diferentes análises laboratoriais. Jaboticabal, 2011.....	27
Tabela 3. Valores médios e erro padrão da média ($X \pm EPM$) do hemograma de onze equinos realizados antes do início do experimento. Jaboticabal.....	29
Tabela 4. Valores médios e erro padrão da média ($X \pm EPM$) da concentração de lactato obtidos para cada uma das velocidades crescentes dos testes de esforço progressivo realizado a campo. Águas da Prata, 2011.....	30
Tabela 5. Valores médios $X \pm EPM$ da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos antes do início do treinamento, após quatro e doze semanas de treinamento. Jaboticabal, 2011.....	32
Tabela 6. Valores médios $X \pm EPM$ das variáveis de equinos obtidas em repouso e nos exames físicos efetuados durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.....	34
Tabela 7. Valores médios $X \pm EPM$ dos hemogramas realizados em antes e durante as paradas obrigatórias de equinos durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.....	35
Tabela 8. Valores médios $X \pm EPM$ das concentrações de lactato de equinos realizados em repouso e nas paradas obrigatórias efetuadas durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.....	36

Tabela 9. Valores médios $X \pm EPM$ da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos antes do início e nas paradas obrigatórias efetuadas durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.....	38
---	----

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Ilustração dos principais substratos necessários ao metabolismo energético para manutenção celular. HINCHCLIF & GEOR, 2008.....	4
Figura 2. Esquema resumido do metabolismo energético. EVANS, 2008.....	7
Figura 3. Esquema resumido da captação do oxigênio e eliminação do dióxido de carbono. RIVEIRO & PIERCY, 2008.....	10
Figura 4. A e B - Realização do teste de esforço progressivo a campo. Águas da Prata, 2011.....	20
Figura 5. A - Colocação do frequencímetro para realização do primeiro TEP. B – Cateter utilizado para as colheitas de sangue. Águas da Prata, 2011.....	21
Figura 6. A – Colocação de equipamento de posicionamento global via satélite para realização do TEP realizado a campo. B – Em detalhe o equipamento fixado no braço do cavaleiro. Águas da Prata, 2011.....	21
Figura 7. Testes de esforço progressivo (TEP) realizado a campo, em pista de areia, no qual registrou se os valores médios $\pm$ EPM da concentração de lactato para cada uma das velocidades crescentes. Jaboticabal, 2011. * Representa diferença entre os mesmos momentos do primeiro e segundo TEP.....	31
Figura 8. Atividade da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidas antes e durante o período de treinamento. Jaboticabal, 2011.....	32
Figura 9. Representação gráfica das médias e erro padrão da média de proteína total de equinos obtidos em antes e nas paradas obrigatórias efetuadas durante o teste de resistência Jaboticabal, 2011.....	36

- Figura 10.** Representação gráfica das médias e erro padrão da média da concentração de lactato de equinos obtidos em antes e nas paradas obrigatórias efetuadas durante o teste de resistência Jaboticabal, 2011.....37
- Figura 11.** Médias e erro padrão da média da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos em antes e nas paradas obrigatórias durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011. * Valores menores que B4 ** Valores maiores que B4.....38
- Figura 12.** Médias e erro padrão da média da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos em antes e após o término do teste de resistência. Jaboticabal, 2011. * Valores maiores que B4.....39

ATIVIDADE PLASMÁTICA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA EM EQUINOS PURO SANGUE ÁRABE EM TREINAMENTO E DURANTE PROVA DE RESISTÊNCIA

RESUMO – Estudos com cavalos de enduro submetidos a exercícios de resistência enfocam o desempenho individual. Na medicina esportiva humana, muitos estudos foram realizados mensurando a concentração da enzima conversora de angiotensina (ECA) e relacionando-a com corredores de maratona de elite, especialmente aqueles com menores concentrações plasmáticas desta enzima. No entanto, como na medicina veterinária poucos estudos foram realizados neste campo, decidiu-se avaliar a atividade plasmática da ECA em equinos durante treinamento e, posteriormente, antes e durante prova de resistência. Foram utilizados 11 equinos adultos da raça Árabe, hípidos, mantidos sem treinamento durante 16 semanas. Foram realizados dois testes de esforço físico progressivo (TEP) para determinar o condicionamento físico dos animais, sendo um antes e outro ao final do treinamento, que durou 12 semanas. Uma semana após o segundo TEP, foi realizado um teste de resistência (TR) de 80 km. Antes, durante e após a realização do TR, amostras de sangue foram colhidas para mensurar a atividade plasmática da ECA. Os dados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância e, quando verificadas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) em relação a variável tempo, os dados foram analisados pelo teste de Fisher. Houve diminuição gradual da atividade da ECA ao longo do período de treinamento. Os valores médios obtidos antes e durante o TR variaram e os

valores encontrados antes do TR foram menores que os obtidos vinte e quatro horas após o término do mesmo ($p=0,003$). Os menores valores encontrados neste experimento foram após os equinos completarem 50 km do teste, o que não ocorreu durante o TR e é sugestivo de estar relacionado à desidratação. A diminuição da atividade plasmática da ECA com o treinamento se revelou ferramenta em potencial para avaliação dos efeitos de treinamento.

Palavras-Chave: Enzima conversora de angiotensina, treinamento, equino, enduro

PLASMA ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME ACTIVITY FROM ARABIAN HORSES UNDERGOING TRAINING AND DURING ENDURANCE EXERCISE

SUMMARY - Studies about horses submitted to long distance exercise have focused on individual performance and reasons for failure. In human sports medicine, many studies have measured plasma concentration of angiotensin converting enzyme (ACE) and correlated it to the performance of elite marathon runners, which present lower plasma concentration of this enzyme. This study evaluated plasma ACE activity during training and an endurance ride in a group of endurance horses. Eleven healthy adult Arabian horses were submitted to sixteen weeks of rest before the initiation of the training period. Before start and after the training period, a progressive exercise test (PET) was carried out in order to determine the horse's fitness and to plan the training protocol. Horses were trained for twelve weeks, and at the end of the training period, one week after the second PET, horses were submitted to an 80 km endurance exercise test (ET). Before, during and after the ET, blood samples were collected to determine ACE's plasma activity. Effects of sampling times were evaluated by ANOVA and significant differences analyzed by the Fisher's test. ACE's plasma activity gradually diminished during the training period. The mean values of ACE's activity obtained before and during the ET varied and values before the ET were lower than twenty four hours after the end ($p=0,003$). Lowest ACE values were found after 50 km of ET, and were simultaneous to the highest total protein. It indicates that the lowest ACE during endurance exercise may be related to dehydration, possibly indicating

a body adjustment. Plasma ECA activity of horses decreased with training and may be used as a potential tool to measure training effects.

KEYWORDS: Angiotensin converting enzyme, training, equine, endurance

I. INTRODUÇÃO

Os equinos estão envolvidos em várias modalidades esportivas, algumas muito diferentes entre si como o enduro equestre e as corridas de turfe. Tais diferenças refletem a aptidão individual de cada raça, fazendo a escolha do animal sejam inerente as características desejáveis à modalidade esportiva a ser praticada. Em geral, muitas dessas características desejáveis são transmitidas de pais para filhos através da genética e moldadas de acordo com o ambiente e tipo de treinamento instituído (HINCHCLIFF & GEOR, 2008).

O treinamento deve ser adequado ao tipo de exercício realizado nas competições e muitos estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de um treinamento eficiente para a modalidade a ser praticada. Ademais, o treinamento também evita o desenvolvimento de injúrias debilitantes aos animais. Embora muitos avanços tenham sido alcançados no campo da fisiologia do exercício, este tema é ainda extremamente controverso, pois embora tenha sido produzido muito conhecimento nesta área, sua aplicabilidade é comprometida devido à pequena aceitabilidade por parte de treinadores de cavalos (EVANS, 2000).

A avaliação do lactato sanguíneo é uma das variáveis que pode ser avaliada em testes de exercícios padronizados, os quais são comumente realizados com o objetivo de verificar a eficiência do treinamento adotado. Outra ferramenta importante para este objetivo é a avaliação da frequência cardíaca durante e após o exercício (CAMPBELL, 2011).

Existe muito interesse por parte dos pesquisadores em identificar outras ferramentas que possam ser associadas com o desempenho físico em equinos. Muitos genes em humanos foram associados com habilidade atlética superior e dentre eles se destaca o gene de inserção (I) e deleção (D) da enzima conversora de angiotensina (ECA) (GAYAGAY et al., 1998; MONTGOMERY et al., 1999; TAYLOR et al., 1999;

ÁLVAREZ et al., 2000; NAGASHIMA et al, 2000; CERIT et al., 2006; THOMPSON et al., 2006).

Estudos em humanos apontam que indivíduos com menores concentrações plasmáticas desta enzima possuem melhor desempenho em exercícios relacionados com resistência física, como por exemplo, as maratonas. Este achado tem gerado o interesse de pesquisadores de equinos para estudar a existência desta relação na espécie (MYERSON et al., 1999; CAM et al., 2006; BAE et al., 2007).

II. REVISÃO DE LITERATURA

O cavalo é um atleta por excelência. A necessidade de fuga de predadores em territórios adversos fez com que desenvolvessem habilidades relacionadas à velocidade para sobreviver. Estas características foram aprimoradas e moldadas conforme a domesticação dos equinos para a função à qual se destinavam. O homem tem realizado seleção de diversos equinos de elite, em virtude de suas aptidões físicas e aptidão genética, para a modalidade esportiva desejada, fazendo com que o cruzamento entre os indivíduos mais aptos leve à otimização das características desejáveis em cada modalidade (HINCHCLIFF & GEOR, 2008).

Com exceção da função pulmonar, os equinos passam por diversas adaptações fisiológicas em resposta ao treinamento físico. Vários fatores contribuem para uma habilidade atlética superior, dentre os quais a alta capacidade aeróbica máxima, a elevada capacidade de armazenamento intramuscular de substratos energéticos (como glicogênio), o maior número de mitocôndrias nas células musculares, a capacidade de contração esplênica durante o exercício que resulta no aumento da capacidade de carregamento de oxigênio aos tecidos, e a eficiência do andamento, assim como o destacado desenvolvimento da capacidade termorregulatória (HINCHCLIFF & GEOR, 2008).

Todas as células do organismo precisam de energia para manter suas funções básicas e para a obtenção de energia várias moléculas e substâncias como o oxigênio, glicose, aminoácidos, gorduras e íons são necessários. O metabolismo celular abrange uma série de reações químicas envolvendo mudanças orgânicas, as quais são coordenadas para manter a célula viva. A manutenção da célula necessita de adenosina trifosfato (ATP), assim como as células musculares em exercício intenso, sendo a principal diferença a demanda energética necessária para manter o exercício, que para manter o exercício precisa gerar muito ATP (GUYTON & HALL, 2002).

Os principais substratos utilizados para a obtenção de ATP são os carboidratos na forma de glicose e o glicogênio (muscular e hepático) e a gordura na forma de ácidos graxos livres (Figura 1)(MARLIN & NANKERVIS, 2002).

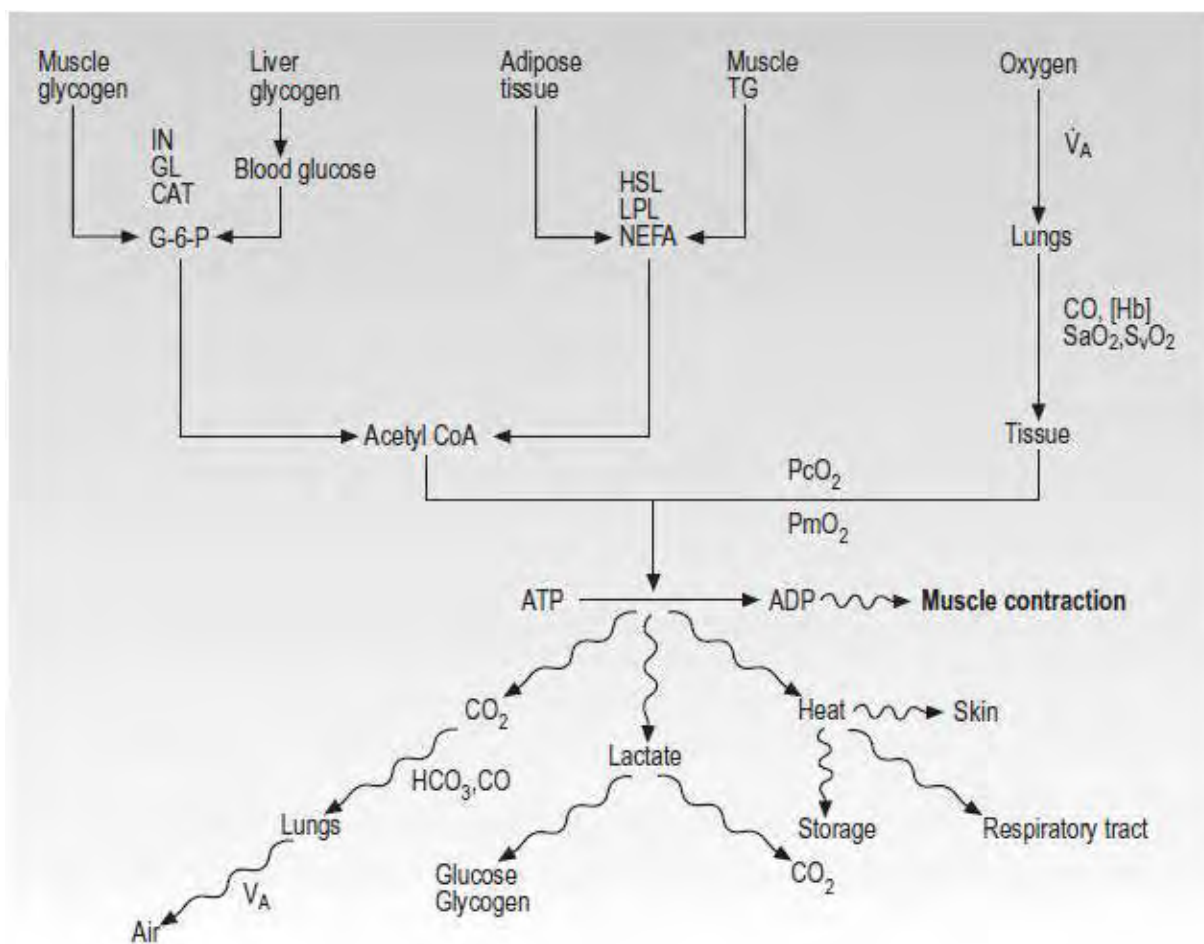


Figura 1. Ilustração dos principais substratos necessários ao metabolismo energético para manutenção celular. HINCHCLIF & GEOR, 2008.

Segundo LEHNINGER et al (1995), a glicólise compõe a via central metabólica, existente em todas as células, para a obtenção de ATP. Ela ocorre no citoplasma da célula e utiliza a glicose como substrato inicial. Não necessita de oxigênio e cerca de dez reações sequenciais ocorrem, sendo cada uma catalisada por uma enzima

diferente, até a obtenção de piruvato e produção de quatro moléculas de ATP. Como o processo todo também consome duas moléculas de ATP, o ganho efetivo de energia na glicólise é apenas de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose utilizada (Figura 2).

