

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO DE CURTA DURAÇÃO E
ALTA INTENSIDADE SOBRE A EXPRESSÃO TEMPORAL
DO mRNA DE LEUCÓCITOS DE EQUINOS**

**Araçatuba
2020**

LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO DE CURTA DURAÇÃO E
ALTA INTENSIDADE SOBRE A EXPRESSÃO TEMPORAL
DO mRNA DE LEUCÓCITOS DE EQUINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a Associada Juliana Regina Peiró
Coorientador: Prof.^o Associado Márcio Carvalho da Costa

**ARAÇATUBA
2020**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B476i Bentin, Leonardo Aparecido Teixeira.
Influência do exercício de curta duração e alta intensidade sobre a expressão temporal do mRNA de leucócitos de equinos / Leonardo Aparecido Teixeira Bentin. - Araçatuba, 2020
56 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Orientadora: Profa. Juliana Regina Peiró
Coorientador: Prof. Márcio Carvalho Costa

1. Equino 2. Transcriptoma 3. Exercício 4. Expressão gênica 5. Sequenciamento I. T.

CDD 636.0896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Influência do exercício de curta duração e alta intensidade sobre a expressão temporal do
mRNA de leucócitos de equinos

AUTOR: LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN
ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ
COORDENADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA
ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/Unesp

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/Unesp

Prof. Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO

Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Araçatuba, 30 de março de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Influência do exercício de curta duração e alta intensidade sobre a expressão temporal do mRNA de leucócitos de equinos

AUTOR: LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN
ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ
COORIENTADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI
Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Araçatuba, 30 de março de 2020.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Influência do exercício de curta duração e alta intensidade sobre a expressão temporal do
mRNA de leucócitos de equinos

AUTOR: LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

COORIENTADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO

Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Araçatuba, 30 de março de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Influência do exercício de curta duração e alta intensidade sobre a expressão temporal do
mRNA de leucócitos de equinos

AUTOR: LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

COORIENTADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA
ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/Unesp

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO

Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Araçatuba, 30 de março de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Influência do exercício de curta duração e alta intensidade sobre a expressão temporal do
mRNA de leucócitos de equinos

AUTOR: LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN
ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ
COORDENADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. DIOGO GAUBEUR DE CAMARGO
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI
Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Araçatuba, 30 de março de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra em primeiro lugar a Deus, por me guiar em todos os momentos da minha vida e abençoar-me com saúde, força e coragem para não desistir diante das dificuldades do caminho.

A minha esposa Andressa e meu filho João Pedro pela paciência e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis desta caminhada.

Ao meus pais, pelo incentivo educação, tenho muito orgulho de vocês.

Ao meu amigo Diogo Gaubeur de Camargo por me apresentar a minha orientadora, obrigado “irmão”.

“In memoriam” de Joannes Wilhelmmus Braen, pela oportunidade, ensinamentos e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por me guiar nesta estrada tortuosa me guiando pelo caminho certo.

Ao professor Fernando Cristiano Morelli, pelas aventuras e ensinamentos durante as coletas das amostras.

Às professoras Flávia de Almeida Lucas e Flávia Lombardi Lopes pela valorosa contribuição neste projeto.

À Daniela Scantamburlo Denadai e a Priscila Dalmagro pela paciência e apoio durante todos esses anos.

À toda equipe do laboratório EpiLab pelo incentivo e amizade.

Aos professores do programa de pós-graduação da FMVA pelas disciplinas ministradas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da FMVA-UNESP, na pessoa de sua Coordenadora, por toda a minha formação e pelos valiosos conhecimentos adquiridos graças ao corpo docente dedicado e extremamente competente.

À Capes, pela oportunidade da realização do intercâmbio com a Universidade de Montreal.

À Université de Montréal - FMV em Saint-Hyacinthé / Québec - Canadá por ter me recebido e dado toda liberdade de adquirir conhecimentos.

A Sophie Biledau e Sara Gu secretarias responsáveis pelos alunos de intercâmbio da FMV em Saint-Hyacinthé – Université de Montréal, pela paciência e disposição para resolver todos os problemas relacionado ao intercâmbio.

Aos muitos amigos que ficaram no Canadá, obrigados pelos momentos de ensinamentos e alegria vividos.

Agradeço aos funcionários da biblioteca do campus de Araçatuba por sempre serem muito prestativos e solícitos.

Ao meu Coorientador Professor Associado Marcio Carvalho Costa e sua família por ter me recebido, pela oportunidade e ensinamentos.

A minha Orientadora Professora Associada Juliana Regina Peiró, pela oportunidade e ensinamentos, durante esses anos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.
Cora Carolina

Bentin, L.A.T. **Influência do exercício de curta duração e alta intensidade sobre a expressão temporal do mRNA de leucócitos de equinos**. 2020. 56f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

A “indústria do cavalo” no Brasil movimenta bilhões de reais anualmente e é responsável por 3 milhões de postos de trabalho. O rebanho nacional supera 5 milhões de animais, sendo a raça Quarto de Milha a terceira em número de equinos e uma das que predomina nas atividades esportivas, demonstrando a importância da raça no país. Devido à importância do tema tanto na medicina quanto na fisiologia do exercício, muitos estudos têm focado sobre os efeitos do exercício nos leucócitos do sangue periférico e à recente introdução da técnica de microarranjo incrementou muito as pesquisas. Para avaliar o efeito do exercício será realizado um teste de esforço, onde os animais fizeram o aquecimento e uma sessão de exercício que mimetize a competição, seguido de desaquecimento. As colheitas das amostras de sangue aconteceram no momento uma hora antes do treino e no momento 4 horas após o treino de esforço. Para identificar os genes diferencialmente expressos a partir do microarranjo, utilizou-se o software Transcriptome Analysis Console (TAC). Assim para identificar os genes inflamatórios diferencialmente expressos a partir do TruSeq® Targeted RNA expression, foi realizada usando o aplicativo TruSeq Targeted RNA v1.1 no BaseSpace. Os perfis transcriptômicos em leucócitos isolados do sangue antes e após o treino de esforço foram identificados e os genes diferencialmente expressos estão relacionados ao processo inflamatório, estrutura muscular e proteção óssea e articular.

Palavras chaves: Equino. Transcriptoma. Exercício. Expressão Gênica. Sequenciamento.

Bentin, L.A.T. **Influence of short duration and high intensity exercise on temporal expression of equine leukocyte mRNA**. 2020. 56f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The “horse industry” in Brazil moves billions of reais annually and is responsible for 3 million jobs. The national herd exceeds 5 million animals, with the Quarter Horse breed being the third in number of horses and one that predominates in sports activities, demonstrating the importance of the breed in country. Due your importance of the topic in both medicine and exercise physiology, many studies have focused on effects of exercise, on peripheral blood leukocytes and the recent introduction of the microarray technique has greatly increased research. To assess the effect of exercise, an exercise test will be performed, where the animals will warm up and an exercise session that mimics the competition, followed by a cool-down. The blood samples were collected at time one hour before training and at time 4 hours after exercise training. To identify the differentially expressed genes from the microarray, Transcriptome Analysis Console (TAC) software was used. Thus, to identify the inflammatory genes differentially expressed from TruSeq® Targeted RNA expression, it was performed using TruSeq Targeted RNA v1.1 application in BaseSpace. Transcriptomic profiles in leukocytes isolated from blood before and after exercise training were identified and differentially expressed genes are related to inflammatory process, muscle structure and bone and joint protection.

Keywords: Equine. Transcriptome. Exercise. Gene Expression. Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração do percurso da prova dos 3 tambores	22
Figura 2- Representação dos treinos de esforços 1 e 2, mensuração da frequência cardíaca e tempo de prova além da colheita de sangue periférico no início do treinamento e após 5 meses de treinamento respectivamente	26
Figura 3- Sumarização dos resultados realizado pelo programa Transcriptome Analysis Console e Volcano Plot ilustrando genes diferencialmente expressos, (A) 4 horas após o término do TE em relação ao momento Basal (-1 hora do início do TE) no TE1 e (B) horas após o término do TE em relação ao momento Basal (-1 hora do início do TE) no TE2. O eixo x representa o $\log^2$ (razão) onde a relação é a proporção das médias de intensidade dos tratamentos sob o controle. O eixo y representa $-\log^{10}$ (p-valor) onde $p < 0,05$ é o valor associado ao teste estatístico ANOVA aplicado na comparação entre os grupos. Os pontos coloridos mostram os genes considerados <i>up-regulados</i> (cor vermelha) ou <i>down-regulados</i> (cor verde), enquanto que os genes não regulados são exibidos como pontos na cor cinza ($FDR < 0,05$, $fold\ change \pm 1,5$)	31
Figura 4 - Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos da comparação entre os treinamentos de esforços 1 e 2 no momento Basal	33
Figura 5 - Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos da comparação entre os treinamentos de esforços 1 e 2 no momento 4	34
Figura 6 - Mapa de calor comparando os genes diferencialmente expressos (M4 vs Basal) em leucócitos de equinos quarto de milha submetidos ao exercício de	

alta intensidade no TE1. Intensidade da cor indica níveis de expressão (cor verde *down*-regulado e cor vermelha *up*-regulado em M4). A semelhança entre indivíduos com armazenamento em cluster hierárquico pode ser vista acima e a esquerda do mapa de calor 35

Figura 7- Mapa de calor comparando os genes diferencialmente expressos (M4 vs Basal) em leucócitos de equinos quarto de milha submetidos ao exercício de alta intensidade no TE1. Intensidade da cor indica níveis de expressão (cor verde *down*-regulado e cor vermelha *up*-regulado em M4). A semelhança entre indivíduos com armazenamento em cluster hierárquico pode ser vista acima e a esquerda do mapa de calor. 36

Figura 8- Via de Regulation of toll-like receptor signaling Pathway no TE1. As estrelas vermelhas indicam os genes com diferenças significativas e diferencialmente expressos identificados no microarranjo. Sem marcação com estrelas representam os genes conhecidos na via e sem identificação na análise transcriptômica. 37

Figura 9- Via Cardiac Progenitor Differentiation no TE2. As estrelas vermelhas indicam os genes com diferenças significativas e diferencialmente expressos *up*-regulados e a estrela verde indica o gene *down*-regulado identificados no microarranjo. Sem marcação com estrelas representam os genes conhecidos na via e sem identificação na análise transcriptômica. 38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Frequências cardíacas (batimentos/minuto) máxima (FCmáx) e mínima (FCmín) e tempo de prova (segundos) desenvolvidos durante o percurso da prova de 3 tambores em dois testes de esforço (TE) físico. Os dados representam a média $\pm$ desvio-padrão 29
- Tabela 2 - Lista de genes diferencialmente expressos *up*-regulados e *down*-regulados em M4 do TE1, com seus respectivos *fold change* representados nas cores vermelha (*fold change* positivo) e na cor azul (*fold change* negativo) e o *fold change* do contraste em TE2..... 32
- Tabela 3 - Lista de genes diferencialmente expressos *up*-regulados e *down*-regulados em M4 do TE1, com seus respectivos *fold change*, e o *fold change* do contraste em TE1 34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 O Cavalo	21
2.2 Raça Quarto de Milha e seu uso nas Práticas Esportivas.....	21
2.3 Prova dos 3 Tambores.....	22
2.4 Fisiologia do Exercício associado ao Cavalo.....	22
2.4 Tecnologia de Microarranjo	23
3 OBJETIVOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Animais e o Centro de Treinamento Esportivo	25
4.2 Teste de Esforço, Coleta das Amostras e Monitoração via Sistema de Posicionamento Global	25
4.3 Isolamento de leucócitos para obtenção de RNA total	25
4.4 Isolando e Concentrando o RNA total	26
4.5 Microarranjo para Análise Transcriptômica	26
4.6 Avaliação do Perfil Inflamatório Através do Sequenciamento de Nova Geração	27
4.7 Identificação de Genes Diferencialmente Expressos no Microarranjo e Sequenciamento de Próxima Geração	27
4.8 Análise funcional de enriquecimento de conjuntos de genes diferencialmente expressos através da ferramenta Enrichr	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Análise do Tempo de Prova e Mensuração da Frequência Cardíaca através do Sistema de Posicionamento Global	29

5.2 Perfil de Expressão Gênica Via Análise do Microarranjo	29
5.3 Análise do Perfil Inflamatório	30
5.4 Enriquecimento Funcional e Classificação Funcional.....	30
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	52

1 INTRODUÇÃO

A “indústria do cavalo” no Brasil movimenta bilhões de reais anualmente e é responsável por 3 milhões de postos de trabalho. O rebanho nacional supera 5 milhões de animais, sendo a raça Quarto de Milha (QM) a terceira em número de equinos e uma das que predomina nas atividades esportivas, demonstrando a importância da raça no país (ROBERTO ARRUDA DE SOUZA LIMA, 2016).

