

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**MALONDIALDEÍDO, TROPONINA I CARDÍACA
E ELETROCARDIOGRAFIA EM EQÜINOS DA RAÇA PURO
SANGUE ÁRABE SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO
E À SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA
E (DL-ALFA-TOCOFEROL)**

LETÍCIA ANDREZA YONEZAWA

**Botucatu – SP
Fevereiro de 2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**MALONDIALDEÍDO, TROPONINA I CARDÍACA E
ELETROCARDIOGRAFIA EM EQÜINOS DA RAÇA PURO
SANGUE ÁRABE SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO E À
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E (DL-ALFA-TOCOFEROL)**

LETÍCIA ANDREZA YONEZAWA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aguemi Kohayagawa

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Yonezawa, Letícia Andreza.

Malondialdeído, troponina I cardíaca e eletrocardiografia em eqüinos da Raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol) / Letícia Andreza Yonezawa. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Aguemi Kohayagawa

Assunto CAPES: 50501062

1. Eqüino – Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos

CDD 636.10896

Palavras-chave: Eletrocardiograma; Eqüino; Estresse oxidativo; Exercício; Troponina I cardíaca; Vitamina E

Nome do Autor: Letícia Andreza Yonezawa

Título: Malondialdeído, troponina I cardíaca e eletrocardiografia em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol)

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Aguemi Kohayagawa
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes
Membro
Departamento de Clínica Médica
FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 25 de fevereiro de 2008.

Dedicatória



Dedico a meu pai Marino, minha mãe Cazumi, minhas irmãs Lina e Laiza, pelo apoio incondicional em todos os desafios da minha vida e pelos alicerces para formação da pessoa que me tornei

*"No dia em que eu saí de casa minha mãe me disse filho vem cá
Passou a mão em meus cabelos, olhou em meus olhos, começou falar:
'Por onde você for eu sigo com meu pensamento sempre onde estiver
Em minhas orações eu vou pedir a Deus
Que ilumine os passos seus'*

*Eu sei que ela nunca compreendeu
Os meus motivos de sair de lá
Mas ela sabe que depois que cresce
O filho vira passarinho e quer voar
Eu bem queria continuar ali
Mas o destino quis me contrariar
E o olhar de minha mãe na porta
Eu deixei chorando a me abençoar"*

Zezé di Camargo e Luciano

Agradecimentos



“Cada pessoa que passa na nossa vida passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa na nossa vida passa sozinha, mas não vai sozinha e nem nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levam muito e deixam pouco. Há os que levam pouco e deixam muito. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso” Charles Chaplin.

Expresso minha eterna gratidão àqueles que tornaram possível a concretização desta Dissertação, apoiando-me e guiando meu caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo subsídio financeiro por meio da concessão do Auxílio à Pesquisa (03/12077-6) e Bolsa de Mestrado (05/58057-1) para a realização deste trabalho.

Ao **Curso de Pós-graduação** desta Faculdade, por permitir alcançar mais um degrau na minha carreira acadêmica.

Pela orientação, ensinamentos, serenidade, confiança, sabedoria, carinho e preocupação maternal com as orientadas, à querida **Profª Drª Agumi Kohayagawa**. Procuro aprender com cada palavra sua, todos os dias.

Por disponibilizar o Centro de Medicina Esportiva Equina desta Faculdade, compartilhar o conhecimento sobre Medicina Equina, e pelo apoio, ao **Prof. Dr. Armen Thomassian**.

Pela sincera amizade, companheirismo, idas emergenciais ao McDonald's, risos e lágrimas, os quais me motivaram sempre a seguir em frente, e por pacientemente transmitir-me seu amplo conhecimento em Patologia Clínica, à amiga arretada **Veridiana Fernandes da Silveira**.

Pela amizade, colaboração, incontáveis caronas, passeios, paciência, vários momentos de descontração e serviços gráficos, à **Luciana Pereira Machado**.

À **Mere Erika Saito**, que, agora, mesmo tão distante mostra-se sempre presente em minha vida, preocupando-se e aconselhando-me.

Pela cooperação com os animais e com a esteira, pela dedicação ao trabalho e à pesquisa, ao **Marcos Jun Watanabe**. Muito me ajudou desde minha vinda à Botucatu, e espero contar com sua amizade e ensinamentos.

Pela presença nas melhores horas e nas mais difíceis, amizade fraternal, por muitas infrutíferas mas proveitosas conversas, passeios na Rua Amando e o material lavado, ao **Luciano Santos da Fonseca**.

Pela amizade, compreensão da minha ausência, conversas intermináveis sobre cardiologia eqüina, por compartilhar algumas frustrações e muitas risadas, pelos exames ecocardiográficos, à amiga **Lilian Emy dos Santos Michima**.

Pela amizade, bom humor, conselhos, ombro amigo, incentivo e análise estatística dos dados, à querida amiga **Sandra Satiko Kitamura**.

Por todo amor, admiração, compreensão, carinho, paciência, apoio, pela presença mesmo quando ausente, incansável ajuda na etapa final da elaboração deste trabalho e por torná-lo mais bonito, ao **Alex Kiyoshi Nakano**, meu namorado.

Por vários almoços, “baladas japas”, passeios, sorvetes, risadas, brigas e conselhos, à amiga **Satie Katagiri**.

Pela tranquilidade e por realizarem as intermináveis dosagens de troponina, à **Érika** e **Marisa**, técnicas do Serviço de Emergência do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp, Botucatu.

Por sempre estar disposta a ajudar e permitir a realização das determinações laboratoriais, à **Dr^a Adriana Polachini do Valle**, supervisora do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp, Botucatu.

Pela paciência e gentileza, aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp, Botucatu: **Salete, Pedro, Valéria, Rita e Maria José**.

Pelo auxílio nas dosagens de malondialdeído e vitamina E, à **Maria Luiza Cassetari e Silvia Regina T. Estevam**, do Laboratório de Nutrição do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da Unesp, Botucatu.

Pelo cuidado com os animais, carinho e torcida, às meninas da Iniciação Científica, **Cristina de Faria Mantovani, Juliana de Moura Alonso, Renata Cristina Uliani e Talissa Resende Martins**.