O piruvato formado no citoplasma pode permanecer no citoplasma e por ação da enzima lactato desidrogenase ser levado a lactato, anaerobicamente, ou pode entrar na mitocôndria e pela ação da lipoamida desidrogenase gerar duas moléculas de Acetil coenzima A (Acetil-CoA) e entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) (HINCHCLIFF & GEOR, 2008).

No ciclo de Krebs (Figura 2), o citrato formado será levado a oxaloacetato por outras oito reações, também catalisadas por enzimas. A próxima fase é a respiração celular, nesta via metabólica, há necessidade de oxigênio, pois os produtos gerados como o NADH e o FADH₂ passam por reações de oxirredução na cadeia de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa), na membrana mitocondrial para serem regenerados (NAD⁺ e FAD⁺), e os elétrons liberados por eles são carregados por diversos transportadores de elétrons, os quais recebem e doam elétrons gerando assim energia para a síntese de ATP (LEHNINGER et al., 1995).

Ao final do ciclo de Krebs, haverá a formação de 36 moléculas de ATP para serem utilizadas pela célula muscular em exercício. Nesta via metabólica, existem três reações que são catalisadas por enzimas aloestéricas e, portanto, são irreversíveis. A Figura 2 demonstra resumidamente a integração das principais vias metabólicas das células musculares, relacionando os metabolismos aeróbico e anaeróbico e os principais substratos utilizados por células musculares de equinos na obtenção de ATP. No início do exercício, a célula muscular começa a produzir energia a partir da glicose pela glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Quando há aumento no consumo de oxigênio e o aporte de oxigênio na célula não é o suficiente para suprir a demanda, após a glicólise, o piruvato formado recebe os elétrons do NADH formando o ácido

lático e reestabelecendo o NAD^+ (que deveria ser reestabelecido pela fosforilação oxidativa) (KANEKO, 2008).

Os triglicerídeos compõem a forma de armazenamento de gordura no organismo e cada triglicerídio é composto por uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos. O processo de mobilização dos triglicerídeos para obtenção de energia, que se inicia com a ação de lipases, é chamado de lipólise. Após a ação das lipases, há formação de ácidos graxos livres que podem cair na circulação e ir para as células em exercício. Ao chegar ao citoplasma, com a ação da enzima CoA, ocorre a quebra da cadeia de ácido graxo, diminuindo-o em dois carbonos, e gerando um NADH e o FADH_2 , que passaram pela fosforilação oxidativa gerando ATP (LEHNINGER et al., 1995; MARLIN & NANKERVIS, 2002; KANEKO, 2008).

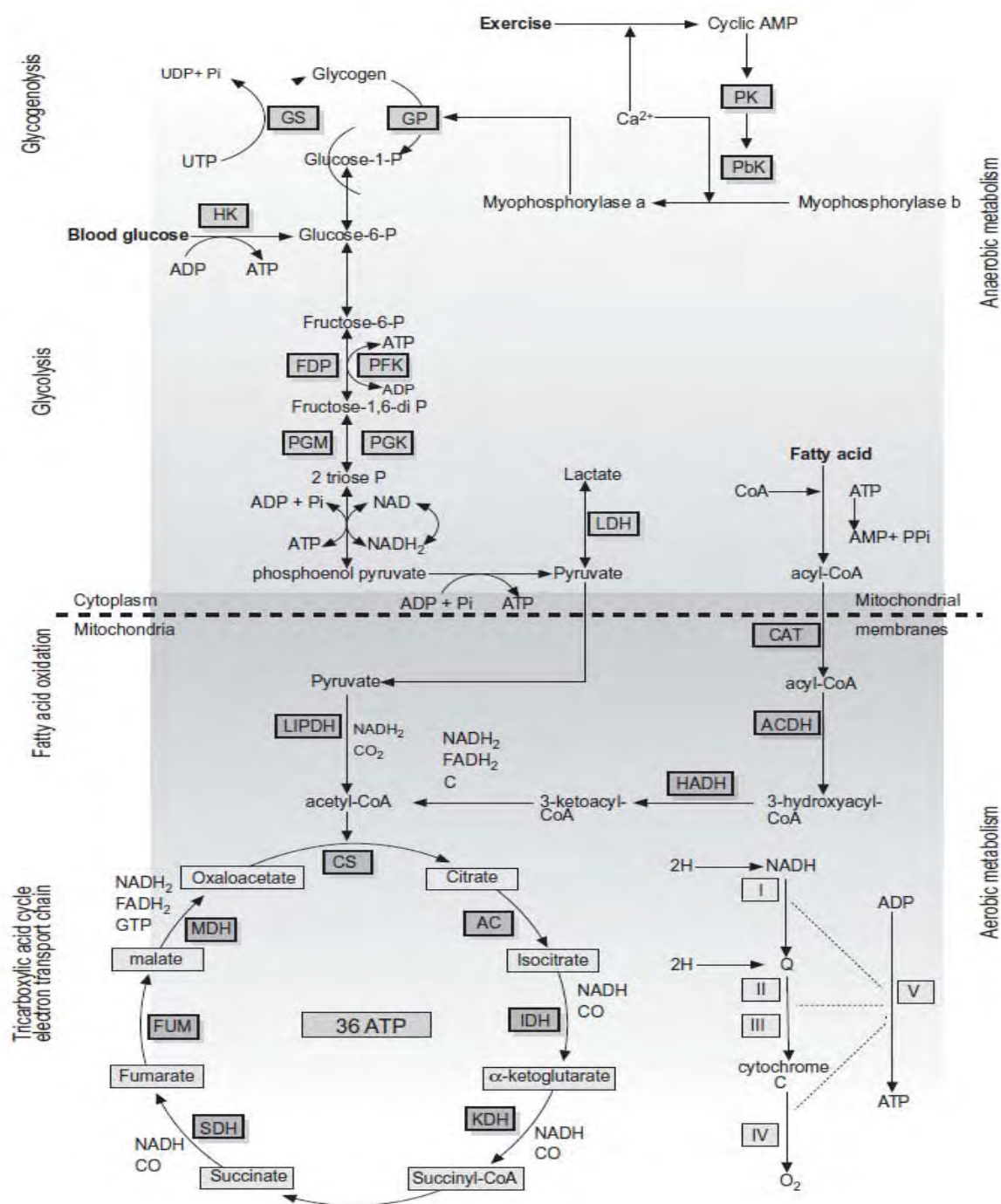


Figura 2. Esquema resumido do metabolismo energético. EVANS, 2008.

O treinamento se revela como parte importante no desenvolvimento de atividades esportivas. Estabelecer um protocolo de treinamento é necessário para que os objetivos almejados sejam atingidos de forma eficiente e segura. Para tanto, o cavalo precisa, regularmente, ser exercitado no mesmo tipo de atividade e intensidade que irá desenvolver durante a competição, a fim de promover adaptações fisiológicas desejáveis, evitar injúrias e aprimorar comportamento adequado no desenvolvimento do exercício durante a competição (EVANS, 2000).

As células musculares necessitam de energia e essa demanda energética varia de acordo com a intensidade e duração do exercício. A energia pode ser gerada de diversas maneiras, como explanado anteriormente, por meio de diferentes vias metabólicas dependendo do substrato disponível para uso e da urgência da demanda. Em geral o organismo, utiliza a glicose para a obtenção de energia e esta, através da glicólise, é levada a piruvato que pode ser oxidado na mitocôndria pelo Ciclo de Krebs (metabolismo aeróbico) ou, passar por fermentação láctica, na ausência de oxigênio, onde o piruvato é levado a lactato (metabolismo anaeróbico) com a finalidade de obter ATP. Das duas maneiras haverá produção de ATP, porém a primeira que envolve o Ciclo de Krebs é mais eficiente e gera mais ATP que a outra. Sendo assim, a demanda de oxigênio para produção de ATP e a eficiência em captar, transportar e difundir o oxigênio para as células musculares durante o exercício constitui a capacidade aeróbica do indivíduo e é crucial para a manutenção energética da célula e consequentemente do exercício (HINCHCLIFF & GEOR, 2008; KANEKO, 2008).

A atividade física regular coordena os padrões estrutural e funcional das adaptações dos diversos sistemas, com ênfase aos sistemas muscular e cardiovascular. A capacidade energética do músculo esquelético de equinos é elevada e vai muito além da capacidade dos sistemas respiratório e cardiovascular em captar e transportar o oxigênio até as células musculares. Neste contexto, o sistema cardiovascular constitui parte muito importante durante o exercício, pois ajuda a estabelecer a capacidade aeróbica, a qual se refere à capacidade do indivíduo em gerar energia a partir do metabolismo aeróbico (POOLE & ERICKSON, 2008).

O transporte de oxigênio até os tecidos (músculos em exercício, por exemplo) se dá através da circulação sanguínea, sendo que uma pequena parcela dissolvida no plasma e a outra, grande parcela, ligada à hemoglobina. Esse transporte depende da habilidade em captar o oxigênio do ar inalado e levá-lo até o alvéolo pulmonar (fluxo pulmonar), onde subsequentemente, ocorrerá, por difusão, a ligação do oxigênio à hemoglobina. Isto ocorre de maneira rápida em virtude da fina membrana que separa os alvéolos dos capilares pulmonares e pela extensa área de superfície dos pulmões de equinos (Figura 3). Os pulmões constituem condição limitante ao exercício nos equinos, como mencionado anteriormente, pois não aumentam de tamanho com o treinamento. Por esta razão qualquer afecção que comprometa a função dos pulmões ou vias aéreas superiores em realizar o transporte de oxigênio aos pulmões e as trocas gasosas podem comprometer o desempenho do equino. A capacidade em transportar o oxigênio para os tecidos depende então da capacidade do sangue em carregá-lo e do débito cardíaco, constituindo assim os fatores limitantes a eficiência desse transporte (HARGREAVES et al., 1999).

Em conjunto com o débito cardíaco (DC), a capacidade do sangue em transportar o oxigênio é quem determina o quanto de oxigênio é carregado para os tecidos. Uma vez oxigenado, o sangue sai dos pulmões e vai irrigar grupamentos musculares em exercício (Figura 3). Essa capacidade do sangue em transportar oxigênio aumenta rapidamente em cavalos devido ao aumento da concentração de hemoglobina oriunda da contração esplênica em resposta ao aumento da atividade simpática que ocorre antes e durante o exercício sem que haja aumento no volume plasmático. Neste contexto, é importante ressaltar que o baço constitui a grande reserva de hemácias que corresponde a 1/3 do volume circulante. Este dado é importante, pois estudos indicam que com a contração esplênica dobra a capacidade do sangue em transportar oxigênio em equinos (EVANS, 2000).

Sendo assim, em equinos, a capacidade aeróbica é considerada elevada em virtude da associação de fatores como a capacidade em ter um débito cardíaco máximo maior que outras espécies e o aumento súbito na concentração de hemoglobina. Com

isso, as adaptações estruturais visam melhorar a oxigenação sanguínea nos pulmões, aumentar a capacidade de transporte de oxigênio e aumentar a habilidade em difundir o oxigênio nos tecidos. Logo, quanto maior a capacidade em disponibilizar oxigênio para as células musculares, maior é a capacidade aeróbica máxima ($\dot{V}O_{2\max}$) e melhor é a capacidade atlética do cavalo (KRONFELD, 2000; CAMPBELL, 2008; EVANS, 2008).

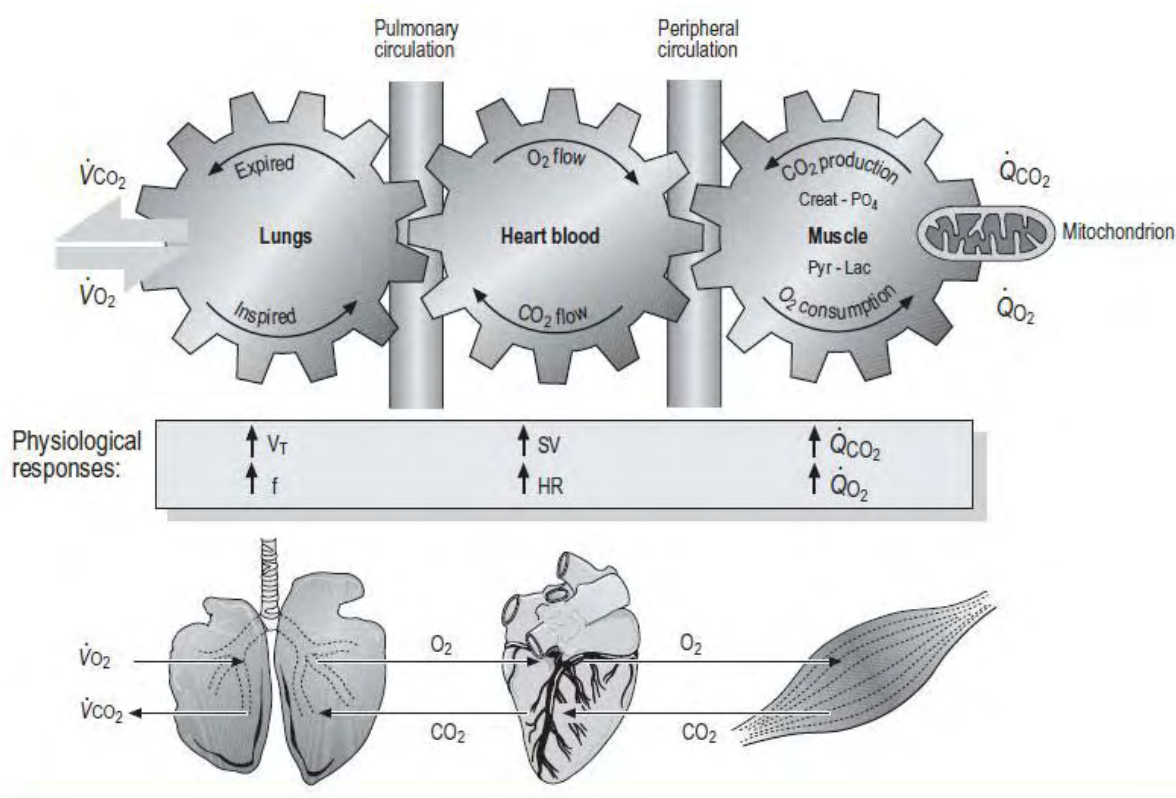


Figura 3. Esquema resumido da captação do oxigênio e eliminação do dióxido de carbono. RIVEIRO & PIERCY, 2008.

Os princípios do treinamento se baseiam na repetição, somatização e duração. Esses três fatores são necessários para que haja os ajustes adaptativos relacionados ao treinamento, oriundos do estímulo repetitivo ocasionado pelo exercício proposto, resultando na indução do efeito de treinamento. Sendo assim, o protocolo de treinamento escolhido deve ser bem planejado para que se obtenha a máxima resposta

ao treinamento e reduza os riscos de injúrias (EVANS, 2000; HINCHCLIFF & GEOR, 2008).