A rápida aceleração do QM e o fato de ser a raça mais veloz em curtas distâncias (NIELSEN, B. D. *et al.*, 2006) o torna superior em provas de curta duração. Na prova de Três Tambores os melhores animais geralmente finalizam o percurso em cerca de 18 segundos, tempo suficiente para induzir aumento substancial na lactatemia, com queda do pH e das concentrações de bicarbonato no sangue (SILVA *et al.*, 2013). Embora as respostas metabólicas e adaptações ao exercício tenham sido bem documentadas, os mecanismos celulares e moleculares ainda não são completamente conhecidos (BAGGISH *et al.*, 2011). Tanto em humanos quanto em equinos, sessões curtas de exercício de alta intensidade induzem aumento substancial de leucócitos na circulação (BARREY *et al.*, 2006; CAPPELLI *et al.*, 2007, 2009; FEHRENBACH, 2007; NIELSEN, HENNING BAY, 2003; SHEPHARD, 2003), desempenhando papel na reparação tecidual, crescimento muscular e outros processos-chave no organismo (SABROE; WHYTE, 2007).

Devido à importância do tema tanto na medicina quanto na fisiologia do exercício, muitos estudos têm focado sobre os efeitos do exercício sobre expressão dos receptores de citocinas, apoptose e o controle da proliferação celular (BÜTTNER *et al.*, 2007; CONNOLLY *et al.*, 2004; FEHRENBACH, 2007; ZIEKER *et al.*, 2005) nos leucócitos do sangue periférico com a utilização da técnica de microarranjo. Por analisar milhares de expressões de genes simultaneamente, esta tecnologia desempenha um papel importante na elaboração de conclusões biológicas úteis (SHAO *et al.*, 2015), na identificação de novas funções para moléculas conhecidas (PEDERSEN, LINE *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2015) ou novos receptores (ZUCHERO *et al.*, 2016), no melhor entendimento dos diferentes tipos de neoplasias (RUSSO; ZEGAR; GIORDANO, 2003), no estudo dos microrganismos (EVERETT *et al.*, 2010) e seus mecanismos de resistência (BRAZAS; HANCOCK, 2005), dentre tantas outras possibilidades.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Cavalo

Antes do desenvolvimento das armas de fogo, o cavalo era crucial para a guerra e antes da invenção do motor a vapor, era a forma mais rápida e confiável de transporte terrestre. Hoje sua importância dificilmente diminuiu em partes da América do Sul, Ásia, África e Europa Oriental, e mesmo em outros lugares, é de grande importância econômica para as indústrias de esporte e lazer (LEVINE, 2005; OUTRAM *et al.*, 2009). Nenhum outro animal doméstico desempenhou papel tão direto no desenvolvimento social e político da humanidade como o cavalo, embora no início de sua domesticação tenham sido utilizados como fonte de matéria prima e alimentos, ao longo da história foram amplamente empregados como meio de transporte e no progresso agrícola (PEREIRA *et al.*, 2015). No século XX, com o desenvolvimento tecnológico das mais diversas áreas, grande parte do seu uso prático chegou ao fim, ficando restrito às regiões com baixo índice de desenvolvimento econômico. Contudo, os seres humanos mantiveram estreita relação com estes animais, criando-os para a prática de esportes, recreação, ou simplesmente por sua beleza física (ALDRIDGE, 2000; PEREIRA *et al.*, 2015). No Brasil o rebanho nacional supera 5 milhões de animais, sendo a raça QM a terceira em número de equinos registrados (LIMA, 2016).

2.2 Raça Quarto de Milha e seu uso nas Práticas Esportivas

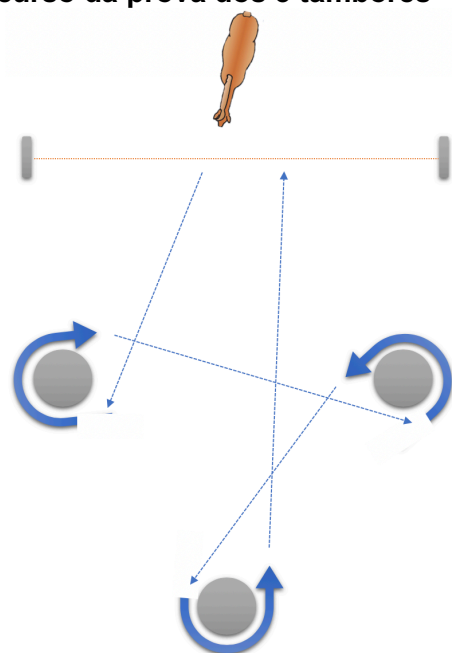
A primeira raça de equinos que se desenvolveu na América foi a Quarto de Milha, iniciando-se nos Estados Unidos por volta do ano de 1600 (VULCANO *et al.*, 2006). A raça se caracteriza por extrema docilidade, partida rápida, parada brusca, grande capacidade em alternar a direção e enorme habilidade de girar sobre si mesmo e considerada a mais versátil do mundo, é utilizada em várias modalidades de trabalho e corrida, sendo o cavalo completo segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha – ABQM (CORRÊA; DA MOTA, 2007; VILLELA; MOTA; OLIVEIRA, 2002; VULCANO *et al.*, 2006). Como já descrito anteriormente os cavalos da raça Quarto de Milha são conhecidos por sua grande versatilidade, podendo ser utilizados em modalidades equestres de competição, como corridas em curtas

distâncias, tambor, baliza, vaquejada, polo e provas de rodeio em geral (CAPELLETO; ANGELI; GRAFF, 2017; CORRÊA; DA MOTA, 2007).

2.3 Prova dos 3 Tambores

As exigências por níveis extremos de desempenho atlético por parte da espécie equina crescem cada vez mais, devido à cultura do esporte juntamente à valorização econômica de animais de alto desempenho esportivo (RODRIGUES; SPINDOLA; BOTTEON, 2016). A Prova dos Três Tambores é uma modalidade esportiva na qual o conjunto (cavalo e cavaleiro) deve executar um circuito onde três tambores são dispostos nos ápices de um triângulo. O percurso se inicia de 13 a 18 metros de distância do primeiro tambor, localizado à direita da base do triângulo e, consiste em realizar uma volta completa em torno de cada tambor, retornando em linha reta até o ponto de partida no menor tempo e sem faltas (STRICKLIN, 1998) conforme ilustração na Figura 1.

Figura 1- Ilustração do percurso da prova dos 3 tambores



2.4 Fisiologia do Exercício associado ao Cavalo

A capacidade atlética dos cavalos é atribuída a adaptações fisiológicas, essa capacidade é atribuível à sua alta capacidade aeróbica, grandes reservas intramusculares de substratos energéticos e em particular glicogênio, alto volume

mitocondrial no músculo, a capacidade de aumentar o transporte de oxigênio no sangue no início do exercício através de contração esplênica, eficiência da marcha e eficiência termorregulação (HINCHCLIFF; GEOR, 2008).

A cadeia de transporte de oxigênio, do ar para o músculo, dos cavalos é adequada para o transporte de grandes volumes de oxigênio necessários para suportar a alta taxa metabólica do exercício intenso de cavalos (PERSSON, 1967). A grande capacidade aeróbica em cavalos está associada a vários fatores, incluindo um débito cardíaco máximo maior e uma concentração mais alta de hemoglobina (JONES *et al.*, 1989). O débito cardíaco é o produto da frequência cardíaca e do volume sistólico, e é o débito cardíaco que determina a entrega de sangue, e, portanto, oxigênio, ao tecido (CONSTANTINOPOL *et al.*, 1989). Altas taxas de aeróbica no metabolismo muscular de cavalos são favorecidos pela alta densidade capilar no músculo, favorecendo o oxigênio entrega e alta atividade de enzimas envolvidas na utilização de energia no músculo (JONES *et al.*, 1989; POOLE; ERICKSON, 2008).

O treinamento prepara o atleta equino para a competição, induzindo as adaptações fisiológicas necessárias para realizar um alto nível com risco mínimo de lesão e fornecendo os fatores comportamentais e psicológicos apropriados, essenciais para uma competição efetiva e para preparar um cavalo adequadamente para a competição, o cavalo deve executar regularmente o tipo de atividade que realizará na competição em uma intensidade que induza as mudanças fisiológicas necessárias para permitir o desempenho ideal (HINCHCLIFF; GEOR, 2008).

2.4 Tecnologia de Microarranjo

O desenvolvimento da tecnologia de microarranjos está intimamente ligada à transição da biologia molecular de sua fase clássica para a era pós-genômica, esta tecnologia promete não apenas acelerar drasticamente o trabalho experimental da biologia molecular, mas também possibilitar uma abordagem experimental totalmente nova (BLOHM; GUISEPPI-ELIE, 2001). Em vez de investigar a complexidade dos efeitos biológicos analisando genes únicos de suposta importância, um após o outro, muito ou mesmo todos os genes de um organismo podem agora ser testados de uma só vez (EPSTEIN; BUTOW, 2000). A tecnologia de microarray liderou os estudos das funções biológicas individuais de alguns genes, proteínas, caminhos para investigações mais globais da atividade celular (HOHEISEL, 2006).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do treinamento em cavalos quarto de milha no exercício de alta intensidade e curta duração por meio da resposta transcriptômica de leucócitos circulantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e o Centro de Treinamento Esportivo

Foram utilizados 3 equinos da raça Quarto de Milha, estes animais apresentavam hígidos, livre de lesões ou qualquer enfermidade, pesando entre 330 kg a 470 kg, de ambos os sexos, todos estavam sob a mesma condição de manejo e alimentação durante todo o experimento. Os treinamentos ocorriam 3 vezes na semana em um reconhecido centro de treinamento para modalidade esportiva três tambores no interior do Estado de São Paulo. O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

4.2 Teste de Esforço, Coleta das Amostras e Monitoração via Sistema de Posicionamento Global

Para avaliar o efeito do exercício foi realizado um teste de esforço (TE), onde os animais fizeram o aquecimento por 20 minutos e uma sessão de exercício que mimetizou a competição, ao mesmo tempo foi monitorado a frequência cardíaca mínima e máxima o tempo de prova através do sistema de posicionamento global para equinos (RS800CX-G3, Polar Electro, Lake Success, NY, USA) seguido de desaquecimento de 10 minutos. Os dados obtidos pelo G.P.S. foram analisados usando o aplicativo KER ClockIt Sport (Kentucky Equine Research, USA),

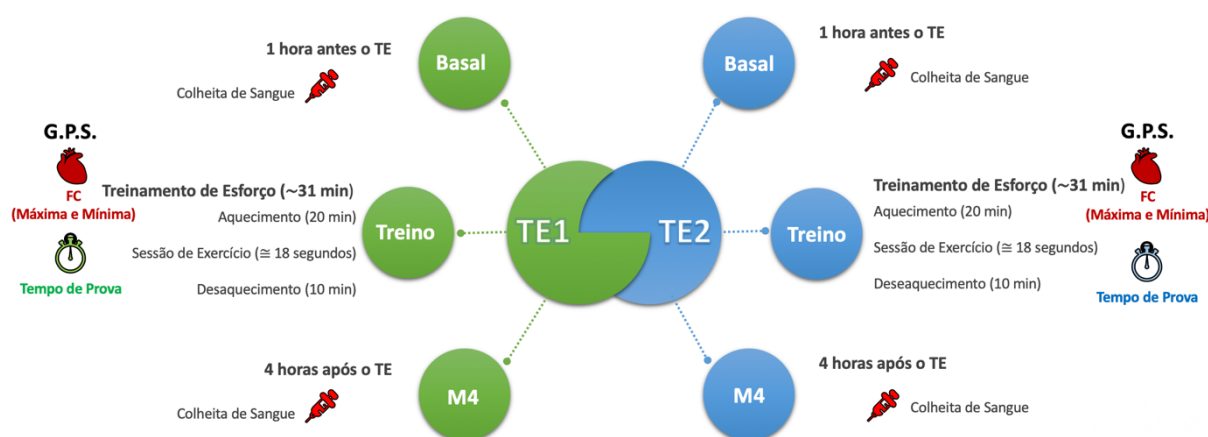
As colheitas das amostras de sangue foram realizadas no momento 1 hora antes do exercício (Basal) e 4 horas após o término do exercício (M4). Conforme representado no fluxo de trabalho na Figura 2. Para avaliar o efeito do treinamento, foram realizados dois TEs em cada animal, sendo o primeiro teste (TE1) com o animal no início do treinamento e o segundo teste (TE2) após cinco meses de treinamento.