Pela ajuda paciente nos ritos burocráticos, à **Denise Aparecida F. Garcia**, à **Maria Aparecida D. de A. Manuel** e ao **José Roberto de Lalla Júnior**, funcionários da Secretaria da Pós-Graduação desta Faculdade.

Pela colaboração e apoio, aos docentes do Laboratório Clínico desta Faculdade, ao **Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes** e à **Prof^a Dr^a Regina Kiomi Takahira**, e do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais, **Prof^a Dr^a Ana Liz Garcia Alves, Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni, José Luiz de Mello Nicoletti**.

Ao **Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes**, que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Pelo carinho, orientação na graduação e por me introduzir ao fascinante mundo do laboratório clínico e do estresse oxidativo, ao **Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani**.

Por muitos ensinamentos sobre análises laboratoriais, dedicação, serenidade, amizade, paciência, broncas, e por desperdiçar muitas de suas preciosas horas comigo, à querida **Regina Mieko Sakata Mirandola**.

Pela orientação fundamental para minha carreira profissional, aos docentes do Serviço de Clínica de Grandes Animais desta Faculdade, **Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges, Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves, Prof. Dr. Rogério Martins Amorim e Prof. Dr. Simone Biagio Chiacchio**.

Pela amizade, alegria e prontidão, à **Marlene Dias Camargo e Izabel Cristina Castro**, funcionárias do Departamento de Clínica Veterinária desta Faculdade.

Pelo companheirismo nas disciplinas, carinho, torcida e amizade, aos queridos amigos da Pós-Graduação: **Yudney Motta, Hugo Leonardo Riani Costa, Aruaque Lotufo Ferraz de Oliveira, Peres Ramos Badial, Paulo Henrique Jorge da Cunha, Roberto Ximenes Bolsanello, Pedro Pinczowski**.

Pelos momentos de “desestresse” e descontração, aos meus queridos amigos do **Softbol da Unesp de Botucatu**, da **Ufscar** e do **Senbatsu**, todos.

Pelas pizzas compartilhadas, risadas, amizade e compreensão, às amigas de república **Arlene Benta de Souza e Flávia Santin**. Elas sabem como eu acordo pela manhã!

Pela compreensão da minha ausência, carinho, e eterna amizade, às melhores amigas desse mundo: **Larissa Muramoto Yano e Tatiana Akemi Hossaka**.

Pelo incentivo e agradável convívio, ao meu cunhado **Nilton Hideaki Ishitani** e toda **Família Ishitani**.

Por toda ternura, afago, e por simplesmente existirem, à **Luna**, minha cadela, e ao **Cookie**, meu gato “emprestado”.

Pelo auxílio com a ficha catalográfica, à **Selma Maria de Jesus**, funcionária da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação.

Pela prontidão e ajuda nos momentos mais inesperados, aos **funcionários do Hospital Veterinário** desta Faculdade.

Pelo apoio e auxílio prestado em diversos momentos, aos **funcionários, residentes e estagiários do Laboratório Clínico e do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais** desta Faculdade.

Pelos maravilhosos e saborosos pães-de-queijo nossos de cada dia, fontes de energia extra para os dias de experimento, aos **funcionários da Lanchonete do Campus**.

A **Deus**. “Que Deus me dê serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para mudar as coisas que posso e sabedoria para distinguir uma coisa da outra.”

E por último, mas não menos importante, expresso minha gratidão aos equinos que, mesmo involuntariamente, contribuíram pacientemente para este trabalho, me “emprestando” seus corações: **Barrosinho, Bel, Dercy, Estrelinha, Grissa, Hectar, Issa, Manu, Miss Hectar, Nadine, Oklana, Olateska, Prima, Raph, Safira e Tyrso**. E ao **Imo**, que não participou do experimento, mas trouxe muitas alegrias à equipe.

Se me deslembrei de alguém, peço que perdoe esta mente já alterada pela idade.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I.....	3
Introdução Geral.....	3
Revisão de Literatura.....	5
CAPÍTULO II.....	14
Resumo.....	15
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	18
Resultados.....	20
Discussão.....	23
Referências.....	26
CAPÍTULO III.....	30
Resumo.....	31
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	33
Resultados.....	36
Discussão.....	38
Referências.....	40
CAPÍTULO IV.....	44
Considerações Finais.....	44
Bibliografia.....	44

Resumo & Abstract



YONEZAWA, L.A. **Malondialdeído, troponina I cardíaca e eletrocardiografia em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol)**. Botucatu, 2008. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o efeito do exercício físico, treinamento e suplementação com vitamina E sobre as concentrações séricas de malondialdeído (MDA), vitamina E e troponina I cardíaca (cTnI), e sobre parâmetros eletrocardiográficos. Utilizou-se, para as determinações séricas, 16 eqüinos da raça Puro Sangue Árabe divididos em dois grupos: controle (n=8) e suplementado com vitamina E (n=8) na dose diária de 1.000 UI. Para a avaliação do eletrocardiograma, foram utilizados oito eqüinos Árabes, divididos em grupos controle (n=4) e suplementado com vitamina E (n=4) na mesma dose. Submeteu-se os animais a uma prova de exercício progressivo (P1) em esteira de alta velocidade inclinada a +7%, em seguida a um período de treinamento de 20 dias e posteriormente uma nova prova de exercício progressivo (P2). Determinou-se as concentrações séricas de MDA, vitamina E e cTnI, e analisou-se os traçados eletrocardiográficos antes e após as provas P1 e P2. O exercício promoveu estresse oxidativo, determinado por meio do aumento de MDA sérico, mas atenuado pela suplementação de vitamina E. Não houve efeito do treinamento sobre este estresse, nem aumento expressivo da concentração de cTnI após o exercício. O eletrocardiograma é eficiente na detecção das alterações cardíacas promovidas pelo exercício físico e de lesão cardíaca leve, mas desconhece-se o significado clínico desta injúria. A vitamina E suplementar não influenciou nos parâmetros eletrocardiográficos.