Após se estabelecer o protocolo de treinamento, comumente, treinadores e veterinários delineiam exercícios testes padrão para avaliar a eficiência do protocolo proposto. Muitos testes a campo ou em ambientes controlados com esteira rolante tem sido descritos para tal finalidade em equinos (EVANS, 2000; KRONFELD, 2000; SERRANO et al., 2002; CAMPBELL, 2008; EVANS, 2008; LINDNER et al., 2009). Entre os testes, há vantagens e desvantagens. Os testes realizados em esteira rolante tem como vantagens o controle das condições ambientais, controle da velocidade, controle do tempo de exercício em cada velocidade, fácil acesso para colheitas de material biológico durante o exercício (como sangue e frequência cardíaca) e execução do protocolo delineado com precisão. O alto custo da esteira, a manutenção, a necessidade de mão de obra especializada, a necessidade de adaptar os animais a esteira e a diferença da superfície da esteira em relação às pistas onde ocorrem as provas constituem as principais desvantagens da utilização da esteira para tais testes (EVANS, 2000; EVANS, 2008).

Os testes realizados a campo possuem vantagens durante sua realização no que diz respeito à superfície onde são realizados, proporcionando efeito mais próximo da realidade das competições, assim como levam em conta o efeito do cavaleiro/jockey que conduz o cavalo. Entretanto, tais fatores podem dificultar a padronização dos testes a campo, constituindo uma das principais desvantagens em conjunto com a incapacidade de controlar as condições climáticas e das superfícies (EVANS, 2000; EVANS, 2008).

Os testes a campo frequentemente avaliam variáveis como frequência cardíaca e a concentração de lactato (EVANS, 2000; SERRANO et al., 2002; CAMPBELL, 2008; EVANS, 2008; LINDNER et al., 2009). A frequência cardíaca (FC) é, em geral, utilizada em exercícios com velocidade submáxima, onde se estabelece a velocidade em que o

cavalo atinge uma determinada frequência cardíaca por minuto (V140, V170 e V200, por exemplo) (SERRANO et al., 2002; LINDNER et al., 2009).

Inúmeros estudos tem sido realizados para avaliar o nível de treinamento utilizando como ferramenta a mensuração da concentração de lactato em diferentes velocidades, crescentes ou não (CAMPBELL, 2011). O lactato aumenta de acordo com o aumento da intensidade do exercício, a princípio lentamente e, em seguida, bem rápido. O acúmulo sanguíneo e muscular de lactato durante exercício intenso é uma das primeiras alterações metabólicas associadas à fadiga (KRONFELD et al., 2000). Neste contexto, a maioria dos testes padronizados descritos para avaliação de treinamento de equinos destacam as velocidades em que os valores da concentração de lactato atingem entre 2,0 ou 4,0 mmol/L (CAMPBELL, 2011).

Muitos trabalhos descrevem a realização de um ou mais testes de exercícios padronizados, os quais são aplicados antes do início ou logo após o início do treinamento e repetidos ao fim do treinamento ou após um determinado tempo com o objetivo de avaliar o efeito do treinamento (LINDNER et al., 2009).

As modalidades esportivas equestres exigem tanto habilidade como bom condicionamento físico de cavalos e cavaleiros. O enduro equestre é uma modalidade que exige muita resistência física, visto que algumas provas fazem com que o animal percorra 160 quilômetros de distância em um único dia. A termoregulação deve ser eficiente, pois as provas são realizadas muitas vezes em condições climáticas adversas com predomínio, muitas vezes, de clima quente e úmido. O cavalo em exercício produz quantidades elevadas de calor metabólico e a maneira mais eficiente para dissipar este calor é pela evaporação. Com isso, há importantes perdas hídricas e eletrolíticas durante a prova, principalmente pelo aumento abrupto de produção de suor para dissipar o calor produzido em exercício fazendo com que haja necessidade de manutenção da homeostase pelo organismo (KRONFELD, 2001; HESS et al., 2006; McKEEVER, 2008).

O sistema Renina-Angiotensina (SRA) é muito importante na regulação da pressão sanguínea regulando o fluxo para diferentes tecidos do corpo e manutenção dos fluidos e eletrólitos em mamíferos. Como parte deste sistema, o fígado produz angiotensinogênio o qual por meio da ação da renina, produzida pelos rins, é convertido em angiotensina I (ANG I) (INAGAMI, 1994). Esta é um decapeptídeo que, mediante ação da ECA, é convertida em angiotensina II (ANG II), um octapeptídeo chave na modulação da pressão sanguínea, pois ao se ligar a receptores AT1 causa vasoconstricção (REID et al., 1978). A conversão de ANG I em ANG II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) ocorre predominantemente nos pulmões (PARSONS & COFFMAN, 2007).

A ANG I pode ser convertida por outras peptidases fora a ECA. A ANG I pode ser convertida em angiotensina 1-7 por uma endopeptidase ou em angiotensina 1-9 por outra enzima com estrutura diferente chamada de enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2). A ECA 2 é uma enzima chave na geração de um potente vasodilatador que é a angiotensina 1-7, constituindo uma perspectiva para novas descobertas terapêuticas para pacientes com hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares (FRANCISCETTI et al., 2005).

Em humanos, a ECA se caracteriza por possuir polimorfismo genético. A concentração plasmática em humanos e ratos é determinada pela expressão gênica de dois alelos, a saber, D de deleção e I de inserção, os quais determinam a existência de três fenótipos: D/D, D/I e I/I. A expressão desses genótipos pode sofrer influência do treino e do meio (TOZAKI et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2006; LEEB et al., 2006; YAMAGISHI et al., 2007). Em cavalos o gene da ECA também apresenta o polimorfismo relatado para humanos (ELLIS et al., 2002).

Alguns pesquisadores tem associado a expressão do genótipo I/I com a melhoria do desempenho de atletas humanos (GAYAGAY et al., 1998; MONTGOMERY et al., 1999; TAYLOR et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2000; NAGASHIMA et al., 2000; CERIT et al., 2006; THOMPSON et al., 2006), principalmente em maratonas (MYERSON et al.,

1999; CAM et al., 2006; BAE et al., 2007). O genótipo I/I faz com que o indivíduo tenha menor concentração de ECA no plasma, enquanto o genótipo D/D confere uma concentração maior (GOH et al., 2009; TOBINA et al., 2010).

Concentrações sanguíneas normais de ECA tanto em humanos quanto em equinos já foram publicados. Em humanos estas variam de 86 a 103 U/L (RYAN et al., 1977) e em cavalos de 51 a 77 U/L (TILLMAN & MOORE, 1989; COOMER et al., 2003).

Mais recentemente, estudos realizados em humanos e animais de laboratório tem procurado enfocar o componente genético do polimorfismo da ECA, visando quantificar a presença dos alelos I/D e determinar a frequência de cada genótipo (I/I, D/D e I/D) nos indivíduos e populações estudados, relacionando-os ou não ao desempenho físico (GAYAGAY et al., 1998; MONTGOMERY et al., 1999; MYERSON et al., 1999; TAYLOR et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2000; NAGASHIMA et al., 2000; CAM et al., 2006; CERIT et al., 2006; THOMPSON et al., 2006; BAE et al., 2007). A correlação entre a concentração plasmática de ECA e o genótipo de 60 atletas de elite e 400 indivíduos controle foi relatada, e constatou-se que os atletas I/I apresentavam concentrações plasmáticas dessa enzima 3 a 4 vezes menores que os indivíduos do grupo controle com genótipo D/D, sugerindo que este fator genético influencia o desempenho físico (ÁLVAREZ et al. 2000).

A variação genética deste polimorfismo da ECA, juntamente com a expressão gênica, influencia a concentração plasmática circulante desta enzima. Ela compõe um dos principais mecanismos responsáveis pela regulação de pressão arterial e homeostase sanguínea mediante a degradação de cininas vasodilatadoras e formação de angiotensina II (ANG II) que desempenha importante ação vasoconstrictora (WOODS et al., 2000). Por esta razão, o sistema renina angiotensina (SRA) é amplamente estudado e descobriu-se que além da ação sistêmica, há relatos de ação local independente do SRA no miocárdio, músculo esquelético e tecido adiposo (DZAU, 1988; JONSSON et al., 1994; DRAGOVIC et al., 1996) e indivíduos D/D podem

apresentar atividade plasmática e tissular de ECA 25% a 200% maiores que indivíduos I/I (SAMANI et al., 1996; ALVAREZ et al., 2000).

Estudos apontam que a menor atividade plasmática de ECA reduz a quantidade formada de ANG II, diminuindo seus efeitos vasoconstrictores do SRA e os efeitos tróficos em células musculares cardíacas (GAYAGAY et al., 1998; MYERSON et al., 1999). A diminuição da atividade da ECA também causa aumento da meia vida da bradicinina, o que resulta na melhora da vasodilatação endotélio-dependente e aporte de oxigênio e nutrientes ao músculo em exercício (BUTLER et al, 1999; WOODS et al, 2000). MONTGOMERY et al. (1999) sugeriram que há uma resposta anabólica maior nos indivíduos com menores concentrações de ECA comparados aqueles com concentrações mais elevadas, em virtude da diminuição do diâmetro das fibras musculares, aumento do número de capilares e, conseqüentemente, aumento da vascularização muscular local, facilitando o aporte sanguíneo e melhora na oxigenação dos tecidos e conseqüentemente um metabolismo energético mais eficiente.

É importante ressaltar que essas alterações são importantíssimas, pois a musculatura em exercício demanda muita energia para manutenção do mesmo, e umas das adaptações ocorridas durante o treinamento é a melhora na eficiência energética por aumentar a mobilização e carreamento de substratos e oxigênio para as mitocôndrias, as quais são responsáveis por obter energia na forma de moléculas de ATP (WOODS et al., 2000). Um exemplo clássico do efeito de mobilização de substrato inclui o fluxo sanguíneo durante o exercício para adipócitos. Em exercícios de alta intensidade, carboidratos são utilizados pelo metabolismo anaeróbico (glicólise) como fonte de energia e o principal motivo para a diminuição da lipólise e o aumento da glicólise é a diminuição de fluxo de sangue ao tecido adiposo (Frayn, 2010).

Até o presente momento, poucos trabalhos realizados em humanos mensuraram, além do genótipo, a atividade da ECA antes, durante e após o período de treinamento ou durante o exercício (LENTZ et al., 1998; ÁLVAREZ et al., 2000; NG, 2009). Um desses estudos avaliou onze humanos com claudicação intermitente e com estenose

arterial antes e após oito semanas de treinamento em esteira rolante não encontrando diferença entre os valores plasmáticos de ECA antes e após o treinamento (NG, 2009). Este resultado pode ter sido influenciado pela patologia associada que os humanos apresentavam e por não serem atletas.

Estudos realizados com atletas japoneses e britânicos, de diferentes modalidades esportivas, identificaram que os melhores desempenhos em exercícios de resistência foram evidenciados nos corredores com o genótipo I/I comparados ao genótipo D/D. Além disso, não houve nenhum indivíduo com o genótipo D/D entre os cinco maratonistas mais rápidos das corridas acompanhadas, sendo isso sugestivo que atletas maratonistas humanos de elite sejam portadores de genótipos I/I (MYERSON et al., 1999; CAM et al., 2006; BAE et al., 2007; TOBINA et al., 2010).

Atletas enduristas humanos de genótipos D/D possuem aumento significativo ($P \leq 0,05$) do índice da massa ventricular esquerda quando comparados com os indivíduos D/I e I/I. A expressão gênica da atividade da ECA na parede vascular estimula a taxa local de produção de ANG II que influencia na estrutura e função do tecido (DI MAURO et al., 2010).

O alelo I em jogadores de Rugby asiáticos é sugestivo de conferir vantagem em sua capacidade aeróbica mensurada pela capacidade máxima de oxigênio e o limiar ventilatório (GOH et al., 2009).

Em humanos, o aumento da concentração plasmática de ECA também pode ser associado a doenças como hipertensão arterial (BARBALIC et al., 2006), diabetes mellitus tipo 2 (LIM et al., 2007), síndrome aguda de estresse respiratório (IMAI et al., 2007), síndrome metabólica (ALVAREZ-AGUILAR et al., 2007), sarcoidose pulmonar (NAGAI et al., 1999) e provável infarto do miocárdio (ALVAREZ et al., 1998).

Em cavalos, a mensuração da atividade plasmática da ECA permite melhor avaliação do SRA em relação à expressão gênica do polimorfismo I/D, pois a atividade

de ECA sofre influência de fatores relacionados ao tipo de ambiente e treinamento (DE MELLO COSTA et al., 2010).

Um estudo demonstrou a relação inversa entre a concentração plasmática da ECA com a distância percorrida por cavalos Puro Sangue Inglês de corrida de turfe. Foi constatado que quanto maior a atividade plasmática de ECA, melhor o desempenho em corridas de curta distância (COSTA et al., 2012). Logo, foi levantada a hipótese de que cavalos com menores concentrações plasmáticas desta enzima poderiam apresentar um melhor desempenho em exercícios de resistência.

O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração plasmática da enzima conversora de angiotensina (ECA) em equinos da raça Puro Sangue Árabe (PSA) durante a fase de treinamento e durante exercício de resistência.

III. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP – Câmpus de Jaboticabal – número do protocolo 028195/10, de dia dezessete de dezembro do ano de dois mil e dez.

III.1. Animais

Foram utilizados 11 equinos adultos, nove machos e duas fêmeas, da raça Puro Sangue Árabe (PSA), pertencentes à Fazenda Serra da Prata, município de Águas da Prata, São Paulo. Antes de iniciar o período experimental, os animais passaram por exames físicos (TAYLOR & HILLYER, 1997), foram pesados, e submetidos a exames hematológicos. Foram utilizados somente equinos hígidos e em boas condições nutricionais após passarem por programas de desverminação¹, controle de ectoparasitas² e vacinação.

Dezesseis semanas antes do experimento, os animais foram mantidos em piquetes com sal mineral, feno de tifton e água *ad libitum* e foram encaminhados a baias individuais, duas vezes ao dia, para a complementação da alimentação diária em ração comercial balanceada que supria 40% da exigência energética para trabalho moderado (NRC, 2007). Neste período, os animais não foram treinados caracterizando o período de inatividade física de treinamento a fim de evitar que houvesse interferência de efeitos de condicionamentos físicos realizados anteriormente. Os cavalos utilizados eram atletas de enduro que haviam participado de provas de resistência anteriormente.

¹ Equalan®. Merial Saúde Animal LTDA. São Paulo, SP.

² Butox® P CE 25 – Intervet Brasil, Akzo Nobel Ltda. São Paulo, SP.

III.2. Teste de esforço físico progressivo (TEP)

Encerrado o período de inatividade física, os equinos foram submetidos a teste de esforço progressivo padrão (TEP) a campo antes de iniciar o treinamento (TEP 1). Ao término do período de treinamento, outro TEP foi realizado (TEP 2), como demonstra a Figura 4A e 4B. O treinamento durou 12 semanas. Esses dois testes tiveram como objetivo avaliar a eficiência do treinamento e o condicionamento dos animais antes do teste de resistência. O protocolo utilizado no segundo teste foi exatamente igual ao primeiro.