4.3 Isolamento de leucócitos para obtenção de RNA total

Foram colhidos 9 mL de sangue venoso total em tubos a vácuo contendo EDTA (BD Vacutainer®, San Jose, CA, EUA). Brevemente, as amostras de sangue foram passadas através de filtro LeukoLOCK® (Total RNA Isolation System®, Ambion, Woodward St, USA) para enriquecer os leucócitos totais. Cada filtro foi lavado com

tampão fosfato-salino (PBS) para remover hemácias residuais. Em seguida, foram adicionados 3 mL de RNAlater® (Ambion, Woodward St, USA) para estabilizar o RNA. Estas amostras ficaram armazenadas a -80°C até o momento do isolamento do RNA.

Figura 2 - Representação dos treinos de esforços 1 e 2, mensuração da frequência cardíaca e tempo de prova além da colheita de sangue periférico no início do treinamento e após 5 meses de treinamento respectivamente



4.4 Isolando e Concentrando o RNA total

Para o isolamento do RNA total foi utilizado o protocolo alternativo para extração do RNA de células capturadas a partir do filtro LeukoLOCK® (Total RNA Isolation System®, Ambion, Woodward St, USA) usando o TRI Reagent® (Ambion, Woodward St, USA) conforme instruções do fabricante. Em seguida as amostras de RNA foram concentradas no equipamento Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) conforme descrito em (HERMANN *et al.*, 2019). A quantificação foi realizada pelo espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

O kit RNA 600 Pico foi utilizado para mensurar a qualidade do RNA por eletroforese capilar na plataforma Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A métrica DV₂₀₀ foi usada para calcular a porcentagem dos fragmentos do RNA com tamanho > 200 nucleotídeos.

4.5 Microarranjo para Análise Transcriptômica

Utilizou-se um kit de reagente WT PLUS (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) para preparo das amostras de RNA para análise da expressão do transcriptoma no

GeneChip™ Equine Gene 1.1 ST Array Strip, (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) obedecendo as instruções do fabricante. Resumidamente, os controles RNA *Poly-A* (*lys, phe, thr* e *dap*), ausentes nas células eucarióticas foram adicionados às amostras de RNA (controle do ensaio) antes da geração do cDNA. Após o processo de amplificação, o cDNA final foi purificado, quantificado, fragmentado e marcado para hibridação em *strips*. Os *strips* permaneceram durante 20 horas a 48°C num forno de hibridação. Os *strips* foram, então, lavados e corados no sistema robótico GeneAtlas (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) usando o kit GeneAtlas Hybridization, Wash and Stain para WT Array Strips (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA). Finalmente, os *strips* foram digitalizados usando o sistema de imagens *GeneAtlas* (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA). Os valores de intensidade nos arquivos foram corrigidos em segundo plano, transformados em $\log^2$ e depois normalizados pelo software Transcriptome Analysis Console (TAC) (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA), utilizando-se o algoritmo *Robust Multi-array Average* (RMA).

4.6 Avaliação do Perfil Inflamatório Através do Sequenciamento de Nova Geração

O perfil de expressão gênica multiplexada foi obtido usando o kit de expressão TruSeq® Targeted RNA expression (Illumina, San Diego, CA) com painéis de alvos personalizados (Apêndice). As bibliotecas foram preparadas e posteriormente reunidas e lidas no sequenciador MiSeq (Illumina) com o kit MiSeq v3 (Illumina) e 150 ciclos/leitura, obedecendo as instruções do fabricante.

4.7 Identificação de Genes Diferencialmente Expressos no Microarranjo e Sequenciamento de Próxima Geração

Para identificar os genes diferencialmente expressos a partir do microarranjo, utilizou-se o software Transcriptome Analysis Console (TAC) (Affymetrix®), empregando-se a análise estatística ANOVA (*fold change* $\pm 1,5$; FDR corrigido $p < 0,05$). Para identificar os genes diferencialmente expressos a partir do TruSeq® Targeted RNA expression, utilizou-se o aplicativo TruSeq Targeted RNA v1.1 no BaseSpace (Illumina®, San Diego, CA). Após a desmultiplexação e a geração de arquivos FASTQ, as leituras de cada amostra foram alinhadas às referências especificadas no manifesto usando o algoritmo Smith-Waterman que alinha todas as

sequencias e produz arquivos de destino que contêm contagens replicadas alinhadas brutas para cada transcrito. Em seguida foi realizado análise de expressão diferencial, na qual foram calculados os valores de normalização da profundidade do sequenciamento, estimativa de variância e p valores (*fold change* $\pm$ 1,5 *p*-ajustado $<0,05$ usando o método Benjamini-Hochberg).

4.8 Análise funcional de enriquecimento de conjuntos de genes diferencialmente expressos através da ferramenta Enrichr

Para descrever a implicação dos genes diferencialmente expressos nos leucócitos de equinos, realizou-se uma análise funcional na plataforma Enrichr (CHEN *et al.*, 2013) (KULESHOV *et al.*, 2016). Foi também utilizada a biblioteca de análise de vias Wikipathway 2019 Human (KUTMON *et al.*, 2015; SLENTER *et al.*, 2017), seguida da avaliação da via enriquecida e ontologia daquelas com valor de *p*-ajustado $<0,05$ pelo teste de Bonferroni.

5 RESULTADOS

5.1 Análise do Tempo de Prova e Mensuração da Frequência Cardíaca através do Sistema de Posicionamento Global

Através do sistema de posicionamento global os animais foram monitorados durante o percurso da prova de 3 tambores, mostrando que o tempo de prova foi significativamente menor ($p=0,011$) no TE2 em comparação com o TE1, enquanto as médias das $FC_{\text{máx}}$ ($p=0,33$) e $FC_{\text{mín}}$ ($p=0,36$) foram iguais nos dois testes de esforço, de acordo com o teste t de Student (Tabela 1).

Tabela 1- Frequências cardíacas (batimentos/minuto) máxima ($FC_{\text{máx}}$) e mínima ($FC_{\text{mín}}$) e tempo de prova (segundos) desenvolvidos durante o percurso da prova de 3 tambores em dois testes de esforço (TE) físico. Os dados representam a média $\pm$ desvio-padrão

Momento	$FC_{\text{máx}}$	$FC_{\text{mín}}$	Tempo de prova
TE1	170,80 $\pm$ 32,21 ^a	44,67 $\pm$ 6,81 ^a	27,17 $\pm$ 4,61 ^a
TE2	142,33 $\pm$ 65,22 ^a	40,00 $\pm$ 5,90 ^a	22,78 $\pm$ 2,58 ^b

^{a,b} Letras diferentes na coluna indicam que as médias diferem entre si (teste t , $p<0,05$).

5.2 Perfil de Expressão Gênica Via Análise do Microarranjo

Num total de 26006 genes, 88 genes foram encontrados diferencialmente expressos após aplicarmos o filtro ENSECA (*Equus caballus*) após o teste de esforço TE1. Destes 88, 49 estavam *up*-regulados e 39 *down*-regulados em M4 (*fold change* $\pm$ 1,5 e *false discovery* FDR $p<0,05$), correspondendo a 55,68% e 44,32% respectivamente (Figura 3A). Quando os animais foram submetidos ao teste de esforço TE2, utilizando os mesmos critérios, comparando os momentos M4 e Basal, foram encontrados 17 genes diferencialmente expressos (12 *up*-regulados e 5 *down*-regulados em M4 – *fold change* $\pm$ 1,5 e *false discovery* FDR $p<0,05$) correspondendo a 70,59% e 29,41%, respectivamente (Figura 3B). A Tabela 2 e 3 mostram os genes *up*-regulados e *down*-regulados com seus respectivos *fold change* comparando-os nos dois treinos de esforço e mostrados na cor vermelha (*fold change* positivo) e na cor azul (*fold change* negativo).

Para investigar a existência de diferenças significativas da expressão gênica entre os momentos Basal e M4 nos grupos TE1 e TE2, utilizamos o método de

agrupamento hierárquico que foi aplicado ao conjunto de genes diferencialmente expressos. O mapa de calor mostra que no TE1 há dois agrupamentos distintos com diferença de expressão gênica quando comparados os momentos M4 e Basal (Figura 6). No TE2 notadamente observa-se os mesmos agrupamentos, com modificação da expressão gênica nos mesmos momentos (Figura 7). O Diagrama de Venn na Figura 4 apresentam os genes diferencialmente expressos no momento Basal, no TE1 (49 genes *up*-regulados) e TE2 (12 genes *up*-regulados) com dois genes em comum, enquanto a Figura 5 apresentam os genes diferencialmente expressos no M4, no TE1 (39 genes *down*-regulados) e no TE2 (5 genes *down*-regulados), podendo observar que os genes representados neste diagrama não apresentou genes em comuns.

5.3 Análise do Perfil Inflamatório

Para análise do perfil inflamatório utilizamos a tecnologia TruSeq Targeted RNA Expression através de um painel customizado (APÊNDICE A), que após comparação entre os momentos (Basal e M4) no TE1 e TE2, observou que houve expressão dos genes deste painel em ambos os treinos de esforços (APÊNDICE B), embora não tenha havido diferença significativa entre eles ($p < 0,05$, pelo teste de Bonferroni). O que significa que manteve o comportamento inflamatório nos treinos de esforço 1 e 2 nos momentos Basal e M4.

5.4 Enriquecimento Funcional e Classificação Funcional

Para o enriquecimento funcional e classificação dos perfis de expressão obtida nos TE1 e TE2, utilizou-se a ferramenta *online* de enriquecimento funcional Enrichr. As vias enriquecidas nos TE1 e TE2 de interesse ($p < 0,05$) estão associadas à resposta inflamatória *Regulation of Toll-like receptor signaling pathway WP1449* ($p=0,035$) e via *Cardiac Progenitor Differentiation WP2406* ($p=0,002$) demonstradas nas Figuras 8 e 9. Enquanto a via enriquecida nos TE1 e TE2 do perfil inflamatório manteve a expressão nos momentos Basal e M4 nos TE1 e TE2 a mesma via *Regulation of Toll-like receptor signaling pathway WP1449* ($p = 0,0001$).