Palavras-chave: estresse oxidativo, troponina I cardíaca, eletrocardiograma, vitamina E, exercício, eqüino.

YONEZAWA, L.A. **Malondialdehyde, cardiac troponin I, and electrocardiography in Arabian horses submitted to exercise and vitamin E (dl-alpha-tocopherol) supplementation.** Botucatu, 2008. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate physical exercise, training, and vitamin E supplementation effects on serum concentrations of malondialdehyde (MDA), vitamin E, and cardiac troponin I (cTnI), and electrocardiographic parameters. Serum determinations were performed in 16 Arabian horses, divided into two groups: control (n=8) and supplemented with vitamin E (n=8) at the daily dose of 1,000 IU. For evaluation of the electrocardiogram, eight Arabian horses were used, divided into groups control (n=4) and supplemented with vitamin E (n=4) at the same dose. Horses were submitted to a trial of incremental exercise (P1) in high-speed treadmill inclined at +7%, then to a training period of 20 days and a further second trial of incremental exercise (P2). Serum determinations of MDA, vitamin E and cTnI, and analysis of electrocardiographic tracings were performed before and after exercise in P1 and P2. Exercise promoted oxidative stress, as a result of increase of serum MDA, but attenuated by vitamin E supplementation. There were no effect of training on oxidative stress, and no increase significantly in serum cTnI after exercise. Electrocardiogram is efficient in detection of cardiac changes promoted by exercise and slight cardiac injury, but its clinical significance remains unknown. Vitamin E supplementation did not influence on electrocardiographic parameters.

Key words: oxidative stress, cardiac troponin I, electrocardiogram, vitamin E, exercise, horse.

Capítulo 1



1 INTRODUÇÃO GERAL

Entre os animais de esporte, o equino tem a habilidade única em aumentar sua demanda de oxigênio num fator de 60 vezes (ART e LEKEUX, 2005) e sua frequência cardíaca em seis a oito vezes (EVANS, 1999) durante exercício intenso. Além disso, os equinos exibem um metabolismo energético elevado, sendo, portanto, excelentes modelos animais para a investigação de processos de peroxidação e eficiência do sistema antioxidante (GÓRECKA et al., 1999).

O exercício intenso pode levar à exaustão e provocar o estresse oxidativo por aumento do consumo de oxigênio e à constante produção, liberação e propagação de radicais livres e/ou Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) que, ao atingirem grandes proporções, lesam as estruturas celulares do organismo quando os antioxidantes não são suficientes para suprir uma defesa eficiente (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; POWERS e LENNON, 1999).

O músculo cardíaco apresenta um alto metabolismo aeróbico, exibindo uma elevada demanda de oxigênio em condições de repouso e aumenta em grandes proporções durante um exercício físico exaustivo. Essa alta taxa de metabolismo oxidativo é geralmente associada com a produção acrescida de ERO (ATALAY e SEN, 1999).

De acordo com Douglas et al. (1987), o exercício extremo em humanos é amplamente conhecido por apresentar uma variedade de riscos à saúde, embora não se considere a disfunção miocárdica como um risco. Entretanto, os autores ainda observam que, com a participação em eventos cada vez mais exaustivos, o conhecimento da resposta cardíaca tornou-se essencial para a segurança do atleta. Na medicina equina, há a preocupação com a queda de rendimento em decorrência das disfunções cardiovasculares, responsáveis por alterações que se estendem desde a intolerância ao exercício até a morte súbita (KIRYU et al, 1999).

Em equinos, as anormalidades cardíacas são referidas como a terceira maior causa de queda de desempenho em atletas, após as alterações músculo-esqueléticas e respiratórias (MARTIN et al., 2000). Entretanto, a disfunção miocárdica causada pelo exercício parece ser de difícil avaliação (DURANDO et al., 2006).

A lesão conseqüente ao processo de isquemia e reperfusão está relacionada à produção de ERO e lipoperoxidação, danificando as membranas celulares dos cardiomiócitos evidenciado pela presença de troponina I cardíaca (cTnI) no sangue periférico (WHYTE et al., 2000; NEUMAYR et al., 2002). Além disso, é descrita como um mecanismo de injúria miocárdica por causar uma instabilidade elétrica e aumento do potencial arritmogênico do músculo cardíaco (LEROUX et al., 1995).

Considerando o papel potencialmente deletério da produção excessiva de ERO e a evidência de que o exercício induz o estresse oxidativo em eqüinos, a suplementação com antioxidantes objetiva restabelecer ou manter o equilíbrio oxidante/antioxidante e parece ser uma perspectiva promissora para o bem-estar animal e desempenho atlético. A redução de antioxidantes e estresse oxidativo induzidos pelo exercício físico e a conseqüente intolerância a este já foram claramente estabelecidos. Contudo, a suplementação de antioxidantes para melhoria do desempenho atlético ainda precisa ser comprovada (DE MOFFARTS et al., 2005).

A vitamina E reduz os efeitos da lipoperoxidação sobre as estruturas celulares, capturando os radicais livres e diminuindo os lipoperóxidos que são tóxicos e destroem as células. Como o exercício está associado ao estresse oxidativo e ao aumento no consumo de vitamina E (CHOW, 1991) a suplementação com dietas antioxidantes reduz a produção de ERO e lesões celulares (CLAYCOMBE e MEYDANI, 2001).

Apesar das inúmeras pesquisas realizadas sobre o efeito do exercício e suplementação com antioxidantes na dieta em eqüinos, ainda permanecem muitas dúvidas, principalmente a respeito da influência do estresse oxidativo sobre o miocárdio e o efeito do treinamento sobre a resposta cardiovascular. Portanto, o presente trabalho pretendeu avaliar o efeito do exercício progressivo em esteira, do treinamento e da suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol), indiretamente nas células musculares cardíacas, por meio da determinação do malondialdeído e troponina I cardíaca (Capítulo II), além de avaliar a resposta cardiovascular por meio do eletrocardiograma (Capítulo III) em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As reações de óxido-redução fornecem energia para manutenção da integridade e função celulares. A maior parte do oxigênio consumido é transformada em dióxido de carbono e água (WILLIAMS et al., 2004). Contudo, 2 a 5% são reduzidos em metabólitos reativos (SCHNEIDER e DE OLIVEIRA, 2004).