Trinta minutos antes do início TEP, os equinos tiveram uma de suas veias jugulares cateterizada³, à qual se acoplou extensor⁴, a fim de facilitar a colheita de sangue. Durante o TEP, antes de cada incremento de velocidade, foram efetuadas colheitas de sangue para determinação da concentração sanguínea de lactato (Figura 5B).

O TEP foi realizado em uma pista de hipismo pertencente à fazenda, com piso de areia e superfície plana, e o trajeto delimitado para cada volta media 470 metros (m) de distância (Figura 4A e 4B). O protocolo consistiu de um período de aquecimento físico de dez minutos (min) a 1,7 metros por segundo (m/s) ao passo, seguido de cinco minutos de trote a 3,0 m/s. Após o período de aquecimento, a cada momento do teste (T) a velocidade dos cavalos era aumentada em 1,0 m/s, até a velocidade final de 10 m/s. Os animais realizaram então um desaquecimento ativo de cinco minutos de trote a 3,0 m/s e outros cinco minutos ao passo a 1,7 m/s (Tabela 1).

Um equipamento de posicionamento global via satélite⁵ foi utilizado para monitorar a velocidade e a distância, garantindo assim que o protocolo estabelecido fosse executado nas exatas velocidades propostas (Figura 6A e 6B).

³ BD Intracath™ 16G - BD Vacutainer®, São Paulo, SP.

⁴ Extensor para cateter 40cm Luer Lock – Embramed. Jurubatuba, SP.

⁵ Monitor Cardíaco RS300X G com Elástico Eletrodo Wearlink Equino – Polar®, Lake Success, NY – EUA.

Tabela 1. Protocolo utilizado em ambos os testes de esforço progressivo a campo de equinos. Águas da Prata, 2011.

ETAPAS	MOMENTO	VELOCIDADE (m/s)	DISTÂNCIA (m)	DURAÇÃO (min e seg)
REPOUSO	T0	-	-	-
AQUECIMENTO	T1	1,7	1020	10'
	T2	3	480	2'40"
	T3	4	720	3'
EXERCÍCIO DE	T4	5	960	3'12"
	T5	6	1200	3'20"
ESFORÇO	T6	7	1200	2'51"
	T7	8	1440	3'
PROGRESSIVO	T8	9	1680	3'09"
	T9	10	1680	2'48"
DESAQUECIMENTO	T10	3	480	5'
	T11	3	480	5'
	T12	1,7	480	5'
REPOUSO	T13	-	-	-
	T14	-	-	-



Figura 4. A e B - Realização do teste de esforço progressivo a campo. Águas da Prata, 2011.

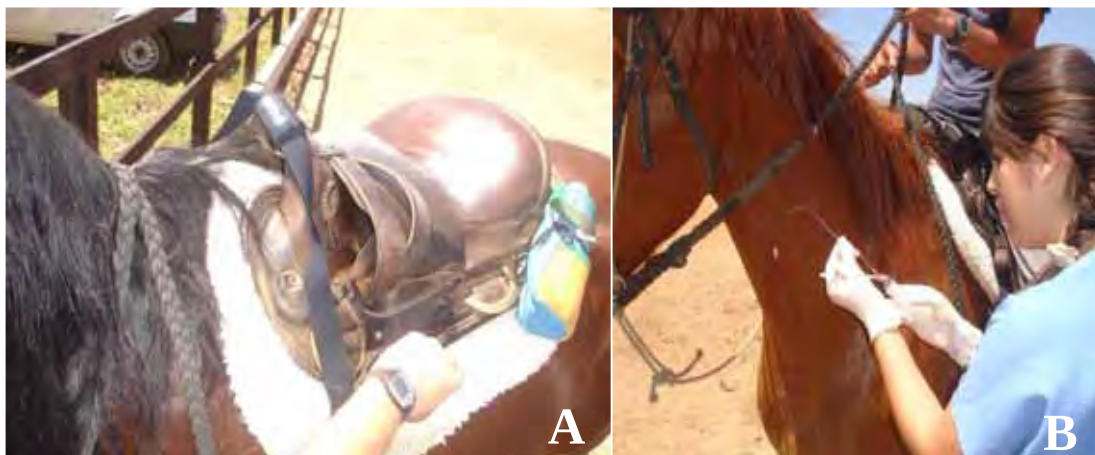


Figura 5. **A** - Colocação do frequencímetro para realização do primeiro TEP. **B** – Cateter utilizado para as colheitas de sangue. Águas da Prata, 2011.



Figura 6. **A** – Colocação de equipamento de posicionamento global via satélite para realização do TEP realizado a campo. **B** – Em detalhe o equipamento fixado no braço do cavaleiro. Águas da Prata, 2011.

III.3. Protocolo de treinamento (PT)

Após a realização do primeiro TEP, os equinos passaram por um programa de treinamento com 12 semanas de duração. Todos foram submetidos a um treinamento a campo, composto por duas sessões semanais de 60 minutos de duração, predominantemente ao passo e trote, e uma sessão semanal de 90 minutos de duração

ao galope em pista de areia. A frequência cardíaca dos cavalos não foi aferida durante o treinamento.

Durante o processo de treinamento, os animais foram avaliados clinicamente a fim de evitar qualquer afecção que comprometesse a higidez dos atletas.

III.4. Teste de resistência (TR)

Ao final do período de treinamento, foi realizado, em um único dia, um teste de resistência (TR) constituído por uma prova similar às competições oficiais de enduro equestre, utilizando os animais que participaram do treinamento. Os equinos percorreram um trajeto de 80 quilômetros (km) de distância, dividido em quatro etapas, sendo a primeira de 30, a segunda de 20 e a terceira e quarta de 15 km cada, com uma parada obrigatória de 50 minutos para colheita de sangue e para exames físicos (EF), que foram realizados antes do início do exercício (EF1), entre cada etapa (EF2, EF3 e EF4) e ao final (EF5), realizado 20 minutos após o término da quarta e última etapa.

Apenas nove dos onze equinos participaram do teste de resistência. Dois equinos apresentaram claudicações durante a fase de treinamento e foram afastados para tratamento médico.

III.5. Exame físico (EF)

Exames físicos (EF) antes do TR e durante as paradas obrigatórias foram efetuados para atestar a saúde dos animais, habilitando-os ou não a prosseguir para a próxima etapa da prova. O exame final (EF5) foi realizado após a conclusão da prova, em caráter eliminatório.

Os EF realizados seguiram a regulamentação da Federação Equestre Internacional (FEI, 2010). Os parâmetros observados incluíram avaliação de

frequências cardíaca (batimentos por minuto) e respiratória (movimentos por minuto), coloração de mucosas (normal ou alterada), desidratação (ausente, até 6% ou acima de 6%), tempo de preenchimento capilar (em segundos), turgor de pele (normal ou alterado), auscultação abdominal (normal ou alterada), sensibilidade muscular (normal ou alterado) e avaliação do andamento ao trote para detecção de claudicação (ausente ou presente), impulsão e atitude geral. Os parâmetros foram anotados em fichas individuais para análise.

Durante os 50 minutos da parada obrigatória, os cavalos tiveram livre acesso à água e ao feno de tifton. Não foi administrada pasta com eletrólitos aos animais em nenhum momento antes ou durante a prova.

III.6. Colheita das amostras de sangue

Durante o TEP amostras de sangue foram colhidas em repouso, ao final do aquecimento, no último minuto de exercício ao final de cada momento (T) de aumento da velocidade. Durante as 12 semanas de treinamento o sangue foi colhido antes do primeiro TEP, na quarta e décima segunda semanas de treinamento. No dia do TR, as amostras foram obtidas 30 minutos antes do início, na chegada de cada parada obrigatória, 01, 24 e 48 horas após o término do teste.

A cada colheita descrita, o sangue foi obtido de uma das veias jugulares, após antisepsia local adequada, com o uso de agulha⁶ ou cateter⁷, dependendo do dia e atividade realizada. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante⁸ ou com anticoagulante (EDTA⁹ ou Heparina¹⁰), de acordo com a análise realizada.

⁶ BD Vacutainer® Passive Shielding Blood Collection Needle 21g x 1" - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

⁷ BD Intracath™ 16G - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

⁸ Serum Tube, No Additive, Silicone-Coated Interior - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

⁹ Plastic Whole Blood tube with spray-coated K₂EDTA - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

¹⁰ PlasmaTube 60 USP Units of Lithium Heparin (spray-coated) - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

III.7. Análises laboratoriais

Todos os momentos relacionando as diferentes análises laboratoriais realizadas neste experimento foram sumarizados na Tabela 2, ao final da descrição desta subseção.

III.7.1. Hemograma

As amostras de sangue para realização de hemograma foram colhidas e acondicionadas em tubos contendo anticoagulante EDTA⁹, conforme descrito por ROSENFELD (1955), sendo imediatamente homogeneizadas, acondicionadas em isopor com gelo e levadas ao laboratório¹¹ onde foram processadas com o auxílio de um contador automático de células¹².

A contagem diferencial de leucócitos foi obtida utilizando-se de esfregaços sanguíneos corados com solução de May-Grunwald, Giemsa e Metanol. Posteriormente, as preparações citoscópicas foram analisadas à microscopia óptica, utilizando microscópio¹³ com aumento de 1000 vezes (em imersão). A fórmula leucocitária absoluta foi calculada a partir dos valores relativos das contagens global e diferencial de células leucocitárias, por regra de três direta.

Para dosagem de proteínas séricas, amostras de sangue foram colhidas em tubos sem anticoagulante e centrifugadas¹⁴ por 5 minutos com força de centrifugação de 1509 gauge (g). Ao fim da centrifugação, alíquotas de soro foram pipetadas em microtubo¹⁵ e refrigeradas. Em seguida, foram transportadas até o laboratório¹⁶ onde

¹¹ Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

¹² Contador automático de células poch- 100 iV Diff® - Mundelein, IL – EUA.

¹³ Microscópio Nikon® modelo Eclipse E200 - Melville, NY – EUA.

¹⁴ Centrifuga BABY®I Mod. 206 BL - FANEM®. São Paulo, SP.

¹⁵ Microtubo 2,0 ml tipo eppendorf de polipropileno transparente - AZLON®, Ribeirão Preto, SP.

¹⁶ Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

foram armazenadas e mantidas em freezer¹⁷ a -20° Celsius (C) até serem analisadas. As alíquotas de soro congelado foram utilizadas para dosagem de proteína total por espectrofotometria¹⁸ utilizando kit comercial¹⁹.

III.7.2. Lactato

As amostras de sangue obtidas durante a realização de ambos os TEP e durante o TR para a dosagem da concentração de lactato foram colhidas em tubos contendo anticoagulante Fluoreto de sódio²⁰. As alíquotas de sangue total com anticoagulante foram transferidas para microtubo²¹, acondicionadas em isopor com gelo e transportadas até o laboratório²² onde foram armazenadas e mantidas congeladas em freezer²³ a -20° C até serem analisadas.

A determinação da concentração de lactato foi realizada, posteriormente, pelo método da lactato oxidase com um analisador automático²⁴.

As médias das concentrações de lactato, de ambos os testes, obtidas para cada uma das velocidades crescentes, constituindo os momentos do teste (T), foram utilizadas para obter duas curvas (uma para cada TEP) relacionando a velocidade com a concentração de lactato.

¹⁷ Freezer Brastemp® modelo Frost Free Flex BVR28GRBNA – São Paulo, SP.

¹⁸ Espectrofotômetro LABQUEST BIO 2000 – LABTEST®, Lagoa Santa, MG.

¹⁹ Kit para dosagem de PROTEÍNA TOTAL Ref. 99-250 – LABTEST. Lagoa Santa, MG.

²⁰ Plastic Plasma Tube with Glycolytic Inhibitor, 5.0mg Sodium Fluoride, 4.0 mg Pot. Ox. – BD Vacutainer®, São Paulo, SP.

²¹ Microtubo 2,0 ml tipo eppendorf de polipropileno transparente - AZLON®, Ribeirão Preto, SP.

²² Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

²³ Freezer Brastemp® modelo Frost Free Flex BVR28GRBNA – São Paulo, SP.

²⁴ Lactímetro - YSL 2300 Stat Plus. Yellow Springs – EUA.

III.7.3. Enzima conversora de angiotensina

As amostras de sangue para mensurar a atividade da ECA foram colhidas antes do início do treinamento (B1), na quarta (B2) e na décima segunda semana (B3) após o início do treinamento, sempre pela manhã (no mesmo horário), trinta minutos antes do início do TR (B4), imediatamente à chegada em cada parada obrigatória (B5, B6, B7 e B8), uma hora (B9), 24 horas (B10) e 48 horas (B11) após o encerramento do enduro.

O sangue foi colhido em tubos contendo heparina²⁵ e foram imediatamente centrifugados¹⁴ por 5 minutos com força de centrifugação de 1509 g. Ao fim da centrifugação, alíquotas de plasma foram pipetadas em criotubos²⁶ e congeladas em nitrogênio líquido a -196° C. Em seguida, foram transportadas até o laboratório²⁷ onde foram armazenadas e mantidas em freezer²⁸ a -70° C até serem analisadas. O tempo decorrido entre a colheita de sangue e o congelamento da amostra em nitrogênio líquido foi menor que uma hora.

A atividade da ECA foi determinada utilizando-se o hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu) como substrato e medida pela análise fluorimétrica para o dipeptídeo His-Leu formado (YANG & NEFF, 1972). O volume de 20 µL de plasma foram incubados à temperatura de 37°C com 200 µL de solução de Hip-His-Leu (10 mM) em Tampão Tris HCl 20 mM com 0,3 M NaCl. Após 15 minutos, foi adicionado 1 mL de NaOH 0,5 M para interromper a ação enzimática. O dipeptídeo His-Leu foi detectado pela adição de 0,1 mL de *o*-ftaldialdeído 1% (massa/volume, em etanol), seguido da adição de 0,2 mL de HCl 6 M após 4 minutos. A fluorescência foi medida em fluorímetro²⁹ com comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata.

²⁵ Tube, 60 USP Units of Lithium Heparin (spray-coated) - BD Vacutainer®. São Paulo, SP.

²⁶ Criotubo com capacidade 2,0 ml - Modelo 89020. Trasadingen – Suíça.

²⁷ Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

²⁸ Ultra Freezer AL374 – 80V – AmericanLab. Charqueada, SP.

²⁹ Fluorímetro automático BioTek® Synergy 2 - Winooski, VT – EUA.

Uma curva padrão foi elaborada para o dipeptídeo His-Leu (0-25 nmol) com a finalidade de estabelecer os parâmetros da relação entre concentração de His-Leu e a fluorescência medida pelo espectrofluorímetro.

Para cada amostra com plasma, adicionou-se todos os componentes do ensaio acima descrito com exceção do hip-his-leu. E para cada placa utilizada, foi realizada a análise de uma amostra sem o plasma, chamada de branco.

A análise de cada amostra foi efetuada em triplicata. Por este motivo, para cada amostra foi calculada a média das leituras efetuadas e, em seguida, o valor obtido foi inserido em uma fórmula previamente descrita por YANG & NEFF (1972) para encontrar o valor da atividade da ECA.

Para todos os resultados apresentados, uma unidade (U) de atividade enzimática de ECA foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de His-Leu por minuto, por mL de plasma, nas condições descritas. Sendo assim, a atividade da ECA foi expressa em nmol de His-Leu/min/mL de plasma.