Figura 3- Sumarização dos resultados realizado pelo programa Transcriptome Analysis Console e Volcano Plot ilustrando genes diferencialmente expressos, (A) 4 horas após o término do TE em relação ao momento Basal (-1 hora do início do TE) no TE1 e (B) horas após o término do TE em relação ao momento Basal (-1 hora do início do TE) no TE2. O eixo x representa o $\log^2$ (razão) onde a relação é a proporção das médias de intensidade dos tratamentos sob o controle. O eixo y representa $-\log^{10}$ (p-valor) onde $p < 0,05$ é o valor associado ao teste estatístico ANOVA aplicado na comparação entre os grupos. Os pontos coloridos mostram os genes considerados *up*-regulados (cor vermelha) ou *down*-regulados (cor verde), enquanto que os genes não regulados são exibidos como pontos na cor cinza (FDR <0,05, fold change $\pm 1,5$)

A

TE1 M4 vs TE1 M0

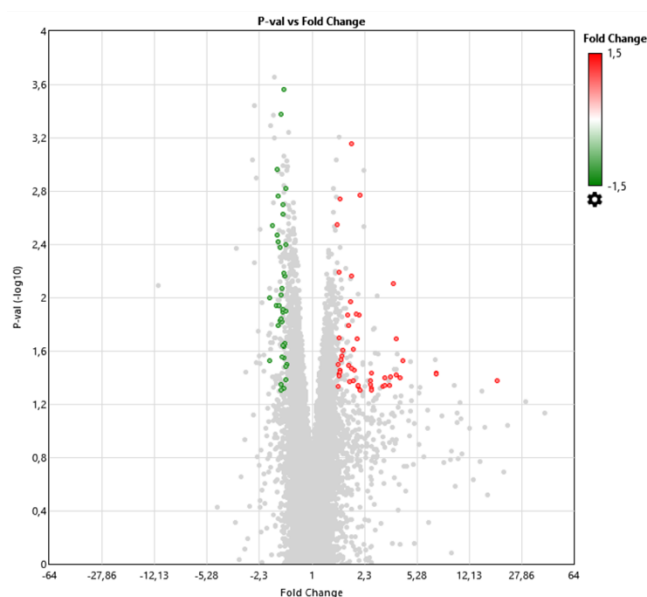
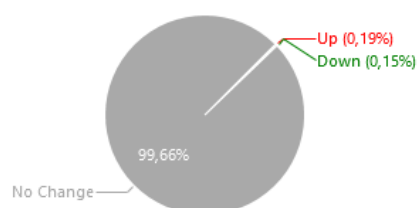
- TE1_M4: 3 samples, TE1_M0: 3 samples

Filter criteria:

- Fold Change: $> 1,5$ or $< -1,5$
- P-val: $< 0,05$
- Public Gene IDs: Contains "ENSECA"

Total number of genes: 26006

- Genes passed filter criteria: 88 (0,34%)
 - Up-Regulated: 49 (55,68%)
 - Down-Regulated: 39 (44,32%)



B

TE2 M4 vs TE2 M0

- TE2_M4: 3 samples, TE2_M0: 3 samples

Filter criteria:

- Fold Change: $> 1,5$ or $< -1,5$
- P-val: $< 0,05$
- Public Gene IDs: Contains "ENSECA"

Total number of genes: 26006

- Genes passed filter criteria: 17 (0,07%)
 - Up-Regulated: 12 (70,59%)
 - Down-Regulated: 5 (29,41%)

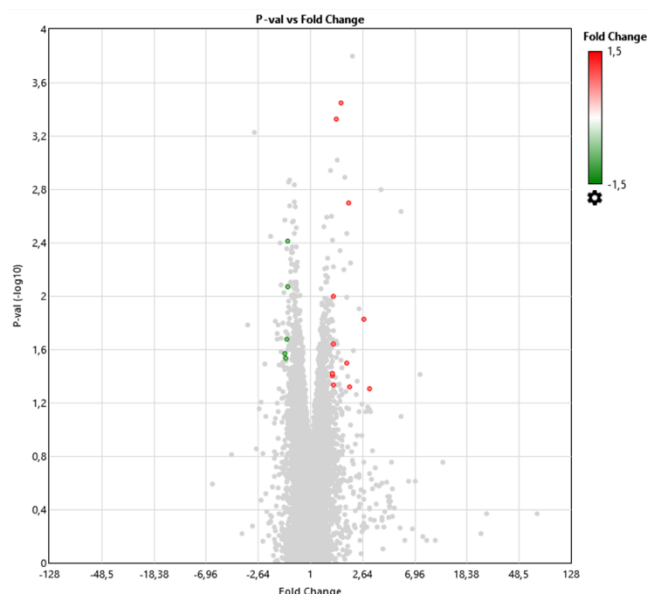
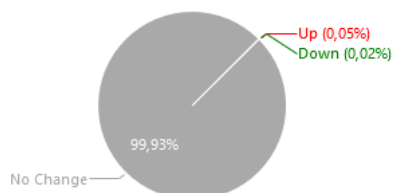
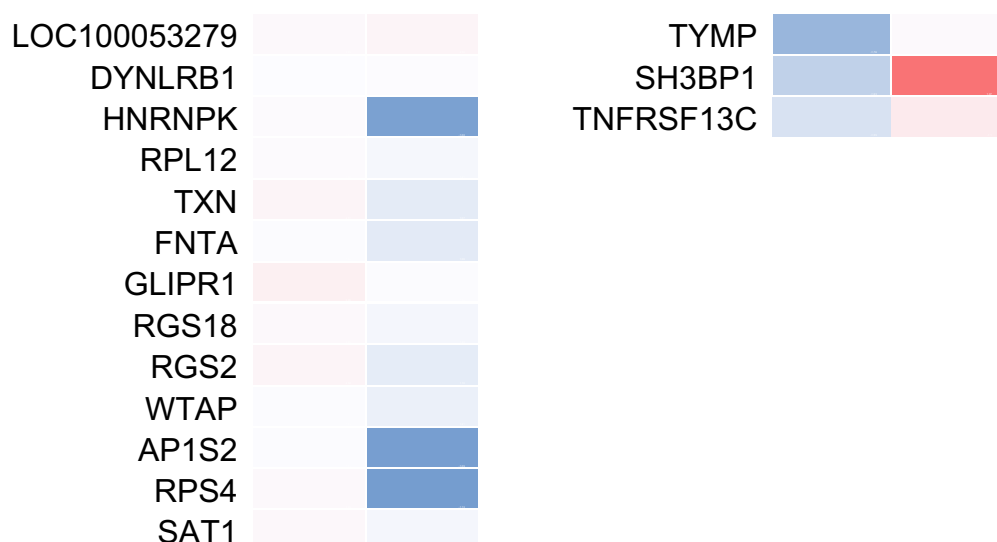


Tabela 2 - Lista de genes diferencialmente expressos *up*-regulados e *down*-regulados em M4 do TE1, com seus respectivos *fold change* representados nas cores vermelha (*fold change* positivo) e na cor azul (*fold change* negativo) e o *fold change* do contraste em TE2

(continua)

Up-Regulados			Down-Regulados			
Gene	Fold Change M4 vs Basal		Gene	Fold Change M4 vs Basal		
	TE1	TE2		TE1	TE2	
RPS17L; LOC100065786			PGBD5			+18,73
RPS8			DCDC2B			
CAPZB			CLDN19			
PGD			SLC12A3			
LAPTM5			KLRG2			
IGJ			PPM1J			0
LOC100055584; RPL23A			LOC100068584			
LOC100057617			BGLAP			
LOC100057175			G0S2			
S100A8			KCNJ10			
S100A12			MFSD5			-1,67
KCNJ8			KRT73			
ARHGDIB			PPAN			
RPS28			NFIX			
PET100			DOHH			
IL18			BRI3BP			
PICALM			KCTD15			
LY96*			ZNF135			
LOC100066849			LGI4			
CCL5*			NUMBL			
LOC100054725			MIR1180			
FTH1			ALDH3B1			
LOC100059021			IGF2*			
UBE2D2			SHANK2			
ATP6V0E1			ZNF629			
PCBP1			ALKBH4			
LAPTM4A			F12			
RPL31			ARHGEF37			
LAMP1			MIRLET7G			
ALOX5AP			PLCD1			
CYTIP			SLCO2A1			
BMP6			SLC25A15			
LOC100058247			LOC100062763			
TREM1*			IRX4*			
PTP4A1			LOC100071531			
RPL10A			FAM90A1			



A escala de cores ilustrada com a cor vermelha significa o *fold change* (+) e a cor azul significa o *fold change* (-). Momento Basal: 1 hora antes do início do teste de esforço; M4: 4 horas após o término de cada teste de esforço. *Genes identificados na análise de enriquecimento funcional.

Figura 4 - Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos da comparação entre os treinamentos de esforços 1 e 2 no momento Basal

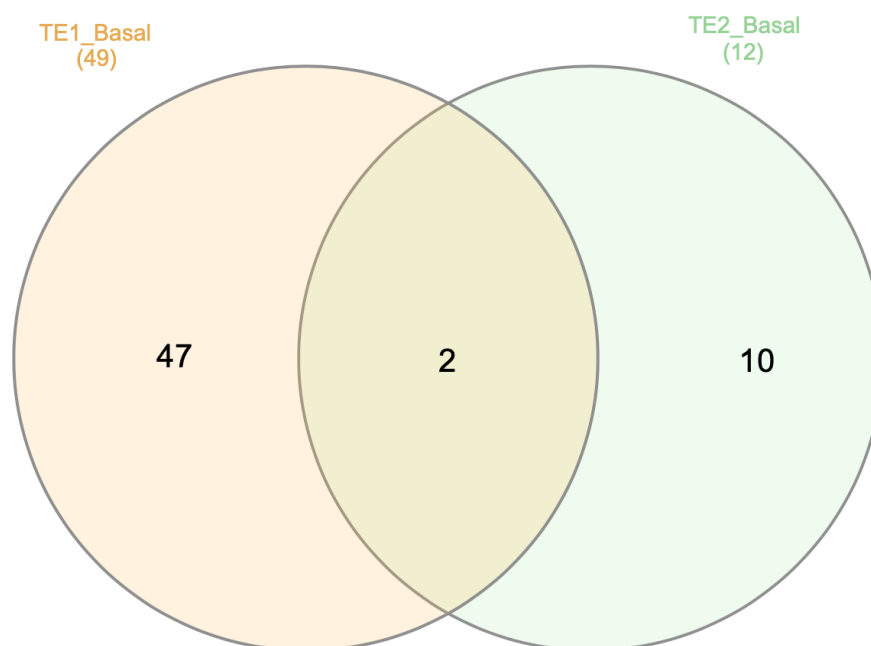


Tabela 3 - Lista de genes diferencialmente expressos *up*-regulados e *down*-regulados em M4 do TE1, com seus respectivos *fold change*, e o *fold change* do contraste em TE1

Up-Regulados			Down-Regulados		
Gene	Fold Change M4 vs Basal		Gene	Fold Change M4 vs Basal	
	TE1	TE2		TE1	TE2
NMES1			LOC100067067		
SNX10			INHBA*		
AAMP			SCN4B		
DYNLL1			LOC100056766		
LGALS9C			ELP6		
LOC100060989					
MAT2B					
RPL15					
LOC100146955					

A escala de cores ilustrada com a cor vermelha significa o *fold change* (+) e a cor azul significa o *fold change* (-). *Genes identificados na análise de enriquecimento funcional.