Os radicais livres são definidos como átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo este não emparelhamento de elétrons que confere a alta reatividade e instabilidade (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ASCENSÃO et al., 2003). Entretanto, alguns agentes reativos não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada (FERREIRA e MATSUBARA, 1997) e, como a maioria é derivada do metabolismo do oxigênio, pode-se denominá-los de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (SCHNEIDER e DE OLIVEIRA, 2004), incluindo os radicais livres de oxigênio (HALLIWELL, 1994; KIRSCHVINK et al., 2007).

Pode-se dizer que há estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os mecanismos de produção e neutralização das ERO (ASCENSÃO et al., 2003), ou seja, os sistemas antioxidantes não são suficientes para uma defesa competente, aumentando a vulnerabilidade dos tecidos e componentes celulares às ERO (POWERS e LENNON, 1999). A membrana celular é a mais atingida em decorrência da lipoperoxidação, acarretando alterações em sua estrutura e permeabilidade. Em consequência, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de produtos citotóxicos, que culmina com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Durante a atividade física ocorrem diversas adaptações fisiológicas, sendo necessários ajustes orgânicos, principalmente os cardiovasculares e respiratórios, para compensar e manter o esforço realizado. O exercício físico intenso induz o aumento do consumo de oxigênio e a formação excessiva de ERO associada ao metabolismo energético aumentado (ASCENSÃO et al., 2003). A principal fonte de ERO produzida pelo exercício físico é a cadeia respiratória da mitocôndria, embora os fagócitos ativados, por meio da explosão respiratória, e diversas enzimas, como as oxidases, também

contribuam para o aumento da liberação de ERO (DE MOFFARTS et al., 2005), que acarretam lesões celulares, tissulares e orgânicas, prejudicando o desempenho do atleta (KOURY e DONANGELO, 2003).

As principais dificuldades na tentativa de se estudar os eventos das ERO nos sistemas biológicos são suas concentrações extremamente baixas, alta velocidade de reação e a vida curta e fugaz destes compostos. Devido ao fato de não haver *in vivo* um método adequado para a observação direta desses reativos, muitos investigadores recorrem a métodos indiretos para verificar reações de estresse oxidativo, como a avaliação da lipoperoxidação de membranas indiretamente pela determinação de malondialdeído (MDA) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; JENKINS, 2000). O MDA é o principal produto formado pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, servindo como um conveniente índice para determinar a intensidade do estresse oxidativo (CHIARADIA et al., 1998). Avellini et al. (1995) e Chiaradia et al. (1998) observaram elevações de MDA no plasma de eqüinos após realização de esforço físico, confirmando a ocorrência de estresse oxidativo induzido pelo exercício.

Os antioxidantes normalmente protegem os tecidos contra dano oxidativo excessivo (CHIARADIA et al., 1998). Os efeitos do treinamento físico associados à suplementação da dieta com vitamina E parecem ser capazes de melhorar significativamente os sistemas detoxificadores de ERO (AVELLINI et al., 1995). A suplementação com antioxidantes para a prevenção de lesões oxidativas induzidas pelo exercício é amplamente utilizada em atletas humanos, apesar da falta de consenso sobre a necessidade real de antioxidantes e os benefícios que estes podem promover (DE MOFFARTS et al., 2005).

O músculo cardíaco apresenta um alto metabolismo aeróbico, exibindo uma elevada demanda de oxigênio em condições de repouso, que aumenta em grandes proporções durante um exercício físico exaustivo. Essa alta taxa de metabolismo oxidativo é geralmente associada com a produção acrescida de ERO (ATALAY e SEN, 1999).

Os mecanismos intercorrentes responsáveis pela lesão miocárdica e disfunção cardíaca resultante ainda precisam ser elucidados. Especula-se que a lesão miocárdica possa ser decorrente de uma isquemia durante o exercício

e deva estar associada com o acúmulo de ERO (WHYTE et al., 2000). No entanto, a escassez de trabalhos com humanos que analisam os indicadores de estresse oxidativo e de lesão oxidativa cardíaca limita-se pela dificuldade de obtenção de amostras de tecido cardíaco (ASCENSÃO et al., 2003), podendo extrapolar-se para a espécie eqüina.

Como tecido predominantemente aeróbico, o miocárdio possui atividade da maioria das enzimas antioxidantes mais elevada, comparativamente ao músculo esquelético. Contudo, considerando as altas taxas de consumo de oxigênio e de produção de ERO, a sua capacidade antioxidante parece ser limitada, o que o torna susceptível à lesão tecidual por estresse oxidativo após um período de exercício agudo (ASCENSÃO et al., 2003).

Em humanos, o exercício pode causar lesão miocárdica, sendo evidenciada por marcadores bioquímicos cardioespecíficos e pela ecocardiografia (RIFAI et al., 1999). Dosagens séricas da cTnI são comumente realizadas quando há suspeita de lesão dos cardiomiócitos (KEFFER, 1996). Em medicina veterinária, a cTnI foi descrita como um marcador cardíaco altamente específico e sensível para injúria miocárdica em muitas espécies de mamíferos, sendo que sua estrutura é muito similar entre elas (O'BRIEN et al., 1997).

As troponinas são proteínas que formam parte do aparato contrátil, o complexo troponina-tropomiosina, encontrado dentro dos sarcômeros, agindo na interação cálcio-dependente da miosina com a actina e regulando a contração muscular. Compreendem três diferentes proteínas: a troponinas C, T e I, existentes tanto no músculo esquelético quanto cardíaco e codificadas por diferentes genes (GODOY et al., 1998; COLLINSON et al., 2001).