Tabela 2. Resumo dos momentos de colheita de sangue de equinos para diferentes análises laboratoriais Jaboticabal, 2011.

MOMENTO	HEMOGRAMA	LACTATO	ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
ANTES DO TREINAMENTO	INICIAL		B1
PRIMEIRO TESTE DE ESFORÇO PROGRESSIVO (TEP 1)		T0 -T14	
APÓS 4 SEMANAS DE TREINAMENTO			B2
APÓS 12 SEMANAS DE TREINAMENTO			B3
SEGUNDO TESTE DE ESFORÇO PROGRESSIVO (TEP 2)		T0 -T14	
ANTES DO TESTE DE RESISTENCIA (TR)	EF1	EF1	B4
PRIMEIRA PARADA OBRIGATÓRIA	EF2	EF2	B5
SEGUNDA PARADA OBRIGATÓRIA	EF3	EF3	B6
TERCEIRA PARADA OBRIGATÓRIA	EF4	EF4	B7
QUARTA PARADA OBRIGATÓRIA	EF5	EF5	B8
01 HORA APÓS O FIM DO TR			B9
24 HORAS APÓS O FIM DO TR			B10
48 HORAS APÓS O FIM DO TR			B11

III.8. Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi efetuada para avaliar os resultados dos TEP e do TR, utilizando o programa SAS³⁰. A todos os testes estatísticos foi aplicado o nível de significância de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Um modelo misto foi utilizado onde os tempos constituíram as variáveis fixas e os cavalos, dentro de cada tempo, foram considerados como fatores aleatórios. Quando as ANOVAS apresentaram diferença estatística entre os efeitos do tempo, os dados foram analisados pelo teste de comparação de Fisher.

A variável dependente analisada durante o período de treinamento foi a ECA e nesta análise os fatores fixos foram os tempos de colheita de sangue e os cavalos foram considerados como fator aleatório.

Para os testes de esforço progressivo, as variáveis analisadas como fatores fixos foram os momentos do teste (T) e o estado de treinamento (destreinados e treinados), e os cavalos dentro do estado de treinamento foram consideradas como fatores aleatórios. A concentração sanguínea de lactato foi a variável dependente.

Já para as variáveis obtidas antes e durante o TR, os efeitos dos tempos de foram avaliados como fatores fixos e os cavalos individualmente foram utilizados como fator aleatório. As variáveis dependentes foram os parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos.

Foi realizada uma análise de variância da atividade da ECA obtida antes e durante o TR comparando os cavalos que terminaram com os que não terminaram o teste.

³⁰ Statistical Analysis System - SAS 9.2. Cary, NC – EUA.

IV. RESULTADOS

Onze equinos adultos, sendo nove machos e duas fêmeas, hígidos da raça Puro Sangue Árabe (PSA) foram selecionados para a realização deste experimento. Exames clínicos e laboratoriais foram efetuados antes do início da fase de treinamento para atestar a saúde dos animais.

Os resultados das variáveis analisadas foram apresentados com os valores médios e erro padrão da média em tabelas e gráficos.

O exame laboratorial apresentou apenas um leve aumento da média do número de eosinófilos e de monócitos em relação aos valores de referência, como explicitados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios e erro padrão da média ($X \pm EPM$) do hemograma de onze equinos realizados antes do início do experimento. Jaboticabal, 2011.

HEMOGRAMA	VALORES EM REPOUSO	VALORES DE REFERÊNCIA*
Hematócrito (%)	$38 \pm 1,6$	32 – 55
Eritrócitos ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	$8,51 \pm 0,37$	7,0 – 13
Hemoglobina (g/dL)	$12,5 \pm 0,5$	10 – 18
Leucócitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	$7,018 \pm 0,362$	7 – 14
Contagem Diferencial ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)		
Eosinófilos	259 ± 56	0 – 150
Neutrófilos segmentados	3171 ± 408	2100 – 9000
Linfócitos	3461 ± 210	1750 – 9800
Monócitos	127 ± 24	0 – 900
Plaquetas ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	154 ± 12	200 - 600
Proteína Total	$6,4 \pm 0,1$	5,6 - 8,0

* Valores de referência segundo Laboratório de Patologia Clínica do HV Governador Laudo Natel da FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

IV.1. Teste de esforço progressivo (TEP)

O primeiro TEP foi realizado com todos os 11 animais. Porém dois equinos machos foram retirados da fase de treinamento após oito semanas de treinamento, pois apresentaram claudicação.

Apenas oito equinos realizaram o segundo TEP ao final da fase de treinamento. Um animal, durante a realização do segundo teste, teve o cateter deslocado e inviabilizou as colheitas de sangue, sendo retirado do teste.

Os valores médios da concentração de lactato relacionado às mesmas velocidades diminuíram no segundo teste quando comparado ao primeiro TEP, havendo diferença significativa para os momentos referentes às velocidades de oito ($P = 0,004$), nove ($p < 0,0001$) e 10 ($p = 0,0003$) metros por segundo (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e erro padrão da média ($X \pm EPM$) da concentração de lactato obtidos para cada uma das velocidades crescentes dos testes de esforço progressivo realizado a campo. Águas da Prata, 2011.

MOMENTO	VELOCIDADE (m/s)	LACTATO (mmol/L)	
		TEP 1 (n=11)	TEP 2 (n=8)
T0		$0,63 \pm 0,15^A$	$0,25 \pm 0,04^A$
T1	1,7	$0,37 \pm 0,04^A$	$0,16 \pm 0,04^A$
T2	3	$0,43 \pm 0,10^A$	$0,17 \pm 0,04^A$
T3	4	$0,46 \pm 0,07^A$	$0,23 \pm 0,04^A$
T4	5	$0,58 \pm 0,09^A$	$0,23 \pm 0,04^A$
T5	6	$0,90 \pm 0,10^A$	$0,35 \pm 0,07^A$
T6	7	$1,46 \pm 0,15^A$	$0,72 \pm 0,18^A$
T7	8	$2,70 \pm 0,38^A$	$1,0 \pm 0,24^B$
T8	9	$4,61 \pm 0,86^A$	$2,05 \pm 0,39^B$
T9	10	$6,36 \pm 0,71^A$	$2,46 \pm 0,49^B$
T10	3	$4,11 \pm 0,83^A$	$2,09 \pm 0,74^A$
T11	3	$1,97 \pm 0,41^A$	$1,13 \pm 0,47^A$
T12	1,7	$1,69 \pm 0,30^A$	$0,82 \pm 0,42^A$
T13	15'	$1,27 \pm 0,21^A$	$1,02 \pm 0,46^A$
T14	30'	$1,35 \pm 0,21^A$	$0,67 \pm 0,17^A$

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha representam diferença entre os testes de esforço progressivo 1 e 2, separados por 12 semanas de treinamento ($p \leq 0,05$).

Um gráfico velocidade x lactato com as médias e erro padrão da média foi elaborado, obtendo-se duas curvas. A Figura 7 apresenta o deslocamento da segunda curva de lactato (TEP 2) para a direita em relação a outra curva (TEP 1).

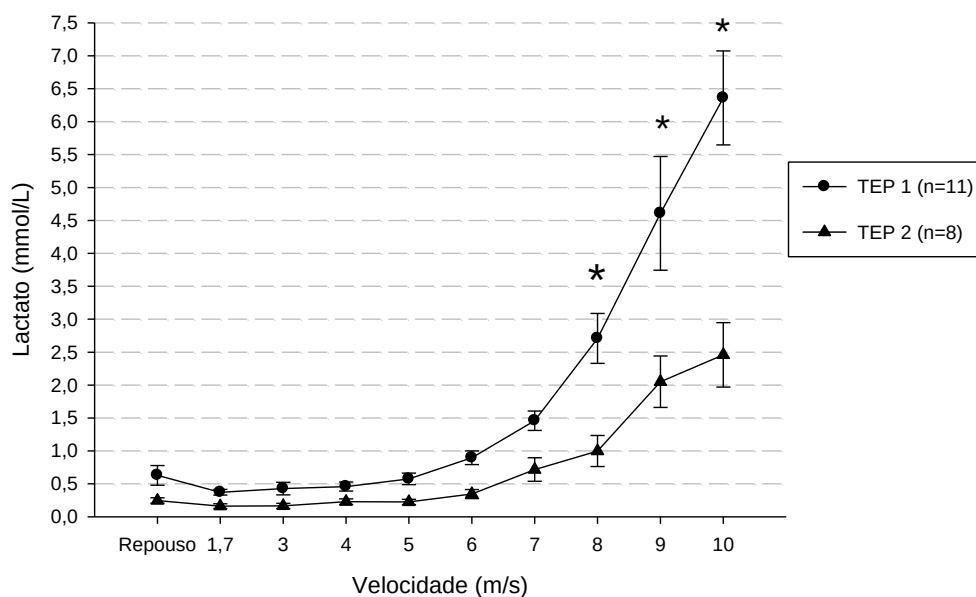


Figura 7. Testes de esforço progressivo (TEP) realizado a campo, em pista de areia, no qual registrou-se os valores médios $\pm$ EPM da concentração de lactato para cada uma das velocidades crescentes. Jaboticabal, 2011. * Representa diferença entre os mesmos momentos do primeiro e segundo TEP.

IV.2. Treinamento

Onze equinos iniciaram o período de treinamento, mas após 12 semanas apenas nove animais completaram o programa de treinamento proposto. A Tabela 5 apresenta as médias e erro padrão da média ($X \pm$ EPM) da atividade de ECA, obtidas antes do início do treinamento (B1), após quatro (B2) e doze (B3) semanas do início do treinamento. Houve diminuição gradual da atividade da ECA ao longo período de treinamento. As diferenças entre B1 e B2 ($p=0,0115$), B1 e B3 ($p<0,0001$) e B2 e B3 ($p<0,0001$) foram bastante evidentes e são ilustradas pela Tabela 5 e Figura 8.

Tabela 5. Valores médios $\pm$ EPM da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos antes do início do treinamento, após quatro e doze semanas de treinamento. Jaboticabal, 2011.

MOMENTO	ECA
B1 - antes início treinamento (n=11)	82,75 $\pm$ 0,48 ^A
B2 - após 4 semanas de treinamento (n=11)	80,87 $\pm$ 1,16 ^B
B3 - após 12 semanas de treinamento (n=9)	75,89 $\pm$ 1,13 ^C

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os momentos ($p \leq 0,05$).

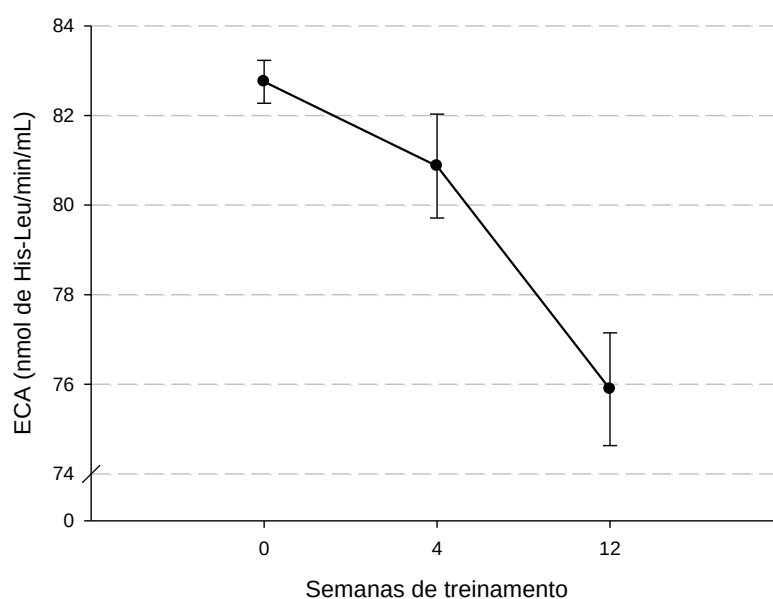


Figura 8. Atividade da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidas antes e durante o período de treinamento. Jaboticabal, 2011.

IV.3. Teste de resistência (TR)

Ao final do período de treinamento, uma semana após o TEP 2, um teste de resistência (TR) foi realizado com nove cavalos. O TR foi dividido em quatro etapas e entre elas houve uma parada obrigatória de 50 minutos para colheita de amostras de sangue e realização de exames veterinários nos cavalos.

Apenas cinco cavalos completaram a prova. Quatro animais foram eliminados durante o TR, sendo dois após percorrerem 30 km e outros dois após 50 km de

distância. No segundo exame físico (EF2), dois equinos foram eliminados, um apresentou sensibilidade muscular alterada e outro com claudicação no membro posterior direito. No EV3, outros dois equinos também foram eliminados, um com sensibilidade muscular da região lombar aumentada e com claudicação no membro posterior esquerdo e o outro por apresentar desidratação acima de 6%, evidenciada por apresentar tempo de preenchimento capilar acima de quatro segundos, aumento do tempo de retração da pele ao teste de turgor de pele e por apresentar frequência cardíaca acima de 56 batimentos por minuto após os 50 minutos da parada obrigatória. Todos os animais eliminados, aqui descritos, foram retirados do teste imediatamente e submetidos a tratamentos quando necessário.

A média de peso dos animais, em quilogramas (Kg) foi anotada em fichas individuais antes do início da prova e na chegada de cada etapa e seus valores corresponderam a 431 ± 8 , 401 ± 6 , 394 ± 8 , 392 ± 9 e 389 ± 10 kg respectivamente.

A velocidade média da prova foi de 11,75 km/h para completar o teste de 80 km. A velocidade da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª etapa foi de 8, 16, 11 e 11 km/h, respectivamente.

IV.3.1. Exame físico (EF)

Antes do início do TR e entre as etapas da prova, durante as paradas obrigatórias, houve exames físicos dos animais participantes do teste. Como relatado anteriormente, ao longo do TR quatro animais foram eliminados durante o EF2 e EF3.

Os EF avaliaram parâmetros clínicos que foram anotados em fichas individuais para análise e incluíam as frequências cardíaca (batimentos por minuto) e respiratória (movimentos por minuto), coloração de mucosas (normal ou alterada), desidratação (ausente, até 6% ou acima de 6%), tempo de preenchimento capilar (em segundos), turgor de pele (normal ou alterado), auscultação abdominal (normal ou alterada),

sensibilidade muscular (normal ou alterado) e avaliação do andamento ao trote para detecção de claudicação (ausente ou presente), impulsão e atitude geral.

Os demais parâmetros auxiliaram os médicos veterinários, durante a parada obrigatória, no julgamento do animal apto para continuar no teste, prosseguindo o exercício.

A frequência cardíaca apresentou aumento após os primeiros 50 km ($p=0,0086$) e se manteve mais alta durante o EF4 ($p=0,0192$) e EF5 ($p=0,0233$) em relação ao valor antes do início do TR. Houve aumento significativo da frequência respiratória apenas no EF2, após 30 km de teste, em relação ao EF1 ($p=0,0002$), EF3 ($p=0,0210$), EF4 ($p=0,0026$) e EF5 ($p=0,0360$). Para o tempo de preenchimento capilar (TPC) houve aumento no EF3 em relação ao EF1 ($p=0,0208$) e EF5 ($p=0,0361$). Os resultados das variáveis que apresentaram diferença significativa ($p\leq 0,05$) foram explicitados na Tabela 6.