Figura 5 - Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos da comparação entre os treinamentos de esforços 1 e 2 no momento 4

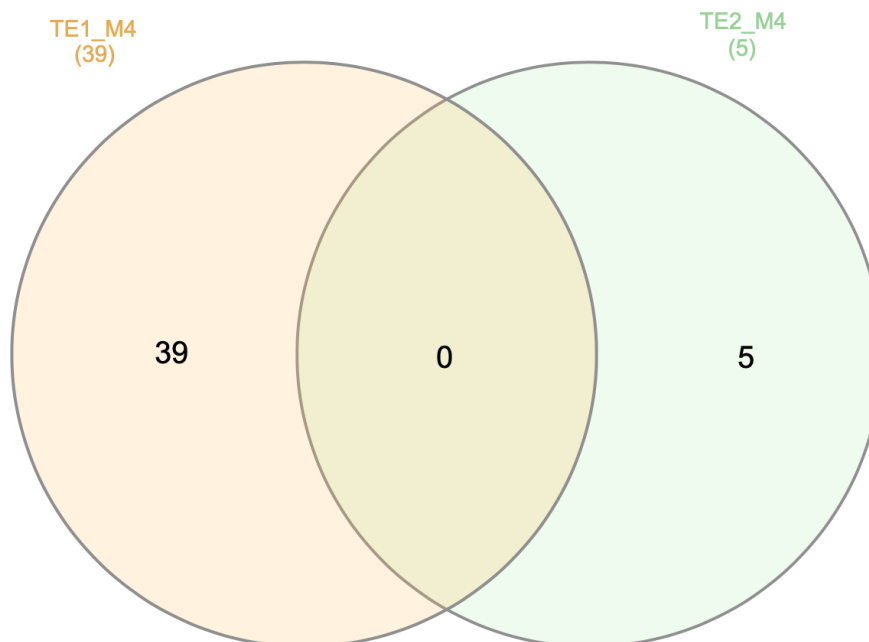


Figura 6 - Mapa de calor comparando os genes diferencialmente expressos (M4 vs Basal) em leucócitos de equinos quarto de milha submetidos ao exercício de alta intensidade no TE1. Intensidade da cor indica níveis de expressão (cor verde *down*-regulado e cor vermelha *up*-regulado em M4). A semelhança entre indivíduos com armazenamento em cluster hierárquico pode ser vista acima e a esquerda do mapa de calor

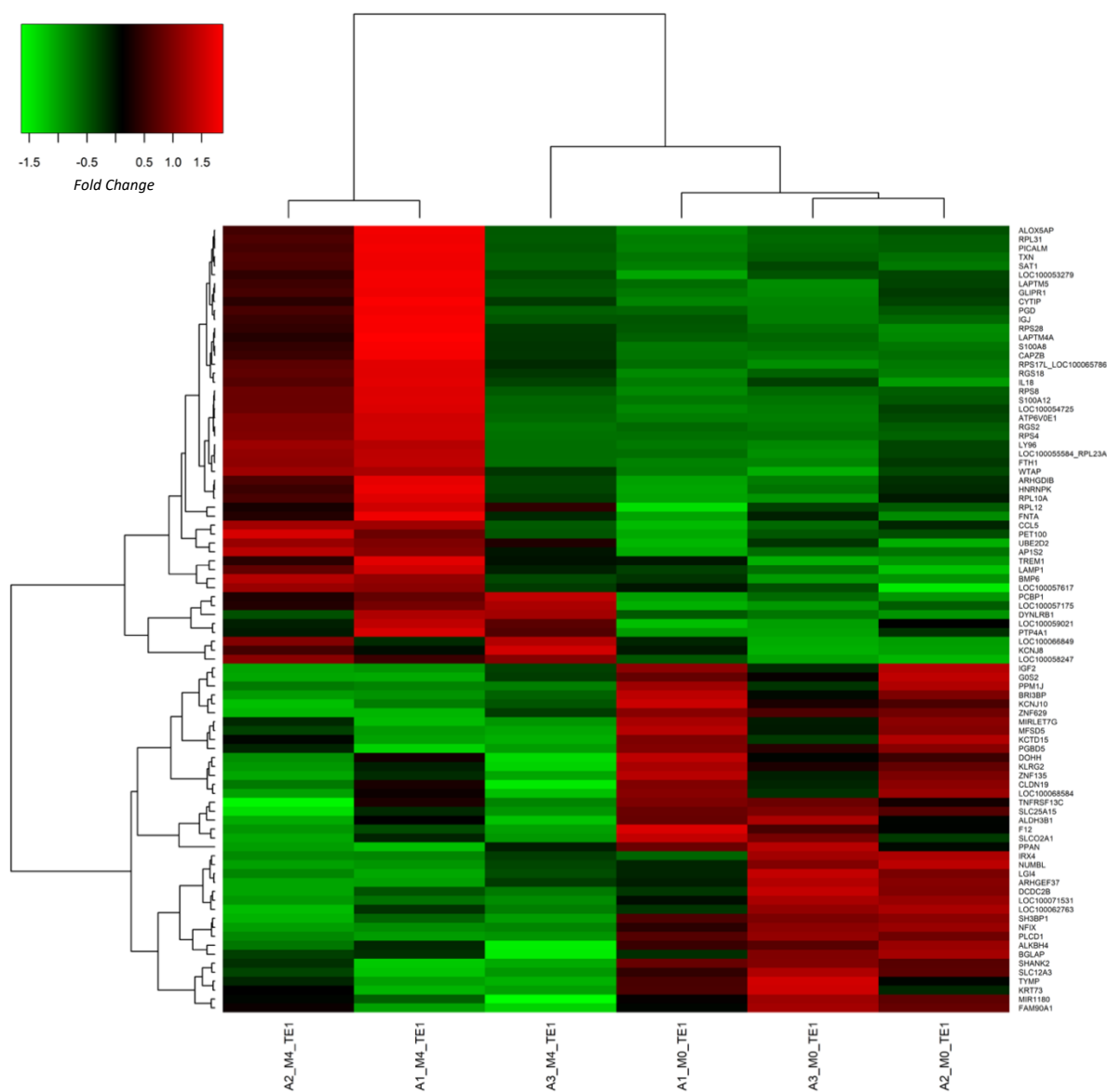


Figura 7- Mapa de calor comparando os genes diferencialmente expressos (M4 vs Basal) em leucócitos de equinos quarto de milha submetidos ao exercício de alta intensidade no TE1. Intensidade da cor indica níveis de expressão (cor verde *down*-regulado e cor vermelha *up*-regulado em M4). A semelhança entre indivíduos com armazenamento em cluster hierárquico pode ser vista acima e a esquerda do mapa de calor.

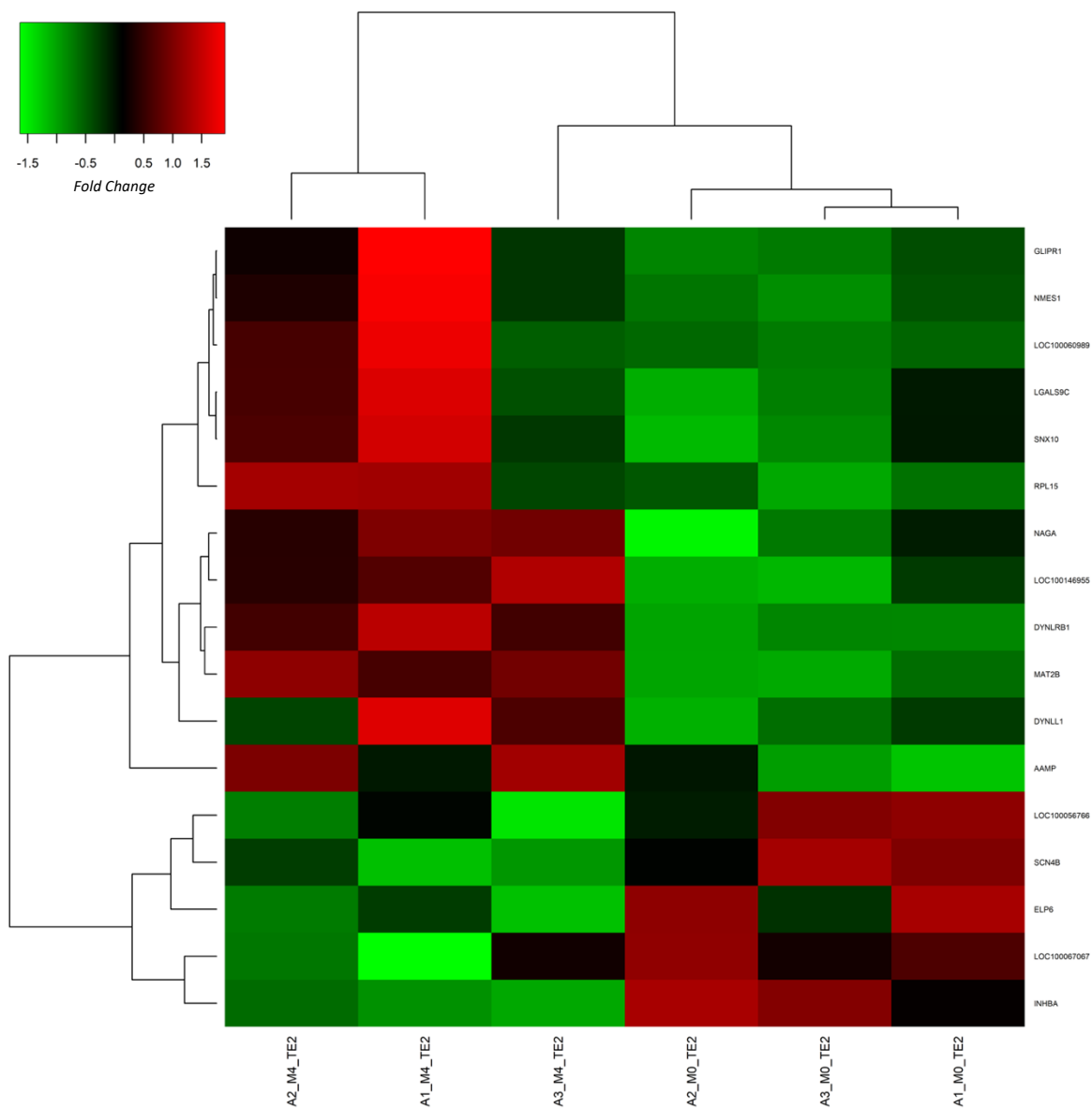


Figura 8- Via de Regulation of toll-like receptor signaling Pathway no TE1. As estrelas vermelhas indicam os genes com diferenças significativas e diferencialmente expressos identificados no microarranjo. Sem marcação com estrelas representam os genes conhecidos na via e sem identificação na análise transcriptômica.

Title: Regulation of toll-like receptor si
Availability: CC BY 2.0
Last modified: 10/17/2013
Organism: Homo sapiens