A troponina I (subunidade inibitória) quando ligada à actina, age em conjunto com a tropomiosina, criando um obstáculo espacial inibindo a interação da actina com a miosina. A troponina C é a subunidade que se liga ao cálcio e a troponina T (subunidade estrutural) liga o complexo troponina à tropomiosina (Figura 1). Na despolarização do sarcolema, há liberação de cálcio no citoplasma e a troponina C remove os efeitos inibitórios da troponina I. Isso faz com que a tropomiosina se desloque, resultando na remoção do obstáculo espacial da interação da actina-miosina e liberação da inibição da actina-miosina-ATPase, permitindo a hidrólise do ATP e a contração muscular.

Quando o cálcio é bombeado de volta para o retículo sarcoplasmático, o complexo reverte para sua conformação original, inibindo a ação da ATPase e permitindo o relaxamento muscular (SNOW e VALBERG, 1994; COLLINSON et al., 2001).

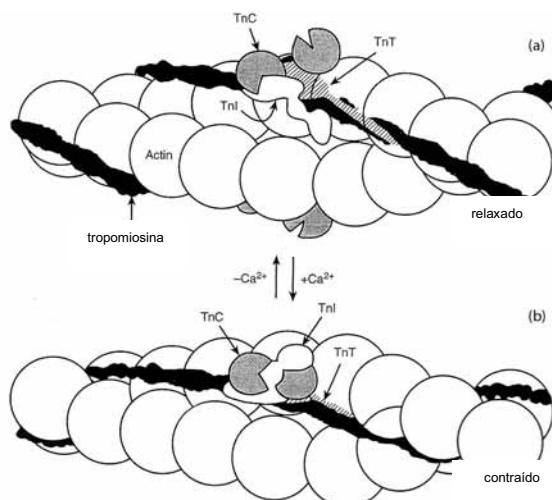


Figura 1. Estrutura do complexo troponina-tropomiosina no relaxamento (a) e na contração muscular (b). TnC: troponina C, TnT: troponina T, TnI: troponina I. (COLLINSON et al., 2001 adaptado)

A troponina C é idêntica tanto no músculo esquelético como no cardíaco (GODOY et al., 1998). A troponina T cardíaca parece ter reação cruzada com a do músculo esquelético (O'BRIEN et al., 1997). A cTnI e a troponina I do músculo esquelético são produtos de diferentes genes com seqüências de aminoácidos únicas. Deste modo, foram desenvolvidos anticorpos monoclonais para cTnI, que exibem uma reação cruzada menor que 0,005% com as formas do músculo esquelético, o que a torna cardioespecífica (ADAMS et al., 1993; RIFAI et al., 1999).

Muitos trabalhos descrevem que a cTnI do miocárdio equino apresenta alta reação cruzada com os *kits* de imunoensaios humanos de cTnI, podendo ser utilizada como biomarcador de lesão de cardiomiócitos (O'BRIEN et al., 1997; CORNELISSE et al., 2000; PHILLIPS et al., 2003; SCHWARZWALD et al., 2003; RISHNIW e SIMPSON, 2005; MICHIMA, 2007). O aumento de seus níveis foi relatado, em eqüinos, em lesão por ruptura aórtica com regurgitação em jato e taquicardia (CORNELISSE et al., 2000), taquicardia ventricular e necrose miocárdica (SCHWARZWALD et al., 2003), intoxicação por monensina e cardiopatia (PEEK et al., 2004), septicemia neonatal (SLACK et al., 2005) e babesiose (DIANA et al., 2007).

Em eqüinos submetidos ao exercício físico, foram estudadas concentrações de cTnI em provas de enduro (HOLBROOK et al., 2006; MICHIMA, 2007) e em exercício progressivo de alta intensidade em esteira (DURANDO et al., 2006). Michima (2007) não observou diferença na concentração sérica de cTnI em eqüinos após prova de enduro, em contraste ao relatado por Holbrook et al. (2006), cuja concentração aumentou após o exercício, mas seu significado clínico é desconhecido.

Durando et al. (2006), avaliando eqüinos submetidos ao exercício intenso de curta duração em esteira de alta velocidade, verificaram que as concentrações máximas de cTnI ocorrem 3 a 6 horas após o exercício. Este período parece ser ótimo para mensurar a cTnI com o intuito de detectar lesão miocárdica induzida pelo exercício em eqüinos.

Em atletas humanos após exercício físico, há lesão na membrana celular do cardiomiócito, aumentando a concentração de cTnI na circulação. Entretanto, essa lesão parece ser transitória e reversível, provavelmente ocasionada por uma isquemia durante o exercício e aumento da permeabilidade decorrente do estresse oxidativo induzido pela sobrecarga de ERO, os quais permitem que somente a fração citosólica, de 2,8 a 8,3% da cTnI total presente no tecido cardíaco, seja liberada (WHYTE et al., 2000; COLLINSON et al., 2001; NEUMAYR et al., 2002).

A lesão decorrente do processo de isquemia e reperfusão está relacionada à produção de ERO, subsequente lipoperoxidação e até rompimento de membranas celulares do miocárdio. Além disso, é descrita como um mecanismo de injúria miocárdica por causar uma instabilidade elétrica e aumento do potencial arritmogênico do músculo cardíaco (LEROUX et al., 1995). Deste modo, outro método de diagnóstico para investigação de processos cardíacos é a eletrocardiografia, cujo papel fundamental é a avaliação da atividade elétrica do coração e de disfunções cardíacas secundárias a distúrbios sistêmicos que podem interferir no desempenho atlético dos animais (WHITE II e RHODE, 1974; REEF, 1999), além de ser de baixo custo, não invasivo e de fácil realização (FREGIN, 1982; FERNANDES et al., 2004).

O eletrocardiograma tem fundamental importância na prática clínica e é baseado na mensuração dos potenciais elétricos do coração, por meio de

múltiplos eletrodos aplicados sobre áreas específicas da pele. As diferenças de voltagens que ocorrem ao longo do ciclo cardíaco, com a despolarização e repolarização das células miocárdicas, são representadas em um gráfico cujos segmentos lineares são intervalados por ondas distintas (BIRETTONI, 2005).