Os parâmetros coloração de mucosas, desidratação, turgor de pele, auscultação abdominal, sensibilidade muscular e claudicação não apresentaram diferença significativa quando aplicado os testes estatísticos ($p>0,05$). Porém, os animais que apresentaram desidratação acima de 6%, sensibilidade muscular alterada e claudicação presente foram eliminados e retirados do TR.

Tabela 6. Valores médios $\pm$ EPM das variáveis obtidas em repouso e nos exames físicos efetuados durante o teste de resistência em equinos. Jaboticabal, 2011.

VARIÁVEIS	EF 1	EF 2	EF 3	EF 4	EF 5
FC (bpm/min)	41 ± 3^A	48 ± 4^A	53 ± 2^B	52 ± 3^B	52 ± 3^B
FR (mpm/min)	21 ± 2^A	47 ± 7^B	31 ± 2^A	22 ± 1^A	30 ± 7^A
TPC (segundos)	$2 \pm 0,2^A$	$2 \pm 0,2^{A,B}$	$3 \pm 0,3^B$	$3 \pm 0,2^{A,B}$	$2 \pm 0,5^A$

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os exames físicos realizados em diferentes momentos ($p\leq 0,05$).

IV.3.2. Hemograma

Amostras de sangue para realização de hemograma foram colhidas antes do início e na chegada de cada parada obrigatória do TR.

O hematócrito aumentou após os equinos completarem 30 km do teste ($p=0,0048$) e se manteve mais alto no EF3 ($p=0,0022$), EF4 ($p=0,0232$) e EF5 ($p=0,0057$) quando comparados aos valores obtidos antes do início do TR (EF1). Já os valores de eritrócitos, após o início do teste aumentaram no EF2 ($p=0,0311$) e no EF3 ($p=0,0139$), diminuíram no EF4 e voltaram a aumentar no último exame físico ($p=0,0273$) quando comparados ao valor de EF1.

Os leucócitos aumentaram significativamente a partir do EF3 ($p<0,01$) e se mantiveram mais altos que o EF1 e EF2 até o término do TR. A hemoglobina e a proteína total (Figura 9) não apresentaram diferença significativa quando comparados os valores antes e durante o teste. A média e erro padrão da média dos resultados dos hemogramas realizados antes e durante o TR estão na Tabela 7.

Tabela 7. Valores médios $\pm$ EPM dos hemogramas realizados antes e durante as paradas obrigatórias de equinos durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.

HEMOGRAMA	EF1	EF2	EF3	EF4	EF5	VALORES DE REFERÊNCIA*
Hematócrito (%)	43 ^A $\pm 2,0$	52 ^B $\pm 2,2$	53 ^B $\pm 2,4$	51 ^B $\pm 3,3$	53 ^B $\pm 2,6$	32 – 55
Eritrócitos ($\times 10^6$ / μ L)	9,42 ^A $\pm 0,47$	10,59 ^B $\pm 0,97$	10,86 ^B $\pm 0,33$	10,38 ^A $\pm 0,53$	10,84 ^B $\pm 0,43$	7,0 – 13
Hemoglobina (g/dL)	14,0 $\pm 0,7$	15,6 $\pm 0,6$	15,8 $\pm 0,7$	15,3 $\pm 1,0$	15,96 $\pm 0,8$	10 – 18
Leucócitos ($\times 10^3$ / μ L)	8,578 ^A $\pm 0,447$	9,078 ^A $\pm 0,582$	11,543 ^B $\pm 0,734$	12,14 ^B $\pm 1,103$	12,72 ^B $\pm 0,923$	7 – 14
Proteína Total (g/dL)	7,0 $\pm 0,3$	7,9 $\pm 0,3$	8,1 $\pm 0,3$	7,6 $\pm 0,4$	7,5 $\pm 1,3$	5,6 - 8,0

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p\leq 0,05$). * Valores de referência segundo Laboratório de Patologia Clínica do HV Governador Laudo Natel da FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

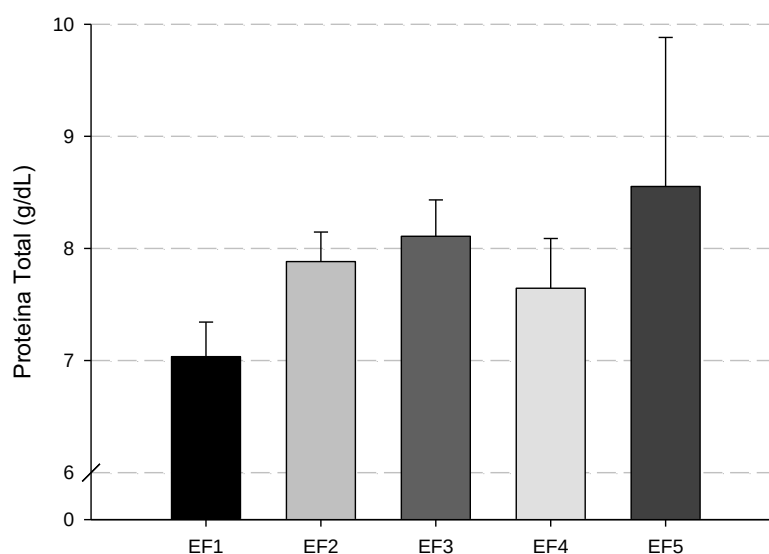


Figura 9. Representação gráfica das médias e erro padrão da média da concentração de proteína total de equinos obtidas antes e nas paradas obrigatórias de equinos durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.

IV.3.3. Lactato

A concentração de lactato foi aferida antes e ao longo do teste. A comparação das médias da concentração do lactato (Tabela 8) revelou aumento no EF2 ($p=0,00211$), EF3 ($p<0,0001$) e EF4 ($p=0,401$) quando comparados com o valor de antes do início do TR (EF1). Houve aumento também entre os valores de EF2 e EF3 ($p=0,0371$). A Figura 10 ilustra estas alterações durante o teste.

Tabela 8. Valores médios $\pm$ EPM das concentrações de lactato de equinos realizados em repouso e nas Paradas obrigatórias efetuadas durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.

VARIÁVEL	EV 1	EV 2	EV 3	EV 4	EV 5
Lactato (mmol/L)	$0,20 \pm 0,03^A$	$0,38 \pm 0,05^B$	$0,56 \pm 0,1^C$	$0,38 \pm 0,05^{B,C}$	$0,38 \pm 0,07^{A,B,C}$

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha representam diferença entre os momentos ($p \leq 0,05$).

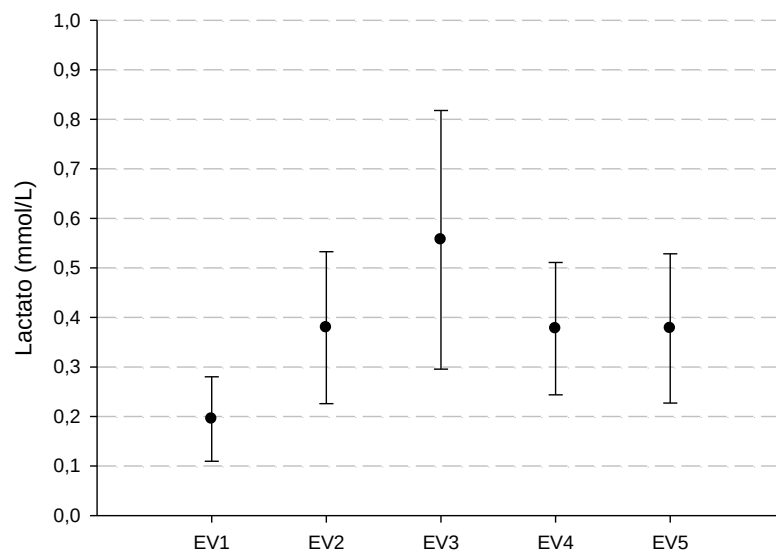


Figura 10. Representação gráfica das médias e erro padrão da média da concentração de lactato de equinos obtidos antes e nas paradas obrigatórias durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.

IV.3.4. Enzima conversora de angiotensina

As amostras colhidas para a avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) foram obtidas antes do início (B4), a cada parada obrigatória (B5, B6, B7, B8), a 1 (B9), 24 (B10) e 48 (B11) horas após o término do TR. Os valores médios obtidos no B4 foram menores que os obtidos no B10 ($p=0,0029$). Os menores valores encontrados neste experimento para a atividade da ECA ocorreram no tempo B6, o que não se repetiu durante o TR. Em B6 houve diminuição comparado com os tempos B5 ($p=0,0004$), B7 ($p=0,0020$), B10 ($p<0,0001$) e B11 ($p=0,0093$). Houve ainda diminuição da atividade da ECA do momento B5 para o B9 ($p=0,0438$) e aumento do B11 em relação ao B5 ($p=0,0031$). A Tabela 9 apresenta os resultados de ECA obtidos antes e durante o TR.

O comportamento médio da atividade da ECA antes e durante o TR está explicitada na Figura 11 e 12.

Tabela 9. Valores médios $\pm$ EPM da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos antes do início e nas paradas obrigatórias efetuadas durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011.

MOMENTOS	ECA ENDURO
B4 - antes do início do TR	75,89 $\pm$ 1,26 ^A
B5 – primeira parada obrigatória	78,81 $\pm$ 1,42 ^{B,E}
B6 – segunda parada obrigatória	71,04 $\pm$ 2,20 ^C
B7 – terceira parada obrigatória	79,69 $\pm$ 1,82 ^{A,B,D,E}
B8 – quarta parada obrigatória	78,02 $\pm$ 3,57 ^{A,B,D,E}
B9 - 01 hora após o término do TR	74,53 $\pm$ 2,45 ^{A,C}
B10 - 24 hora após o término do TR	80,40 $\pm$ 0,70 ^{B,D}
B11 - 48 hora após o término do TR	76,69 $\pm$ 1,40 ^{A,E}

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha representam diferença entre os momentos ($p \leq 0,05$).

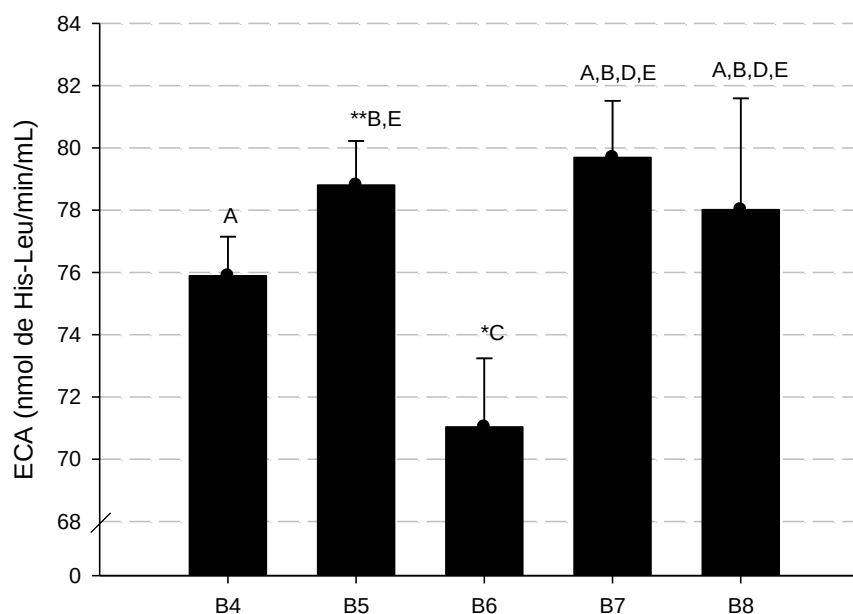


Figura 11. Médias e erro padrão da média da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos antes e nas paradas obrigatórias durante o teste de resistência. Jaboticabal, 2011. * Valores menores que B4 **Valores maiores que B4

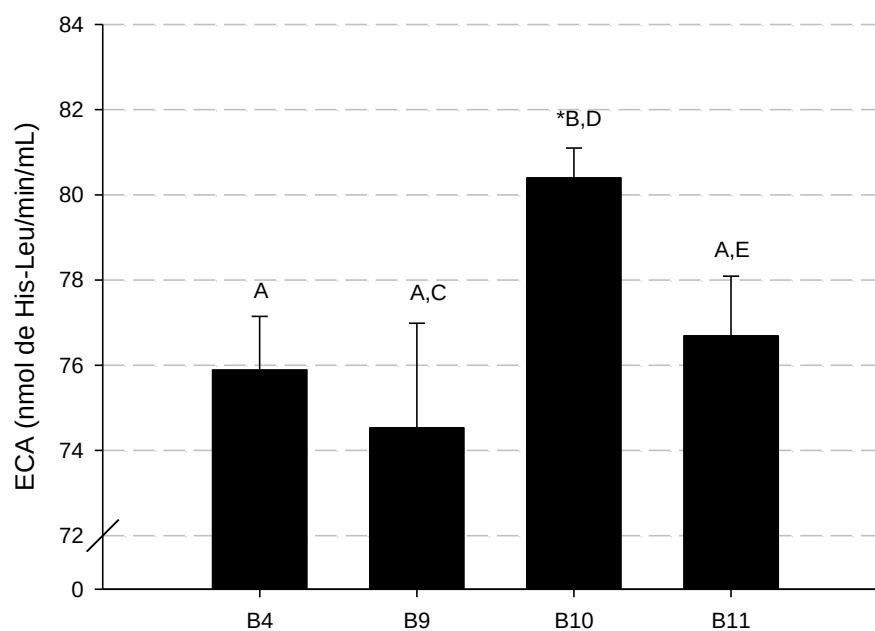


Figura 12. Médias e erro padrão da média da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina de equinos obtidos em antes e após o término do teste de resistência Jaboticabal, 2011. * Valores maiores que B4

V. DISCUSSÃO

Um número considerável de trabalhos tem sido realizado para determinar as bases genéticas do desempenho físico em humanos (GAYAGAY et al., 1998; WOODS et al., 1998; MONTGOMERY et al., 1999; MYERSON et al., 1999; TAYLOR et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2000; NAGASHIMA et al., 2000; ASHLEY et al., 2006; CAM et al., 2006; CERIT et al., 2006; THOMPSON et al., 2006; BAE et al., 2007). O polimorfismo em um dos genes que codifica a biossíntese da enzima conversora de angiotensina (ECA) tem sido implicado como responsável pela variabilidade da performance física de atletas, em diferentes modalidades esportivas (MONTGOMERY et al., 1998). Por outro lado, existem poucos trabalhos em humanos e ratos demonstrando o papel da ECA no exercício de alta intensidade ou curta duração (GAYAGAY et al., 1998; MONTGOMERY et al., 1998; MYERSON et al., 1999; CERIT et al., 2006). Em equinos, tais publicações são ainda mais escassas, havendo apenas um trabalho realizado com cavalos de enduro (DE MELLO COSTA et al., 2010) e outro desenvolvido com cavalos de raças mistas em treinamento (COSTA et al., 2011b). Este estudo é o primeiro a avaliar a concentração de ECA em cavalos submetidos a treinamento para participação em competições de enduro equestre e a mensurar a atividade da ECA antes e ao longo de um teste de resistência em equinos.