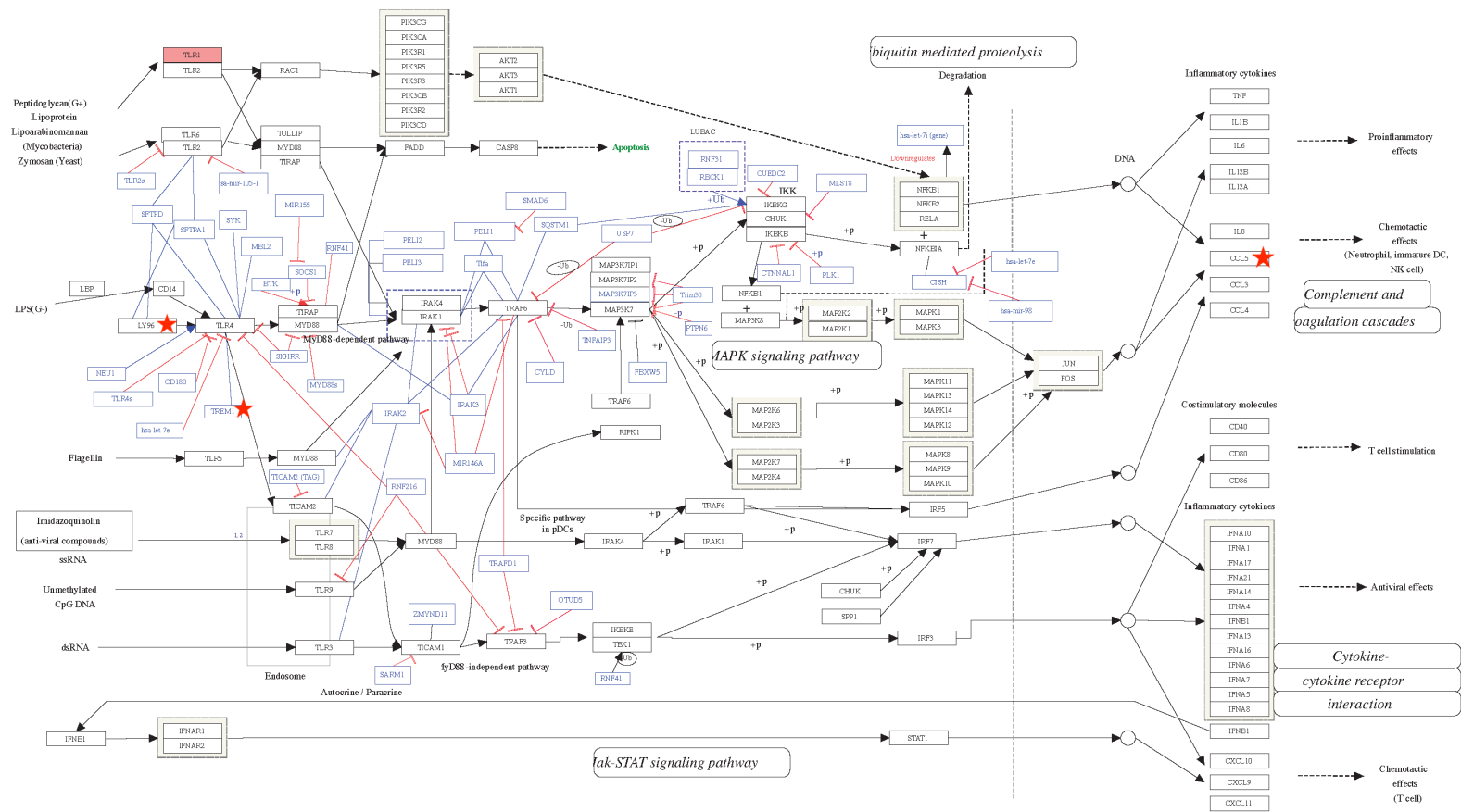
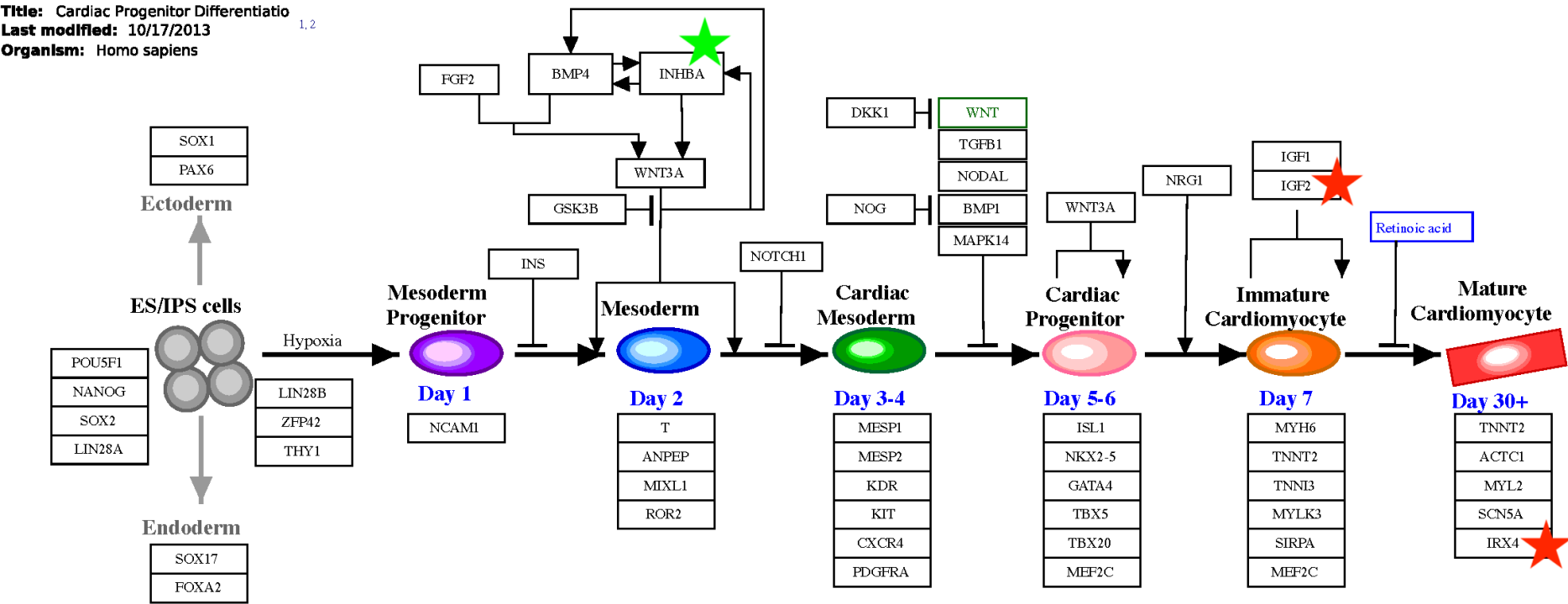


Figura 9- Via Cardiac Progenitor Differentiation no TE2. As estrelas vermelhas indicam os genes com diferenças significativas e diferencialmente expressos *up*-regulados e a estrela verde indica o gene *down*-regulado identificados no microarranjo. Sem marcação com estrelas representam os genes conhecidos na via e sem identificação na análise transcriptômica.



6 DISCUSSÃO

Neste estudo revelamos que os cavalos submetidos a treinamento físico ao longo de 5 meses evidenciaram melhora no seu condicionamento físico e também houve mudança no perfil transcriptômico dos leucócitos circulantes de equinos em resposta ao esforço de alta intensidade. No ambiente de desenvolvimento esportivo, o monitoramento dos treinamentos usando ferramentas não invasivas de treinamento são eficientes em termos de ganho de tempo e obtenção de informações precisas, sendo possível rastrear o tempo do exercício e monitorar o status da frequência cardíaca.

O tempo de prova foi significativamente menor no TE2 em comparação com o TE1, portanto, é razoável sugerir que o treinamento foi suficiente para promover o ganho de tempo após 5 meses de condicionamento físico, onde os animais treinados ganharam velocidade e potência uma vez que diminuíram em média 4 segundos na prova dos 3 tambores. Esse ganho poderiam estar associado ao tipo de treinamento e condicionamento proposto aos animais, estudo conduzido com cavalos puro-sangue inglês para avaliar respostas fisiológicas ao treinamento intermitente de alta intensidade conduzido por 8 meses, mostrou que além da melhora no condicionamento físico os animais ganharam potência e melhoraram a capacidade aeróbia (OHMURA *et al.*, 2013). As $FC_{\text{máx}}$ possuem valores absolutos mais elevados em cavalos em estágios de treinamento mais avançado para provas de três tambores do que aqueles encontrados anteriormente no estudo que avalia os efeitos nos parâmetros eletrocardiográficos e sanguíneos em cavalos quarto de milha na prova de 3 tambores (BINDA *et al.*, 2016). A taquicardia pós-exercício observada corrobora com achados na literatura como encontrada no trabalho que usou suplementação oral de creatina para avaliar o desempenho de cavalos (TEIXEIRA *et al.*, 2016) e pode ser atribuída ao aumento das necessidades metabólicas dos músculos durante o exercício e aumento da atividade simpática, sendo dependente da intensidade do esforço físico (DE *et al.*, 2009).

Neste estudo, analisou-se os perfis transcriptômicos de leucócitos totais envolvidos no treino de esforço, entre o momento que antecede a sessão de

treinamento e quatro horas após a sessão do treinamento. O sangue periférico é amplamente utilizado para monitorar o status do organismo (MOHR; LIEW, 2007). E de fato, a análise do transcriptoma em leucócitos coletados de amostras de sangue é, sem dúvida, capaz de evidenciar resposta dos equinos ao exercício (BARREY *et al.*, 2006; CAPOMACCIO *et al.*, 2013; GIM *et al.*, 2014). Ao comparar os respectivos perfis transcriptômicos no sangue antes e após o exercício, conseguimos identificar genes diferencialmente expressos, que poderiam se encaixar perfeitamente no contexto bem caracterizado de regulação adaptativa ao exercício em equinos. Nesta visão abrangente, os genes diferencialmente expressos estavam ligados ao processo inflamatório com genes que atuam na via *Regulation of toll-like receptor signaling* e genes que atuam no metabolismo celular, e que atuam na via *Cardiac Progenitor Differentiation*. O exercício físico induz diferentes alterações inflamatórias, que se correlacionam com o tipo, intensidade e duração do exercício e o nível de treinamento, com elevação de glicoproteínas no tecido muscular, levando a alterações nas células imunes que provocam a elevação sistêmica de citocinas pró- e anti-inflamatórias (ANDRADE *et al.*, 2018; LIRA *et al.*, 2015; PEDERSEN, BENTE KLARLUND; HOFFMAN-GOETZ, 2000; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Nossos resultados sugeririam que os animais treinados ao longo de cinco meses poderiam sofrer processo inflamatório devido à intensidade e à velocidade da prova, uma vez que os cavalos necessitavam de potência e força para cumprir a prova, ou ainda poderia sugerir o aumento da permeabilidade intestinal. De acordo com (PALS *et al.*, 1997) ativação de TLRs ocorre em resposta à estimulação da atividade antimicrobiana como efeito da intensidade da corrida sobre a permeabilidade intestinal. Estes mesmos dados foram encontrados no sequenciamento de nova geração do presente estudo. A ausência de diferenças significativas permitem sugerir que o padrão do perfil inflamatório foi o mesmo nos dois treinos de esforço. Por tratar-se de exercício de curta duração, mesmo de alta intensidade, não houve lesão muscular que pudesse causar alteração no perfil inflamatório. A musculatura corporal e os tendões foram avaliados por ultrassonografia (dados não mostrados) e corroboram esta hipótese.

O gene IRX4 importante mediador da diferenciação ventricular durante o desenvolvimento cardíaco (BAO *et al.*, 1999; BRUNEAU *et al.*, 2000) e o gene IGF2 está envolvido no metabolismo da glicose do músculo esquelético, além de participar no transporte de moléculas através das membranas celulares e também no interior da célula, o que sugeriria no nosso trabalho que este gene participaria do metabolismo

muscular uma vez que estes animais estariam iniciando os treinamentos (WILLIAMS *et al.*, 2012). Em cultivo de células mioblásticas C2C12 com a supressão da proteína ZBED6 que regula a expressão de IGF2 mostrou que este gene quando regulado positivamente pode afetar o crescimento muscular além da estrutura muscular do coração (MARKLJUNG *et al.*, 2009).

O gene INHBA exerce função nos ossos, influenciando o desenvolvimento de osteoblastos e osteoclastos, de forma que as inibições desse gene exercem efeitos supressores sobre a diferenciação e o metabolismo das células ósseas (NICKS *et al.*, 2009; NICKS; FOWLER; GADDY, 2010). Ademais, um estudo realizado para a supressão do gene IHBA em cultivo de células primárias da medula óssea de roedores demonstrou que a sua supressão diminuiu completamente a osteoblastogênese (GADDY-KURTEN *et al.*, 2002). Assim sugere que nos animais estudados, este gene *down-regulado* poderia estar associado à proteção óssea e articular em resposta ao exercício de curta duração e alta intensidade.

7 CONCLUSÃO

O exercício proposto conseguiu demonstrar que o período do treinamento melhorou o condicionamento físico dos animais como demonstrado pelos dois testes de esforço. Os perfis transcriptômicos em leucócitos isolados do sangue antes e após os testes de esforço estão relacionados ao processo inflamatório, estrutura muscular e proteção óssea e articular.

REFERÊNCIAS

ALDRIDGE, Lynn I. The Genetics of the Horse. *Heredity*, v. 85, n. 5, p. 509, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.0827a.x>>.

ANDRADE, Alexandro *et al.* Acute effects of physical exercises on the inflammatory markers of patients with fibromyalgia syndrome: A systematic review. *Journal of Neuroimmunology*. [S.l.]: Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29254627>>. Acesso em: 26 mar. 2020. , 15 mar. 2018

BAGGISH, Aaron L. *et al.* Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *Journal of Physiology*, v. 589, n. 16, p. 3983–3994, 15 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690193>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

BAO, Zheng Zheng *et al.* Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Ir4*. *Science*, v. 283, n. 5405, p. 1161–1164, 19 fev. 1999.