A análise e interpretação do eletrocardiograma se referem, basicamente, a avaliação da frequência cardíaca, ritmo, morfologia das ondas, e amplitude e duração dos complexos e intervalos. Deste modo, avalia-se: 1) despolarização do músculo atrial, representada pela onda P; 2) despolarização dos ventrículos, representada pelo complexo QRS; 3) repolarização ventricular, representada pela onda T; 4) intervalo PR, entre o início da onda P e do complexo QRS que representa o período entre o começo da contração atrial e o da ventricular; 5) intervalo QT, entre o início da onda Q ao final da onda T, que reflete a duração aproximada da sístole ventricular e o período refratário ventricular (Figura 2). A repolarização atrial sempre ocorre simultaneamente com a despolarização dos ventrículos, sendo ocultada pelo complexo QRS (GILMOUR JR e MOÏSE, 2006).

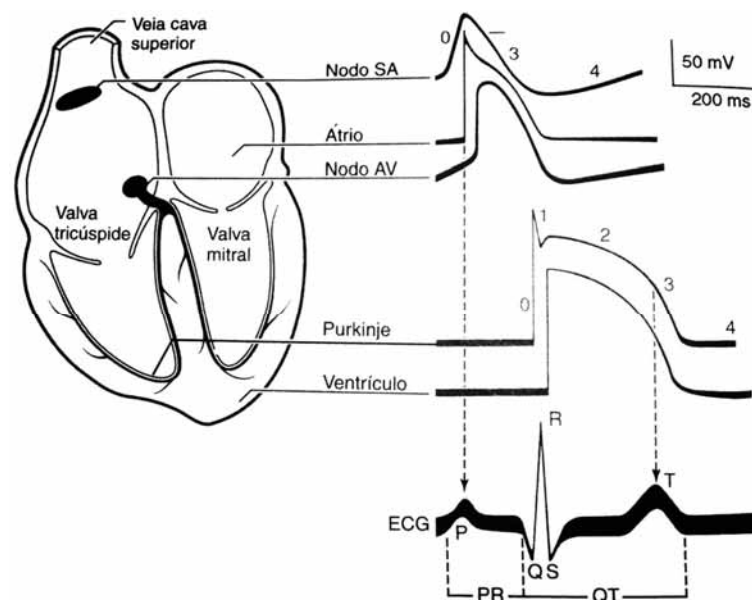


Figura 2. Relação entre potenciais de ação celulares registrados de diferentes regiões do coração e a mensuração das ondas e intervalos no traçado eletrocardiográfico (GILMOUR JR, 2006).

Na medicina eqüina, o exame eletrocardiográfico é necessário para determinar o ritmo cardíaco, não sendo útil para avaliar alterações anatômicas, especialmente as ventriculares, como é possível no cão e no homem. Isso

devido à anatomia distinta do tecido de condução específico do equino. Nesta espécie, as fibras de Purkinje se apresentam profundamente no miocárdio, com um atrelamento muito maior com as células, em relação aos cães e gatos. Assim, a maior parte do miocárdio se despolariza ao mesmo tempo, sem ativação seriada de suas células. Por isso, não se permite estabelecer a correlação entre amplitude ou duração do QRS com as dimensões reais das câmaras ventriculares (BIRETTONI, 2005).

Segundo Jesty et al. (2006), as arritmias cardíacas, no equino, são muito comuns, mas a maioria é benigna. Algumas arritmias aparecem por um breve intervalo imediatamente após o exercício moderado em muitos equinos. Embora o sistema nervoso autônomo provavelmente esteja envolvido na gênese de muitas arritmias, as lesões orgânicas são a causa de muitas outras (SENTA et al., 1970). Utiliza-se o eletrocardiograma, em medicina esportiva equina, para a investigação de queda de desempenho atlético, relacionada com fibrilação, bloqueio atrioventricular completo e contrações atrial e ventricular prematuras (EVANS, 1999).

Uma alteração eletrocardiográfica comumente observada durante ou logo após atividade física é a contração prematura (SENTA et al., 1970; KIRYU et al., 1999). Esta é resultante de uma despolarização prematura de um local ectópico, fora do normal. Quando este ponto ocorre no ventrículo, é denominado contração ventricular prematura (VPC) (Figura 3), caracterizado por um complexo QRS bizarro e freqüentemente sem uma onda P que o precede (SENTA et al., 1970), e com a onda T orientada opostamente ao complexo QRS (REIMER et al., 1992). Holmes e Alps (1966) citam que o exercício pode aumentar a incidência de VPC, provavelmente indicando uma lesão de miocárdio.

Além de verificar a existência de arritmias, o exame eletrocardiográfico é utilizado, na medicina equina, para avaliar o efeito do treinamento. Há evidências de que a “síndrome do coração atleta”, descrito em humanos, ocorre no equino, referindo-se às adaptações fisiológicas, mas que podem ser confundidas com doenças cardíacas ou limitações do desempenho atlético dos animais (EVANS, 1999). Essa síndrome representa uma adaptação reversível, estrutural e funcional do tecido miocárdico, provocado pelo longo e regular treinamento físico.

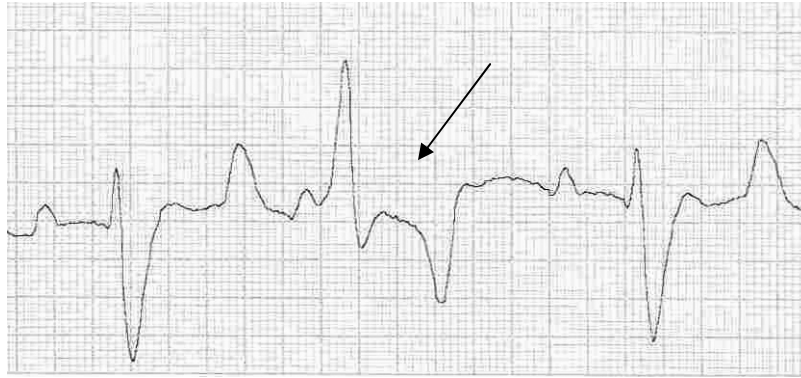


Figura 3. Contração ventricular prematura (VPC) isolada observada em um equino, na derivação DII a 25 mm/s (seta).