O principal resultado encontrado neste trabalho foi a redução da atividade plasmática da ECA em equinos da raça PSA no decorrer do treinamento. Este resultado divergiu de estudo realizado anteriormente, uma vez que foi demonstrado um aumento da atividade da ECA proporcional à intensidade do treinamento em equinos (COSTA et al., 2011b). Estes autores realizaram um trabalho mensurando a atividade plasmática da ECA, a cada quinze dias, em treze equinos de diferentes raças submetidos a dois protocolos diferentes de treinamento com duração de quinze semanas. O primeiro protocolo de treinamento, do grupo experimental E, era voltado para exercício de maior duração e menor velocidade, mimetizando um treinamento realizado para equinos

enduristas, e o outro, denominado grupo experimental S, se baseou em menor duração e maior velocidade, mimetizando o treinamento de cavalos de turfe.

Independente do protocolo de treinamento, em ambos os grupos E e S, houve aumento da atividade plasmática da ECA e os maiores valores foram encontrados no período de treinamento com a maior carga de trabalho instituída, aos 75 dias do início do treinamento. Assim que a fase de treinamento foi interrompida, a atividade da ECA diminuiu significativamente e 8 semanas após o fim do treinamento voltou aos valores encontrados antes do início do treinamento, sugerindo que o exercício tenha sido o principal fator que causou o aumento da atividade da Eca nestes indivíduos (COSTA et al., 2011b).

Os resultados encontrados no presente estudo foram diferentes dos relatados por COSTA et al (2011b). Acredita-se que uma das causas que resultou em tais diferenças foi o uso de diferentes raças para compor os grupos experimentais dos referidos estudos. Os animais aqui utilizados são atletas que participam de competições de enduro equestre, ou seja, são animais selecionados geneticamente garantindo maior resistência ao exercício, e os animais utilizados por aqueles autores eram de diferentes raças, não atletas.

Outra diferença marcante entre os dois estudos foi em relação ao tipo de treinamento utilizado. O estudo de COSTA et al. (2011b) apresentou 2 tipos diferentes de treinamento, o do grupo E (enduro) e o grupo S (velocista). O protocolo de treinamento para o grupo E consistiu em três a quatro sessões semanais de treinamento ao passo, trote e galope com duração máxima de 30 minutos, montados em pista de areia ou exercitados com auxílio de uma guia. No treinamento do grupo experimental deste trabalho, os equinos foram exercitados três vezes por semana divididos em duas sessões semanais de 60 minutos de duração, predominantemente ao passo e trote, e uma sessão semanal de 90 minutos de duração ao galope. A diferença nos tempos de duração de cada sessão de treinamento entre estes dois protocolos explicitados podem ter contribuído para as diferenças em relação a atividade

da ECA encontrados nestes dois estudos, visto que o segundo protocolo é mais adequado ao treinamento de equinos enduristas que o primeiro, pois aumenta o tempo de trabalho, sem necessariamente aumentar a carga de trabalho, a fim de promover adaptações musculares e cardiorrespiratórias para a resistência do animal ao exercício (EVANS, 2000).

Os valores plasmáticos de ECA, determinados neste trabalho, se aproximam daqueles relatados na literatura para animais da mesma espécie (TILLMAN & MOORE, 1989; COOMER et al., 2003). Porém, outro ponto importante a ser destacado é a metodologia utilizada para mensurar a atividade da ECA. Um estudo realizado com diferentes metodologias para mensurar a atividade plasmática da ECA demonstrou que não há linearidade entre os ensaios realizados e, portanto diferentes metodologias não podem ser comparadas quanto aos resultados obtidos (COSTA et al, 2011b).

No presente estudo a atividade da ECA foi determinada utilizando o hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu) como substrato e medida pela análise fluorimétrica para o dipeptídeo His-Leu formado, metodologia adaptada do protocolo descrito por FRIEDLAND & SILVERSTEIN (1976). No estudo realizado por COSTA et al. (2011a) a atividade da ECA foi mensurada pelo método cinético, espectrofotométrico, utilizando um kit comercial. Esta diferença entre as metodologias e, adicionalmente, as diferentes raças de equinos utilizados e os diferentes protocolos de treinamento podem constituir razões para resultados divergentes.

Há de se considerar que o treinamento promove adaptações em vários sistemas dentre os quais o cardiovascular (EVANS, 2000; POOLE & ERICKSON, 2008). Considerando-se que a ECA é responsável pela formação de ANG II com forte ação vasoconstrictora e que o treinamento está associado com a diminuição da pressão arterial (INAGAMI, 1994; WOODS et al., 2000; FRANCISCHETTI et al., 2005), pode-se inferir que uma das causas de diminuição de pressão arterial seja pela diminuição da atividade de ECA e que esta diminuição pode ser promovida pelo exercício. Equinos possuem capacidade de atingir pressão arterial sistêmica bem maiores que humanos e

assim há necessidade de mecanismos regulatórios estritos e com levemente diferentes dos que ocorrem em humanos (POOLE & ERICKSON, 2008). Corroborando este argumento, existe uma afecção de elevada ocorrência em equinos atletas, a hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE), que está associada à hipertensão (DONALDSON, 1991). Estudo realizado para investigar a correlação entre HPIE e/ou doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) em cavalos de turfe demonstrou que a atividade plasmática de ECA estava aumentada em cavalos com maior grau de HPIE (COSTA et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, este foi o primeiro estudo publicado, dentro do conhecimento dos autores, até a presente data, a mensurar a atividade da ECA antes e ao longo de um teste de resistência em equinos. Por esta razão, algumas das alterações aqui encontradas não permitem discussão mais profunda em virtude dos poucos trabalhos realizados para confrontação. DE MELLO COSTA et al. (2010) mensuraram a atividade da ECA e proteína total antes do início e ao término de uma prova de enduro de 80 km, realizada na Austrália, com 19 cavalos e não encontraram diferenças significativas entre os momentos analisados. Adicionalmente, foi relatado também que não houve diferença nos valores de proteína total antes e após o enduro, não havendo correlação entre a ECA e a proteína total, e adicionalmente a atividade plasmática da ECA com a classificação dos equinos que participaram do enduro. Esta ausência de relação pode ser atribuída, principalmente, ao tipo de metabolismo herdado nas diferentes espécies, onde os equinos possuem maior capacidade de acúmulo de lactato que humanos (POSO et al, 2008).

Neste trabalho, após completarem 50 km do teste, houve diminuição marcante de 6,4% na atividade da ECA em relação aos valores iniciais, fato que pode estar relacionada a uma tendência dos animais a desidratação, visto que a proteína total, embora não tenha apresentado diferença significativa na análise de variância, aumentou durante o teste e seu pico foi exatamente neste momento em que a atividade da ECA estava diminuía. Neste caso, a enzima não se comportou como esperado, pois quando a necessidade em manter a volemia sobrepõe a necessidade energética

demandada pelo exercício culmina no aumento da atividade plasmática da ECA, aumentando a conversão de angiotensina I em angiotensina II (REID et al., 1978), que promove aumento da pressão arterial por efeito vasoconstrictor e pelo aumento da liberação da aldosterona que irá gerar maior absorção de sódio e água pelos rins (WOODS et al., 2000). Diante do exposto, sugere-se que o exercício tenha promovido alterações na manutenção do equilíbrio da homeostasia e este comportamento da enzima seja compensatório a tais mudanças.

Neste contexto, foi relatado que a atividade de ECA é crucial para a boa regulação da bioenergética muscular e a manutenção da homeostase da glicose, pois ao catalisar a conversão de ANG I em ANG II ocorre vasoconstrição diminuindo o fluxo sanguíneo para a musculatura em exercício e diminuí a captação de glicose, o que é antagônico aos efeitos desejáveis em animais participantes de enduro. Ao mesmo tempo a ECA é responsável pela degradação de cininas que são responsáveis por mediar vasodilatação e melhorar a captação de glicose, logo se houver, durante exercício de resistência, diminuição da atividade de ECA, como ocorreu neste estudo, há melhora na irrigação do tecido muscular e melhora na captação de glicose, efeitos fortemente desejáveis ao indivíduo em exercício de resistência que utiliza predominantemente o metabolismo aeróbico para obter energia (DIETZE & HENRIKSEN, 2008).

Os resultados encontrados por DE MELLO COSTA et al. (2010) corroboram com aqueles aqui descritos em relação a proteína total e atividade da ECA. Embora estes autores tenham mencionado em seu trabalho que a atividade de ECA não depende da hidratação, visto que não encontraram alteração significativa nas mensurações de proteína total. No presente trabalho configurou-se relação inversa entre a ECA e a proteína total, sendo sugestivo que a ECA tenha sua atividade reduzida nos equinos que, ao longo da prova, apresentam algum grau de desidratação e hemoconcentração, em resposta ao aumento da viscosidade do sangue e aumento da resistência vascular periférica.

Menor atividade de ECA pode estar associada com melhores desempenhos em exercícios relacionados a resistência física, e WOODS et al. (2000), sugere que seja pela regulação local do SRA que pelo efeito central do mecanismo de regulação do SRA. Por esta razão mais estudos precisam ser efetuados para melhor elucidar os mecanismos regulatórios pelos quais a atividade da ECA se relaciona intimamente com exercícios de resistência, quando em menor atividade, e com exercícios de velocidade/força quando em maior atividade.

Os testes de esforço progressivo (TEP) realizados antes e após o período de treinamento foram extremamente importantes para caracterizar o efeito do treinamento no condicionamento físico dos equinos estudados. O ponto de inflexão da curva lactato X velocidade representa o ponto de desbalanceamento entre a produção de lactato e a sua remoção ou metabolização, e o começo de seu acúmulo no sangue e musculatura em exercício. Logo, antes desta inflexão há o predomínio do metabolismo aeróbico e após o metabolismo anaeróbio (EVASN, 2000; KRONFELD, 2000; CAMPBELL, 2011).

O uso arbitrário de valores de lactato entre 2 ou 4 mmol/L é constantemente utilizado por inúmeros autores para avaliação do efeito de treinamento. Lindner (2010) descobriu que a concentração de 1,5 mmol/L de lactato seria a melhor representação do limiar aeróbico-anaeróbico de lactato em cavalos. Neste trabalho, ao invés de utilizar tais valores, duas curvas lactato X velocidade foram feitas com as médias das concentrações de lactato obtidas em ambos os TEP para evidenciar o efeito de treinamento. No segundo TEP houve redução de mais de 50% na concentração de lactato ao se comparar com o TEP 1, onde nas maiores velocidades do teste (8, 9 e 10 m/s) os equinos utilizaram, predominantemente, as vias metabólicas aeróbias para obtenção de energia em detrimento das vias anaeróbias, confirmada pela diminuição da formação e acúmulo de lactato no sangue. Esse resultado corrobora com aqueles obtidos em trabalhos precedentes, onde o treinamento aumenta a capacidade aeróbica de equinos segundo diferentes modalidades de treinamento (EVANS, 2000;

KRONFELD et al., 2000; SERRANO et al., 2002; EVANS, 2008; LINDNER et al., 2009; CAMPBELL, 2001).

A média dos hematócritos dos equinos antes do início do TR foi de $43 \pm 2,0\%$ e ao ser comparada aos demais momentos do teste, observou-se aumento em todos eles de 10%. Esse aumento foi atribuído à contração esplênica ocasionada pela liberação de catecolaminas, que ocorre durante o exercício, e não foi considerada condição deletéria para os animais, pois é um acontecimento fisiológico para a espécie. Aumentos do hematócrito até 60-70% em equinos ocorrem durante exercícios máximos ou após administração intravenosa de altas doses de adrenalina e essa condição é considerada normal em resposta aos estímulos recebidos (MARLIN & NANKERVIS, 2002), não sendo o caso deste trabalho, uma vez que o exercício foi de média intensidade e longa duração.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta pesquisa é lícito afirmar que:

- 1- O exercício influencia a atividade plasmática da ECA em equinos;
- 2- O treinamento aeróbio diminui a atividade plasmática da ECA em equinos;
- 3- O protocolo de treinamento foi efetivo, condicionando os animais para o teste de resistência;
- 4- A mensuração da atividade da ECA se revelou uma ferramenta em potencial para auxiliar o monitoramento de estado de condicionamento físico de equinos;
- 5- Durante o teste de resistência houve relação inversa entre a ECA e a proteína total.

Contanto, este experimento deve ser analisado com cuidado e ser considerado como um estudo preliminar visto o pequeno tamanho da amostra. Estudos futuros são necessários com maior número de animais para clarificar a variação da atividade da ECA durante o período de treinamento e antes, durante e após exercício de resistência para melhor elucidar os exatos mecanismos pelos quais o SRA atua na regulação de pressão e metabolismo energético.

VII. REFERÊNCIAS*

ALVAREZ-AGUILAR, C. Association between angiotensin-1 converting enzyme gene polymorphism and the metabolic syndrome in a Mexican population. **Experimental and Molecular Medicine**, Gangnam-Gu, v. 39, n. 3, p. 327-334, 2007.

ÁLVAREZ, R.; REGUERO, J. R.; BATALLA, A.; IGLESIAS-CUBERO, G.; CORTINA, A.; ÁLVAREZ, V.; COTO, E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 375-379, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00179-5.

ÁLVAREZ, R.; TERRADOS, N.; ORTOLANO, R.; IGLESIAS-CUBERO, G.; REGUERO, J. R.; BATALLA, A.; CORTINA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ, C.; BRAGA, S.; ÁLVAREZ, V.; COTO, E. Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 82, n.1-2, p. 117-120, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1007/s004210050660.

BAE, J. S.; KANG, B. Y.; LEE, K. O.; LEE, S. T. Genetic variation in the renin-angiotensin system and response to endurance training. **Medical Principles and Practice**, Basel, v. 16, n. 2, p. 142-146, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI:10.1159/000098368.

BARBALIĆ, M.; SKARIC-JURIC, T.; CAMBIEN, F.; BARBAUX, S.; POIRIER, O.; TUREK, S.; VRHOVSKI-HEBRANG, D.; CUBRILO-TUREK, M.; RUDAN, I.; RUDAN, P.; NARANCIC, N. S. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system and early development of Hypertension. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 19, n. 2, p. 837-842, 2006.

* Redigidas conforme as normas ABNT-NBR-6023-Agosto, 2002.

BUTLER, R.; MORRIS, A. D.; BURCHELL, B.; STRUTHERS, A. D. DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. **Hypertension**, Dallas, v. 33, p. 1164-1168, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1161/01.HYP.33.5.1164.

CAM, S.; COLAKOGLU, M.; COLAKOGLU, S.; SEKURI, C.; BERDELI, A. ACE I/D gene polymorphism and aerobic endurance development in response to training in a non-elite female cohort. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**. Copenhagen, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2006.00590.x.

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

CERIT, M.; COLAKOGLU, M.; ERDOGAN, M.; BERDELI, A.; CAM, F. S. Relationship between ace genotype and short duration aerobic performance development. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 98, p. 461-465, 2006.