BARREY, E. *et al.* Gene expression profiling in blood cells of endurance horses completing competition or disqualified due to metabolic disorder. *Equine Veterinary Journal*, v. 38, n. SUPPL.36, p. 43–49, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17402390>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

BINDA, Marcela B. *et al.* Effects of 3-Barrel Racing Exercise on Electrocardiographic and on Blood Parameters of Quarter Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 47, p. 71–76, 1 dez. 2016.

BLOHM, Dietmar H.; GUISEPPI-ELIE, Anthony. *New developments in microarray technology*. *Current Opinion in Biotechnology*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 7 set. 2001

BRAZAS, Michelle D.; HANCOCK, Robert E.W. *Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. Drug Discovery Today*. [S.l.]: Elsevier Current Trends. , 15 set. 2005

BRUNEAU, Benoit G. *et al.* Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Ir4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Developmental Biology*, v. 217, n. 2, p. 266–277, 15 jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625552>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

BÜTTNER, Petra *et al.* Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *Journal of Applied Physiology*, v. 102, n. 1, p. 26–36, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990507>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

CAPELLETO, Elder; ANGELI, Ana; GRAFF, Henriete. RESPOSTAS FISIOLÓGICAS EM QUARTO-DE-MILHA APÓS PROVA DE TAMBOR. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, v. 7, p. 299, 14 jun. 2017.

CAPOMACCIO, Stefano *et al.* RNA Sequencing of the Exercise Transcriptome in Equine Athletes. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e83504, 31 dez. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0083504>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

CAPPELLI, Katia *et al.* Analysis of peripheral blood mononuclear cells gene expression in endurance horses by cDNA-AFLP technique. *Research in Veterinary Science*, v. 82, n. 3, p. 335–343, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098267>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

CAPPELLI, Katia *et al.* Exercise-induced up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC Physiology*, v. 9, n. 1, p. 12, 2009.

CHEN, Edward Y. *et al.* Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*, v. 14, n. 1, p. 128, 15 abr. 2013. Disponível em: <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-14-128>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

CONNOLLY, Peter H. *et al.* Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Applied Physiology*, v. 97, n. 4, p. 1461–1469, out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194674>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

CONSTANTINOPOL, M. *et al.* Oxygen transport during exercise in large mammals. II. Oxygen uptake by the pulmonary gas exchanger. *Journal of Applied Physiology*, v. 67, n. 2, p. 871–878, ago. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793687>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

CORRÊA, Márcio José Monteiro; DA MOTA, Marcilio Dias Silveira. Genetic evaluation of performance traits in Brazilian Quarter Horse. *Journal of Applied Genetics*, v. 48, n. 2, p. 145–151, 2007.

DE, Guilherme *et al.* Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 46, p. 431–437, 1 jan. 2009.

EPSTEIN, Charles B.; BUTOW, Ronald A. *Microarray technology - Enhanced versatility, persistent challenge*. *Current Opinion in Biotechnology*. [S.l.]: Current Biology Ltd. , 1 fev. 2000

EVERETT, Kerry *et al.* Advantages and disadvantages of microarrays to study microbial population dynamics - A minireview. *New Zealand Plant Protection*, v. 63, p. 1–6, 1 ago. 2010.

FEHRENBACH, Elvira. *Multifarious microarray-based gene expression patterns in response to exercise*. *Journal of Applied Physiology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008434>>. Acesso em: 17 mar. 2020. , jan. 2007

GADDY-KURTEN, D. *et al.* Inhibin suppresses and activin stimulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Endocrinology*, v. 143, n. 1, p. 74–83, jan. 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751595>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

GIM, Jeong An *et al.* Transcriptional expression changes of glucose metabolism genes after exercise in thoroughbred horses. *Gene*, v. 547, n. 1, p. 152–158, 15 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24971503>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

HERMANN, Stefanie *et al.* Transcriptomic profiling of cell-free and vesicular microRNAs from matched arterial and venous sera. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 8, n. 1, p. 1670935, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2019.1670935>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

HINCHCLIFF, Kenneth W; GEOR, Raymond J. Chapter 1.1 - The horse as an athlete: a physiological overview. In: HINCHCLIFF, KENNETH W; GEOR, RAYMOND J; KANEPS, ANDRIS J B T - EQUINE EXERCISE PHYSIOLOGY (Org.). . Edinburgh: W.B. Saunders, 2008. p. 2–11. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028571500032>>.

HOHEISEL, Jörg D. *Microarray technology: Beyond transcript profiling and genotype analysis. Nature Reviews Genetics*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , mar. 2006

JONES, J. H. *et al.* Oxygen transport during exercise in large mammals. I. Adaptive variation in oxygen demand. *Journal of Applied Physiology*, v. 67, n. 2, p. 862–870, 1989.

KULESHOV, Maxim *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*, v. 44, p. gkw377, 3 maio 2016.

KUTMON, Martina *et al.* WikiPathways: capturing the full diversity of pathway knowledge. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D488–D494, 19 out. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1024>>.

LEVINE, Marsha. Domestication and early history of the horse. *The Domestic Horse*.

The Evolution, Development and Management of its Behaviour, 1 jan. 2005.

LIRA, Fábio S. *et al.* Differences in metabolic and inflammatory responses in lower and upper body high-intensity intermittent exercise. *European Journal of Applied Physiology*, v. 115, n. 7, p. 1467–1474, 10 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25688040>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

MARKLJUNG, Ellen *et al.* ZBED6, a Novel Transcription Factor Derived from a Domesticated DNA Transposon Regulates IGF2 Expression and Muscle Growth. *PLoS Biology*, v. 7, n. 12, p. e1000256, 15 dez. 2009. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1000256>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

MOHR, Steve; LIEW, Choong Chin. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. *Trends in Molecular Medicine*, v. 13, n. 10, p. 422–432, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919976>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

NICKS, Kristy M. *et al.* Regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by the other reproductive hormones, Activin and Inhibin. *Molecular and Cellular Endocrinology*. [S.l.]: NIH Public Access. , 30 out. 2009

NICKS, Kristy M.; FOWLER, Tristan W.; GADDY, Dana. Reproductive hormones and bone. *Current Osteoporosis Reports*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425612>>. Acesso em: 17 mar. 2020. , jun. 2010

NIELSEN, B. D. *et al.* Racing speeds of Quarter Horses, Thoroughbreds and Arabians. *Equine Veterinary Journal*, v. 38, n. SUPPL.36, p. 128–132, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17402407>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

NIELSEN, Henning Bay. Lymphocyte responses to maximal exercise: A physiological perspective. *Sports Medicine*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959623>>. Acesso em: 17 mar. 2020. , 2003

OHMURA, Hajime *et al.* Physiological responses of young thoroughbred horses to intermittent high-intensity treadmill training. *Acta veterinaria Scandinavica*, v. 55, p. 59, 17 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23957961>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

OUTRAM, Alan K. *et al.* The earliest horse harnessing and milking. *Science*, v. 323, n. 5919, p. 1332–1335, 6 mar. 2009.

PALS, Kay L. *et al.* Effect of running intensity on intestinal permeability. *Journal of Applied Physiology*, v. 82, n. 2, p. 571–576, fev. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9049739>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

PEDERSEN, Bente Klarlund; HOFFMAN-GOETZ, Laurie. *Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. Physiological Reviews*. [S.l.]: American Physiological Society. , 2000

PEDERSEN, Line *et al.* Voluntary running suppresses tumor growth through epinephrine- and IL-6-dependent NK cell mobilization and redistribution. *Cell Metabolism*, v. 23, n. 3, p. 554–562, 8 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26895752>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

PEREIRA, Guilherme *et al.* PERSPECTIVAS DO USO DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE EQUINOS DE CORRIDA DA RAÇA QUARTO DE MILHA. *Veterinária e Zootecnia*, v. 22, p. 347, 1 set. 2015.

PERSSON, S. On blood volume and working capacity in horses. Studies of methodology and physiological and pathological variations. *Acta veterinaria Scandinavica*, p. Suppl 19:9-189, 1967. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4863601>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

PETERSEN, Anne Marie W.; PEDERSEN, Bente Klarlund. *The anti-inflammatory effect of exercise. Journal of Applied Physiology*. [S.l.: s.n.], abr. 2005

POOLE, David C; ERICKSON, Howard H. Chapter 4.1 - Cardiovascular function and

oxygen transport: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, KENNETH W; GEOR, RAYMOND J; KANEPS, ANDRIS J B T - EQUINE EXERCISE PHYSIOLOGY (Org.). . Edinburgh: W.B. Saunders, 2008. p. 212–245. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028571500123>>.

ROBERTO ARRUDA DE SOUZA LIMA. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. *Câmara de Equideocultura do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, p. 54, 2016.

RODRIGUES, Isabella Manes Soutto Mayor da Motta; SPINDOLA, Bruno Ferreira; BOTTEON, Paulo de Tarso Landgraf. Biochemical and oxidative profile of horse used for a simulated barrel racing. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 38, n. Supl.2 SE-Scientific articles, 1 nov. 2016. Disponível em: <<http://rbmv.org/index.php/BJVM/article/view/200>>.

RUSSO, Giuseppe; ZEGAR, Charles; GIORDANO, Antonio. *Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. Oncogene*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 2 out. 2003

SABROE, I.; WHYTE, M. K.B. Toll-like receptor (TLR)-based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. dez. 2007, [S.l: s.n.], dez. 2007. p. 1492–1495. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031251>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

SHAO, Guifang *et al.* A combinational clustering based method for cDNA microarray image segmentation. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, 4 ago. 2015.

SHEPHARD, Roy J. *Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. Sports Medicine*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12688826>>. Acesso em: 17 mar. 2020. , 2003

SILVA, Marco Augusto Giannoccaro Da *et al.* Acid base balance in Quarter Horses performing Three Barrel Racing. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 35, n. 2 SE-Scientific articles, 30 jun. 2013. Disponível em:

<<http://rbmv.org/index.php/BJVM/article/view/599>>.

SLENTER, Denise N *et al.* WikiPathways: a multifaceted pathway database bridging metabolomics to other omics research. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. D1, p. D661–D667, 10 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1064>>.

STRICKLIN, J B. Barrel racing. *Equine Athlete*, v. 11, n. 2, p. 40–42, 1998.

TEIXEIRA, F. A. *et al.* Oral creatine supplementation on performance of Quarter Horses used in barrel racing. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 100, n. 3, p. 513–519, 1 jun. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jpn.12411>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

VILLELA, L. C. V.; MOTA, M. D. S.; OLIVEIRA, H. N. Genetic parameters of racing performance traits of Quarter horses in Brazil. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 119, n. 4, p. 229–234, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0388.2002.00338.x>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

VULCANO, Luiz Carlos *et al.* Padronização da densidade mineral óssea (DMO) do acessório do carpo em eqüinos atletas da raça Quarto de Milha. *Ciencia Rural*, v. 36, n. 2, p. 520–524, mar. 2006.

WILLIAMS, Christopher *et al.* An exon splice enhancer primes IGF2:IGF2R binding site structure and function evolution. *Science*, v. 338, n. 6111, p. 1209–1213, 30 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197533>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

WU, You *et al.* Microarray analysis reveals potential biological functions of histone H2B monoubiquitination. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, 15 jul. 2015.