No coração do atleta humano, o eletrocardiograma é geralmente normal. Entretanto, algumas alterações podem surgir, como: prolongamento do intervalo PR, leve aumento da amplitude de R, repolarização precoce observada pela elevação do segmento ST, bloqueio incompleto de ramo direito e bradicardia sinusal. Muitos desses padrões são normalizados no eletrocardiograma de esforço, o que pode diferenciar o coração do atleta de uma cardiopatia (OAKLEY e SHEFFIELD, 2001).

Skarda et al. (1976) avaliaram a influência do treinamento sobre a frequência cardíaca, duração dos intervalos PQ e QT e do complexo QRS, no repouso e após exercício submáximo padronizado, durante nove semanas de treinamento em equinos inicialmente sedentários. Entretanto, não observaram alterações significativas que comprovassem uma melhora do estado atlético com o treinamento. Costa et al. (1985) observaram que equinos adultos sem treinamento possuem valores dos parâmetros eletrocardiográficos similares às médias de equinos treinados, porém no limite inferior.

A onda P é um parâmetro que altera em sua morfologia. Geralmente, no equino, a onda P se apresenta bífida, ou seja, com dois componentes: PI e PII. O pico inicial (PI) é produzido pela atividade do átrio direito na direção crânio-caudal. O segundo pico (PII) é formado pela ativação do septo interatrial e estruturas associadas no átrio direito em direção ao esquerdo (HAMLIN et al., 1970).

A forma tipo A é a mais frequentemente observada. Possui um aspecto de “M” maiúsculo, sendo PI e PII positivos (+/+) e é estável no equino. A onda tipo B é constituída por uma onda inicial PI negativa e PII positiva (-/+).

Normalmente, esta forma é transitória e observa-se a transformação do tipo B em A. A onda tipo C é monofásica em arco único, sendo positiva (+) e com maior ocorrência em adultos com taquicardia após esforço (SEVESTRE, 1982).

Fernandes (1994) avaliando em eqüinos de enduro e Piccione et al. (2003), em eqüinos de salto, observaram alterações significativas da duração da onda T e dos intervalos PR e QT após o exercício, concluindo que, à medida que a frequência cardíaca se eleva, modificam-se os referidos parâmetros, em resposta ao tônus simpático para aumentar o débito cardíaco resultante do esforço físico.

A onda T parece ser o parâmetro mais variável no eletrocardiograma do eqüino (HOLMES e REZAKHANI, 1975; SEVESTRE, 1982). As alterações da onda T no eqüino treinado podem ser reflexo de uma adaptação cardíaca ao treinamento, como a hipertrofia cardíaca, que conduz a um bom desempenho durante o exercício físico (EVANS, 1999).

A taquicardia transitória após o exercício parece afetar a direção da onda T, alterando sua polaridade. Sugere-se que o processo de repolarização no miocárdio ventricular deva ser afetado pelo treinamento intensivo e provavelmente por influência direta da duração da diástole e por fatores que afetam essa duração, incluindo os efeitos autonômicos e possivelmente os efeitos metabólicos nas fibras miocárdicas influenciados pela circulação coronariana (HOLMES e REZAKHANI, 1975).

Capítulo 11



Malondialdeído e troponina I cardíaca em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E

Trabalho a ser enviado para o periódico *Equine and Comparative Exercise Physiology*.

ISSN: 1755-2540

Normas para publicação disponível em:

http://assets.cambridge.org/CEP/CEP_ifc.pdf

Malondialdeído e troponina I cardíaca em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E

RESUMO

Para avaliar o efeito do exercício físico, treinamento e suplementação com vitamina E sobre o malondialdeído (MDA) e troponina I cardíaca (cTnI) séricos, utilizou-se 16 eqüinos da raça Puro Sangue Árabe, sedentários, divididos em dois grupos: controle (GC, n=8) e suplementado com vitamina E (GE, n=8) na dose diária de 1.000 UI. Os animais foram submetidos a uma prova de exercício progressivo (P1) em esteira de alta velocidade inclinada a +7%, em seguida a um período de treinamento de 20 dias e posteriormente uma nova prova de exercício progressivo (P2). Determinou-se as concentrações séricas de MDA, vitamina E e cTnI, antes e após as provas P1 e P2. Os resultados sugerem a ocorrência do estresse oxidativo ocasionado pelo exercício, determinado por meio do aumento de MDA sérico, mas atenuado discretamente pela suplementação de vitamina E. Não houve efeito do treinamento sobre o estresse oxidativo, nem aumento expressivo da concentração sérica de cTnI após o exercício. Portanto, conclui-se que o estresse oxidativo ocasionado pelo exercício físico progressivo nestas condições promoveu a lipoperoxidação, mas não foi suficiente para causar uma lesão cardíaca significativa.

Palavras-chave: malondialdeído, troponina I cardíaca, vitamina E, exercício, treinamento, eqüino.

1 INTRODUÇÃO

Em eqüinos, o exercício físico é capaz de promover estresse oxidativo induzido pelo desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante das células e fluidos extracelulares, ocasionando lipoperoxidação das membranas celulares e lesão tecidual^{1,2,3}.

As principais dificuldades na tentativa de se estudar os eventos das ERO nos sistemas biológicos são suas concentrações extremamente baixas, alta velocidade de reação e a vida curta e fugaz destes compostos. Devido ao fato

de não haver *in vivo* um método adequado para a observação direta desses reativos, muitos investigadores recorrem a métodos indiretos para verificar reações de estresse oxidativo, como a avaliação da lipoperoxidação de membranas indiretamente pela determinação de malondialdeído (MDA)^{4,5}. O MDA é o principal produto formado pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, servindo como um conveniente índice para determinar a intensidade do estresse oxidativo². Avellini et al.⁶ e Chiaradia et al.² observaram elevações de MDA no plasma de eqüinos após realização de esforço físico, confirmando a ocorrência de estresse oxidativo induzido pelo exercício.