COOMER, R. P. C.; FORHEAD, A. J.; BATHE, A. P.; HEAD, M. J. Plasma angiotensin-converting enzyme (ACE) concentration in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 96-98, 2003.

COSTA, M. F. M.; CARMONA, A. K.; ALVES, M. F. M.; RYAN, T. M.; DAVIES, H. M.; ANDERSON, G. A.; SLOCOMBE, R. F. Determination of angiotensin I-converting enzyme activity in equine blood: lack of agreement between methods of analysis. **Journal of Veterinary Science**, Kwanak-Gu, v. 12, n. 1, p. 21-25, 2011a. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.4142/jvs.2011.12.1.21.

COSTA, M. F. M.; DAVIES, H. M.; ANDERSON, G. A.; SLOCOMBE, R. F. Effects of two training protocols on Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity in horses. **Equine**

Veterinary Journal, Oxford, v. 43, n. 4, p. 466-470, 2011b. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00320.x.

COSTA, M. F. M.; RONCHI, F. A.; IVANOW, A.; CARMONA, A. K.; CASARINI, D. SLOCOMBE, R. F. Association between circulating angiotensin-converting enzyme and exercise-induced pulmonar haemorrhage in Thoroughbred racehorses. **Research in Veterinary Science**, London, v. 93, n. 2, p. 993-994, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.10.011.

DE MELLO COSTA, M. F.; ANDERSON, G. A.; DAVIES, H. M.; EL-HAGE, C. M.; SLOCOMBE, R. F. Circulating angiotensin converting enzyme in endurance horses: effect of exercise on blood levels and its value is predicting performance. **Equine Veterinary Journal**, Oxford, v. 42, n. 38, p. 152-154, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00171.x.

DI MAURO, M.; IZZICUPO, P.; SANTARELLI, F.; FALONE, S.; PENNELLI, A.; AMICARELLI, F.; CALAFIORE, A. M.; BALDASSARRE, A.; GALLINA, S. ACE and AGTR1 polymorphisms and left ventricular hypertrophy in endurance athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Philadelphia, v. 42, n. 5, p. 915-21, 2010.

DIETZE, G. J.; HENRIKSEN, E. J. Review: angiotensin-converting enzyme in skeletal muscle: sentinel of blood pressure control and glucose homeostasis. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, Birmingham, v. 9, n. 2, p. 75-88, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.3317/jraas.2008.011.

DONALDSON, L. L. A review of the pathophysiology of exercise-induced pulmonary haemorrhage in the equine athlete. **Veterinary Research Communications**, Netherlands, v. 15, p. 211-226, 1991.

DZAU, V. J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation**, Dallas, v. 77, p. I-4 – I-12, 1988.

ELLIS, N.; TAMMEN, I.; NICHOLAS, F. W.; RAADSMA, H. W. Characterization of the equine angiotensin-converting enzyme (ACE) gene. In: 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2002, Montpellier. **Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**. Montpellier, P. 399 – 402, 2002.

EVANS, D. **Training and fitness in athletic horses. Report for the Rural Industries Research and Development Corporation**. Australia: RIRDC, 2000. p. 2-52.

EVANS, D. Exercise testing in the field. In: HINCHCLIFF, K.W.; GEOR, R.J.; KANEPS, A.J. **Equine Exercise Physiology**. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008. cap. 1, p. 12-27.

FÉDÉRATION EQUESTRE INTERNACIONALE (FEI) VETERINARY REGULATIONS. 12 ed. Suíça, 2010. p.20-30. Disponível em: http://www.horsesport.org/sites/default/files/DRAFTEIGHT2010Veterinary%20Regulations%2012th%20edition%20effective%201st%20January%202010%20_2_final_1.pdf

FRANCISCHETTI, E. A.; FRANCISCHETTI, A.; ABREU, V. G. A emergência de um novo modulador cardiovascular - a segunda enzima de conversão da Angiotensina 2 (ECA2). **Revista da SOCERJ**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 36 – 40, 2005.

FRAYN, K. N. Fat as a fuel: emerging understanding of the adipose tissue-skeletal muscle axis. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 199, p. 509-518, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1111/j.1716.2010.02128.x

GAYAGAY, G.; YU, B.; HAMBLY, B.; BOSTON, T.; HAHN, A.; CELERMAJER, D. S.; TRENT, R. J. Elite endurance athletes and the ACE I allele- the role of genes in athletic performance. **Human Genetics**, Berlin, v. 103, p. 48-50, 1998.

GOH, K. P.; CHEW, K.; KOH, A.; GUAN, M.; WONG, Y. S.; SUM, C. F. The relationship between ACE gene ID polymorphism and aerobic capacity in Asian rugby players. **Singapore Medical Journal**, Singapore, v. 50, n. 10, p. 997-1003, 2009.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GONZÁLEZ, A. J.; HERNÁNDEZ, D.; DE VERA, A.; BARRIOS, Y.; SALIDO, E.; TORRES, A.; TERRADOS, N. ACE gene polymorphism and erythropoietin in endurance athletes at moderate altitudes. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 688-693, 2006.

HARGREAVES, B.J.; KRONFELD, D.S.; NAYLOR, J.R.J. Ambient temperature and relative humidity influenced packed cell volume, total plasma protein and other variables in horses during an incremental submaximal field exercise test. **Equine Veterinary Journal**, Oxford, v. 31, p. 314-318, 1999.

HESS, T. M.; KRONFELD, D.S.; CARTER, R. A.; TREIBER, K. H.; BYRD, B. M.; STANIAR, W. B.; SMITH, L. T.; GAY, L. A.; HARRIS, P. A. Does usefulness of potassium supplementation depend on speed? **Equine Veterinary Journal**, Oxford, v. 36, p. 74-79, 2006.

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

INAGAMI, T. The renin-angiotensin system. **Essays in Biochemistry**, London, v. 28, p. 147-164, 1994.

IMAI, Y.; KUBA, K.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 14, p. 1824 – 1840, 2007.

JONSSON, J. R.; GAME, P. A.; HEAD, R. J.; FREWIN, D. B. The expression and localization of the angiotensin-converting enzyme mRNA in human adipose tissue. **Blood Pressure**, Oslo, v. 3, p. 72-75, 1994.

KANEKO, J. J. Carbohydrate metabolism and its disease. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L.. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6.ed. Burlington: Elsevier, 2008. cap. 3, p. 45- 80.

KRONFELD, D. S.; CUSTALOW, E.; FERRANTE, P. L.; TAYLOR, L. E.; MOLL, D.; MEACHAM, T. N.; TIEGS, W. Determination of the lactate breakpoint during incremental exercise in horses adapted to dietary corn oil. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 61, n. 2, p. 144-151, 2000.

KRONFELD, D. S. Body fluids and exercise: replacement strategies. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 21, p. 368-375. 2001.

LEEB, T.; VOGL, C.; ZHU, B.; JONG, P. J.; BINNS, M. M.; CHOWDHARY, B. P.; SCHARFE, M.; JAREK, M.; NORDSIEK, G.; SCHRADER, F.; BLOCKER, H. A human-horse comparative map based on equine BAC end sequences. **Genomics**, San Diego, v. 87, p. 772-776, 2006.

LENTZ, T.; NADANSKY, M.; GOSSMANN, J.; OREMEK, G.; GEIGER, H. Exhaustive exercise-induced tissue hypoxia does not change endothelin and big endothelin plasma levels in normal volunteers. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 11, p. 1028-1031, 1998.

LIM, S. C.; KOH, A. F. Y.; GOH, S. K.; CHUA, C. L.; HENG, B. L.; SUBRAMANIAM, T.; SUM C. F. Angiotensin receptor antagonist vs. angiotensin-converting enzyme inhibitor in Asian subjects with type 2 diabetes and albuminuria - a randomized crossover study. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Oxford, v. 9, p. 477-482, 2007.

LINDNER, A.; MOSEN, H.; KISSENBECK, S.; FUHRMANN, H.; SALLMANN, H. P. Effect of blood lactate-guided conditioning of horses with exercises of differing durations and intensities on heart rate and biochemical blood variables. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 3211-3217, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.2527/jas.2009-2001.

LINDNER, A. E. Maximal lactate steady state during exercise in blood of horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, p. 2038-2044, 2010.

MARLIN, D.; NANKERVIS, K. Energetics of exercise. In: _____. **Equine Exercise Physiology**. Oxford: Blackwell, 2002. Cap.I, p. 7-21.

McKEEVER, K. H. Body fluids and electrolytes: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K.W.; GEOR, R.J. e KANEPS, A.J. **Equine Exercise Physiology**. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008. cap. 6, p. 328- 349.

MONTGOMERY, H.; MARSHALL, R.; MYERSON, S.; CLARKSON, P.; DOLLERY, C.; HAYNARD, M.; HOLLIMAN, D. E.; JUBB, M.; WORLD, M.; THOMAS, E. L.; BRYNES, A. E.; SAEED, N.; BANARD, M.; DELL, J. D.; PRASAD, K.; RAYSON, M.; TALMUD, P.J. HUMPHRIES, S. E. Human gene for physical performance. **Nature**, cidade, v. 343, p. 221-222, 1998.

MONTGOMERY, H.; CLARKSON, P.; BARNARD, M.; BELL, J.; BRYNES, A.; DOLLERY, J.; HAJNAL, J.; HEMINGWAY, H.; MERCER, D.; JARMAN, P.; MARSHALL, R.; PRASAD, K.; RAYSON, M.; SAEED, N.; TALMUD, P.; THOMAS, L.; JUBB, M.; WORLD, M.; HUMPHRIES, S. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training. **The Lancet**, London, v. 353, p. 541-545, 1999.

MYERSON, S.; HEMINGWAY, H.; BUDGET, R.; MARTIN, J.; HUMPHRIES, S.; MONTGOMERY, H.; MUTCH, M.; McGLOIN, H. Human angiotensin I - converting enzyme gene and endurance performance. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 87, n. 4, p. 1313-1316, 1999.

NAGAI, S.; TAKEUCHI, M.; MORITA, K.; MIKUNIYA, T.; SATAKE, N.; MIO, T.; IZUMI, T. Angiotensin II receptor on BALF macrophages from Japanese patients with active sarcoidosis. **Sarcoidosis, Vasculitis and Diffuse Lung Diseases**, Milano, v. 16, p. 67-74, 1999.

NAGASHIMA, J.; MUSHI, H.; TAKADA, H.; AWAYA, T.; OBA, H.; MORI, N.; OHMIYA, K.; NOBUOKA, S.; MURAYAMA, M. Influence of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on development of athlete's heart. **Clinical Cardiology**, New York, v. 23, n. 8, p. 621- 624, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Horses**. Washington, 10p., 2007.

NG., P. **Angiotensin converting enzyme and vascular endothelial growth factor responses to exercise training in claudicants: the role of ace inhibition**. 2009. Tese de doutorado em medicina - Royal Free and University College Hospital Medical School, University College London, London, 2009. Disponível em: <http://eprints.ucl.ac.uk/18570/1/18570.pdf>. Acesso em: 05 jul.2012.

PARSONS, K. K.; COFFMAN, T. M. The renin-angiotensin system: it's all in your head. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 117, n. 4, p. 873 – 874, 2007.

POOLE, D. C.; ERICKSON, H. H. Cardiovascular function and oxygen transport: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J.; KANEPS, A. J. **Equine Exercise Physiology**. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008. cap. 4, p. 212-245.

POSO, A. R.; HYYPPA, S.; GEOR, R. J. Metabolic responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J.; KANEPS, A. J. **Equine Exercise Physiology**. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008. cap. 5, p. 248-273.

REID, I. A.; MORRIS, B. J.; GANONG, W. F. The renin-angiotensin system. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 40, p. 377-410, 1978. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1146/annurev.ph.40.030178.002113.

RIVEIRO, J. L. L.; PIERCY, R. J. Muscle physiology: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J.; KANEPS, A. J. **Equine Exercise Physiology**. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008. cap. 2, p. 30- 80.

ROSENFELD, G. Etilenodiamina tetracética dissódico (EDTA) como anticoagulante para técnica hematológica. **Revista Clínica São Paulo**, São Paulo, n. 31, p. 65-71, 1955.

RYAN, J. W.; CHUNG, A.; AMMONS, C.; CARLTON, M. L. A simple radioassay for angiotensin-converting enzyme. **Biochemistry Journal**, v. 167, p. 501 – 504, 1977.

SAMANI, N. J.; THOMPSON, J. R.; O'TOOLE, L.; CHANNER, K.; WOODS, K. L. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. **Circulation**, v. 94, n. 4, p. 708-712, 1996.

SERRANO, M. G.; EVANS, D. L.; HODGSON, J. L. Heart rate and blood lactate responses during exercise in preparation for eventing competition. **Equine Veterinary Journal**, Oxford, v. 34, p. 135-139, 2002.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS User's guide: Statistics. Cary, 2002.

TAYLOR, F.G.R.; HILLYER, M.H. **Diagnostic Techniques in Equine Medicine**. London: WB Saunders, 1997, p. 348.

TAYLOR, R. R.; MAMOTTE, C. D. S.; FALLON, K.; BOCKXMEER, F. M. V. Elite athletes and the gene for angiotensin-converting enzyme. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 87, n. 3, p. 1035-1037, 1999.

THOMPSON, T. P. D.; TSONGALIS, G. J.; ORDOVAS, J. M.; SEIP, R. L.; BIBLIE, C.; MILES, M.; ZOELLER, R.; VISICH, P.; GORDON, P.; ANGELOPOULOS, T. J.; PESCATELLO, L.; MOYNA, N. Angiotensin-converting enzyme genotype and adherence to aerobic exercise training. **Preventive Cardiology**, Malden, v. 9, p. 21-24, 2006.

TILLMAN, L.; MOORE, J. Serum Angiotensin converting enzyme activity and response to angiotensin I in horses. **Equine Veterinary Journal Supplement**, Oxford, v. 7, p. 80-83, 1989.

TOBINA, T.; MICHISHITA, R.; YAMASAWA, F.; ZHANG, B.; SASAKI, H.; TANAKA, H.; SAKU, K.; KIYONAGA, A. Association between the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endurance running speed in Japanese runners. **The Journal of Physiological Science**, Tokio, v. 60, n. 5, p. 325-330, 2010.

TOZAKI, T.; HIROTA, K.; HASEGAWA, T.; TOMITA, M.; KUROSAWA, M. Prospects for whole genome linkage disequilibrium mapping in thoroughbreds. **Gene**, Amsterdam, v. 346, p. 127-132, 2005.

WOODS, D. R.; HUMPHRIES, S. E.; MONTGOMERY, H. E. The ACE I/D polymorphism and human physical performance. **TEM**, v. 11, n. 10, p. 416-420, 2000.

YAMAGISHI, K., TANIGAWA, T.; CUI, R.; TABATA, M.; IKEDA, A.; YAO, M.; SHIMAMOTO, T.; ISO, H. High sodium intake strengthens the association of ACE I/D polymorphism with blood pressure in a community. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 20, p. 751-757, 2007.

YANG, H.-Y. T.; NEFF, N. H. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. **Journal of Neurochemistry**, Bognor Regis, v. 19, n. 10, p. 2443-2450, 1972. Disponível em: <http://dx.doi.org>. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1972.tb01298.x.