ZIEKER, Derek *et al.* cDNA microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise. *Physiological Genomics*, v. 23, n. 3, p. 287–294, 17 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16118270>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

ZUCHERO, Y. Joy Yu *et al.* Discovery of Novel Blood-Brain Barrier Targets to Enhance Brain Uptake of Therapeutic Antibodies. *Neuron*, v. 89, n. 1, p. 70–82, 6 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26687840>>. Acesso em: 17 mar. 2020.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Painele e genes para customização do TruSeq Targeted RNA Expression com o Gene Symbol, Ensembl ID, Genbank Accession, Gene Name, Localization e Exon

Gene Symbol	Ensembl ID	Genbank Accession	Gene Name	Localization	Exon
TLR-4	ENSECAG00000010339	NCBI	toll like receptor 4	Chromosome 25: 21,966,163-21,976,507 forward strand	Exon count 3
TLR-2	ENSECAG00000018028	NCBI	toll like receptor 2	Chromosome 2: 80,143,503-80,170,045 reverse strand	Exon count 8
MyD88	ENSECAG00000001774	NCBI	myeloid differentiation primary response 88	Chromosome 16: 47,093,285-47,096,316 reverse strand.	Exon count 5
TIRAP	ENSECAG000000012390	NCBI	TIR domain containing adaptor protein	Chromosome 7: 35,105,295-35,107,741 forward strand	Exon count 8
TICAM1	Gene ID: 100062414	NCBI	toll like receptor adaptor molecule 1	Chromosome 7, NC_009150.3 (3401162..3411521, complement)	-
TICAM2	Gene ID: 100529854	NCBI	toll-like receptor adaptor molecule 2	Chromosome 14 (GPC_000003375.1):56,354,108 - 56,376,631	-
TRAM2	ENSECAG000000010916	NCBI	translocation associated membrane protein 2	Chromosome 20: 50,162,197-50,233,536 reverse strand	Exon count 11
NFKB1	ENSECAG000000015042	NCBI	nuclear factor kappa B subunit 1	Chromosome 3: 37,317,740-37,407,632 reverse strand.	Exon count 28
TAB1	ENSECAG000000017245	NCBI	TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 1	Chromosome 28: 36,233,759-36,244,869 forward strand.	Exon count 12
STAT2	ENSECAG000000022326	NCBI	signal transducer and activator of transcription 2	Chromosome 6: 73,982,635-73,993,353 reverse strand	Exon count 24
STAT3	ENSECAG000000016439	NCBI	signal transducer and activator of transcription 3	Chromosome 11: 20,610,215-20,637,153 forward strand.	Exon count 24
STAT4	ENSECAG000000023170	NCBI	signal transducer and activator of transcription 4	Chromosome 18: 67,349,714-67,444,539 reverse strand.	Exon count 25
STAT5A	ENSECAG000000012328	NCBI	signal transducer and activator of transcription 5A	Chromosome 11: 20,641,425-20,659,599 reverse strand.	Exon count 19
ATF3	ENSECAG000000011486	NCBI	activating transcription factor 3	Chromosome 5: 26,065,349-26,077,751 reverse strand	Exon count 7
IRF1	ENSECAG000000017794	NCBI	interferon regulatory factor 1	Chromosome 14: 43,066,114-43,072,270 forward strand.	Exon count 12
IRF5	ENSECAG000000009902	NCBI	interferon regulatory factor 5	Chromosome 4: 83,815,034-83,820,274 forward strand.	Exon count 9
IRF7	ENSECAG000000009744	NCBI	interferon regulatory factor 7	Chromosome 12: 31,760,352-31,763,393 reverse strand.	Exon count 10
IRF9	ENSECAG000000024429	NCBI	interferon regulatory factor 9	Chromosome 1: 162,064,904-162,069,554 forward strand.	Exon count 9
TNFAIP3	ENSECAG000000009626	NCBI	TNF alpha induced protein 3	Chromosome 10: 83,095,482-83,105,236 forward strand.	Exon count 10
BATF3	ENSECAG000000011042	NCBI	basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3	Chromosome 5: 26,005,544-26,014,071 forward strand.	Exon count 3

RELA	ENSECAG00000013763	NCBI	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	Chromosome 12: 25,800,277-26,031,018 reverse strand.	Exon count 11
IL-1A	ENSECAG00000023727	NCBI	interleukin 1 alpha	Chromosome 15: 15,701,256-15,710,378 reverse strand.	Exon count 7
TNF	ENSECAG00000001174	NCBI	tumor necrosis factor	Chromosome 20: 31,358,747-31,360,636 forward strand.	Exon count 4
IL10	ENSECAG00000009179	NCBI	interleukin 10	Chromosome 5: 2,987,183-2,991,116 reverse strand.	Exon count 5
IL6	ENSECAG00000016482	NCBI	interleukin 6	Chromosome 4: 54,422,007-54,426,062 forward strand	Exon count 5
TGFB1	ENSECAG00000011671	NCBI	transforming growth factor beta 1	Chromosome 10: 11,893,629-11,906,388 reverse strand.	Exon count 7
IL1R1	ENSECAG00000016394	NCBI	interleukin 1 receptor type 1	Chromosome 15: 7,464,747-7,540,005 reverse strand.	Exon count 15
AQP9	ENSECAG00000012789	NCBI	aquaporin 9	Chromosome 1: 133,233,259-133,273,779 reverse strand.	Exon count 7
PCDHB7	ENSECAG00000001422	NCBI	protocadherin beta 7	Chromosome 14: 35,759,788-35,762,175 reverse strand.	Exon count 1
BTLA	ENSECAG00000016436	NCBI	B and T lymphocyte associated	Chromosome 19: 45,200,513-45,228,165 forward strand.	Exon count 6

APÊNDICE B – Lista de genes diferencialmente expressos identificados no sequenciamento de nova geração com o seu respectivo transcrito, média nos momentos Basal e M4, *fold change* e o valor de p

Transcrito	Gene	Treino de Esforço 1				Treino de Esforço 2			
		Média		Fold Change	p	Média		Fold Change	p
		Basal	M4			Basal	M4		
ENSECAT00000003236	KRT34	0,30	0,00	0,00	0,8140	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000002048	TNF	0,30	0,00	0,00	0,1690	0,70	0,00	0,00	0,8070
ENSECAT00000002299	MYD88	222,70	319,00	0,13	0,4620	69,00	160,00	0,84	0,7700
		1188,0	3673,3			3381,0	4590,0		
ENSECAT00000003301	UBB	0	0	0,63	0,1640	0	0	0,62	0,8780
					1000,000				
ENSECAT00000004851	Aquaporin 4	0,00	0,00	1,00	0	2,30	0,00	0,00	0,4960
					1000,000				
ENSECAT00000004884	TICAM1	0,00	0,00	1,00	0	0,30	0,30	0,87	1000,0000
					1000,000				
ENSECAT00000005758	IL1RAP	0,00	0,00	1,00	0	0,70	17,70	0,23	0,5850
ENSECAT00000007411	RNF114	137,30	1,00	0,00	0,3040	173,00	66,30	0,17	0,5180
					1000,000				
ENSECAT00000009338	IL10	0,00	0,00	1,00	0	0,70	0,00	0,00	0,7790
ENSECAT00000009822	SLC16A3	45,00	256,70	0,42	0,6470	1,00	3,00	3,10	0,8890
ENSECAT00000010015	TNFAIP3	1,30	0,30	0,03	0,4990	188,00	29,30	0,06	0,4410
ENSECAT00000010020	IRF7	430,00	633,30	0,17	0,2480	102,00	549,70	14,60	0,8410
ENSECAT00000010372	IRF5	87,30	458,70	2,00	0,9790	368,30	511,70	1,10	0,7930
ENSECAT00000010707	TLR4	2,70	360,70	7,70	0,9120	0,70	5,30	0,37	0,7280
					1000,000				
ENSECAT00000011734	RAD50	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000011367	BATF3	0,30	0,70	0,25	0,4640	2,00	0,70	0,02	0,7430
ENSECAT00000011931	ATF3	156,00	0,30	0,00	0,2070	2,00	1,00	0,01	0,8800

ENSECAT00000012588	CD86	1,00	1,30	0,16	0,7930	3,00	1,00	0,20	0,7760
ENSECAT00000012827	TIRAP	1,00	0,00	0,00	0,1800	0,30	0,00	0,00	0,5860
					1000,000				
ENSECAT00000013438	TICAM2	4,30	36,00	0,15	0	1,00	0,30	0,11	0,8720
ENSECAT00000013461	RNF166	92,70	15,30	0,10	0,6740	0,30	0,70	1,40	1000,0000
ENSECAT00000013715	KLF10	0,30	0,70	0,68	0,6830	0,70	25,00	0,78	0,5910
ENSECAT00000014559	VCL	1,00	0,70	0,12	0,8750	65,70	64,00	1,10	0,7470
			5123,3				1208,3		
ENSECAT00000014355	ARHGDIB	45,70	0	11,50	0,0150	790,70	0	1,90	0,9490
ENSECAT00000014845	SLA2	0,30	0,00	0,00	0,8140	70,30	0,00	0,00	0,1280
ENSECAT00000016309	NFKB1	14,00	45,70	0,61	0,8570	2,30	71,70	1,30	0,6720
ENSECAT00000016255	UBE2H	0,70	0,00	0,00	0,1420	0,70	272,00	100,90	0,4050
ENSECAT00000017060	KLHL12	0,70	0,30	0,05	0,7320	1,00	0,30	0,18	0,7070
					1000,000				
ENSECAT00000016697	MYOG	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000017312	NUP50	1,00	28,30	7,50	0,6060	2,00	1,30	0,16	0,9260
ENSECAT00000017645	IL1R1	0,70	0,30	0,01	0,9030	0,30	1,00	0,64	1000,0000
ENSECAT00000017260	BTLA	1,00	0,00	0,00	0,5380	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000017492	IL6	0,30	0,70	0,11	0,4640	1,00	0,30	0,00	0,8820
					1000,000				
ENSECAT00000017688	IL5	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000018007	APPBP2	0,30	0,70	0,40	0,4640	0,30	0,00	0,00	0,5860
					1000,000				
ENSECAT00000018433	TAB1	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000019013	TLR2	3,70	392,00	32,00	0,3830	6,00	217,00	0,99	0,5650
ENSECAT00000019986	TRAM1	81,30	220,70	0,62	0,7790	26,70	136,30	0,98	1000,0000
ENSECAT00000020455	FANCD2	2,30	0,30	0,03	0,7760	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000021108	POLR3A	0,70	0,30	0,16	0,7810	0,00	0,00	1,00	1000,0000

					1000,000				
ENSECAT00000021100	CHRNA1	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000021660	BCL2	1,00	0,70	0,05	0,6640	0,30	0,70	1,10	1000,0000
ENSECAT00000022205	MAPKAP1	0,70	37,00	10,90	0,8120	0,70	8,00	0,18	0,6800
ENSECAT00000021877	ARHGDI	2,70	11,30	0,59	0,9060	148,70	456,30	1,20	1000,0000
ENSECAT00000022506	CDK2	3,70	0,00	0,00	0,2460	1,00	0,30	0,07	0,8700
					1000,000				
ENSECAT00000023364	LAMC2	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000023628	ELF2	1,00	0,30	0,01	0,5630	1,30	74,00	1,40	0,6080
ENSECAT00000024249	STAT2	112,70	252,70	1,40	0,8810	7,30	4,00	0,16	0,8400
					1000,000				
ENSECAT00000023921	CKM	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000024637	CD69	1,30	89,30	8,80	0,8540	2,70	2,00	0,25	0,9310
					1000,000				
ENSECAT00000024744	FOSL1	0,00	0,00	1,00	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000025147	LCK	2,00	249,70	46,00	0,3010	206,30	151,30	0,36	0,5960
ENSECAT00000025746	CUL4B	1,30	192,30	14,20	0,7730	73,00	1,30	0,07	0,2300
ENSECAT00000026310	IRF9	1,00	65,70	24,10	0,5490	7,30	710,00	3,40	0,5880
					1000,000				
ENSECAT00000017076	***	0,00	0,30	Infinity	0	0,00	0,00	1,00	1000,0000
ENSECAT00000019193	***	0,30	0,00	0,00	0,8140	22,30	231,70	47,60	0,7320
ENSECAT00000021394	***	0,70	263,00	11,40	0,8640	1,70	74,00	0,83	0,5560
ENSECAT00000025375	***	0,30	0,70	0,25	0,4640	0,00	0,00	1,00	1000,0000

*** Genes que não anotados em *Equus Cabalus*