McMeniman e Hintz⁷, avaliando pôneis submetidos a exercício em esteira e suplementados com vitamina E, observaram uma correlação negativa entre a vitamina E plasmática e os índices de lipoperoxidação, demonstrando o consumo desta devido ao aumento do estresse oxidativo ocasionado pelo exercício físico. Avellini et al.³ demonstraram que o período de treinamento associado à suplementação com vitamina E foram capazes de melhorar significativamente os sistemas antioxidantes de eqüinos.

A suplementação com vitamina E parece influenciar a resposta tecidual do músculo cardíaco em fenômenos de isquemia-reperfusão. Apesar das evidências diretas da ocorrência de estresse oxidativo e de lipoperoxidação, a vitamina E assume um papel determinante na proteção do coração contra situações deletérias decorrentes do exercício agudo⁸.

O músculo cardíaco apresenta um alto metabolismo aeróbico, exibindo uma elevada demanda de oxigênio em condições de repouso, que aumenta em grandes proporções durante um exercício físico exaustivo. Essa alta taxa de metabolismo oxidativo é geralmente associada com a produção acrescida de ERO⁹. Além disso, o miocárdio possui a atividade mais elevada da maioria das enzimas antioxidantes, comparativamente ao músculo esquelético. Contudo, no coração, a sua capacidade antioxidante parece ser limitada, o que o torna susceptível à lesão tecidual por estresse oxidativo após um período de exercício agudo¹⁰.

A injúria miocárdica parece ser de difícil detecção e quantificação nos eqüinos^{11,12}. Na medicina veterinária, a troponina I cardíaca (cTnI) foi descrita como um marcador altamente específico e sensível para injúria miocárdica em

muitas espécies de mamíferos, sendo que sua estrutura é muito similar entre elas¹³. O aumento de seus níveis foi relatado, em eqüinos, na lesão por ruptura aórtica com regurgitação em jato e taquicardia¹⁴, taquicardia ventricular e necrose miocárdica¹⁵, intoxicação por monensina e cardiopatia¹⁶, septicemia neonatal¹⁷ e babesiose¹⁸. Em eqüinos submetidos ao exercício físico, foram estudadas concentrações de cTnI em provas de enduro^{19,20} e no exercício progressivo de alta intensidade em esteira¹².

Apesar do mecanismo responsável pelo aumento da cTnI associado ao exercício ainda ser desconhecido, estudos em ratos revelam evidência histológica de lesão miocárdica localizada e inflamação no ventrículo esquerdo 24 a 48 horas após serem submetidos ao exercício intenso de natação²¹.

Neumayr et al.²² sugerem que, em atletas humanos após exercício físico, há lesão na membrana celular do cardiomiócito, aumentando a concentração de cTnI na circulação. Entretanto, essa lesão é transitória e reversível, provavelmente ocasionada por uma isquemia durante o exercício e aumento da permeabilidade decorrente do estresse oxidativo induzido pela sobrecarga de ERO^{22,23}, os quais permitem que somente a fração citosólica, de 2,8 a 8,3% da cTnI total presente no tecido cardíaco, seja liberada²⁴. Entretanto, a significância desse compartimento citosólico é desconhecida para a espécie eqüina¹⁹.

Durando et al.¹², avaliando em eqüinos o exercício intenso de curta duração em esteira de alta velocidade, verificaram que as concentrações máximas de cTnI ocorrem 3 a 6 horas após o exercício. Este período parece ser ótimo para mensurar a cTnI com o intuito de detectar lesão miocárdica induzida pelo exercício em eqüinos.

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do exercício físico, do treinamento e da suplementação com vitamina E, em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe sobre o estresse oxidativo avaliado por meio do malondialdeído e vitamina E séricos, e sobre lesão cardíaca determinada pela troponina I cardíaca sérica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 16 eqüinos adultos, da raça Puro Sangue Árabe, três machos castrados e 13 fêmeas, sedentários, com idade variando de 4,5 a 12 anos e peso médio de 383kg, clinicamente sadios selecionados mediante exames hematológico, bioquímico sérico, videoendoscopia do aparelho respiratório anterior com o animal em repouso, laringoscopia com o animal em movimento, cinemática do aparelho locomotor, exame eletrocardiográfico de repouso e ecocardiografia bidimensional completa, modo-M e Doppler colorido.

Os animais foram mantidos em piquetes no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista - (Unesp), Campus de Botucatu, sob as mesmas condições de manejo alimentar, sanitário e treinamento. O manejo nutricional consistiu de alimentação à base de feno de capim *coast-cross* (*Cynodon dactylon*), ração comercial para eqüinos (Proequi 13[®], Guabi – Mogiana Alimentos S/A, Campinas, SP, Brasil), suplemento mineral (Sal Mineral Guabiphos Centauro 80[®] – Mogiana Alimentos S/A, Campinas, SP, Brasil) e água *ad libitum*, conforme recomendações de Lewis²⁵. A medicação anti-helmíntica à base de ivermectina (Eqvalan[®], 0,2 mg/kg/VO, Merial Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) foi administrada por via oral a cada oito semanas²⁶.

Os eqüinos foram distribuídos em dois grupos de oito animais: Controle (GC) e Suplementado com Vitamina E (E-Tabs, Sigma Pharma, Hortolândia, SP, Brasil) (GE). A suplementação da vitamina E no grupo GE teve início 15 dias antes da primeira prova de exercício na dose de 1.000 UI/animal, via oral, diariamente, sem interrupção até o final do experimento.

2.2 Delineamento experimental

Foram realizadas duas provas de exercício progressivo, denominadas de P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento), as quais foram realizadas em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG - Kagra, Suíça) inclinada a +7%. O exercício iniciou-se a 5 min no passo a 1,8 m/s, seguindo de 3 min no trote a 4,0 m/s, 2 min no cânter a 6,0 m/s e em seguida 1 min no galope a 8,0 m/s, 9,0 m/s, 10,0 m/s, 11,0 m/s ou até quando o animal pudesse manter-se em exercício, mesmo sendo estimulado²⁷.

Entre P1 e P2 houve intervalo, no qual os animais foram submetidos a um período de treinamento, realizado uma vez ao dia, seis vezes por semana com um dia sem realizar trabalho, até completarem 20 dias. O protocolo de treinamento adotado foi de 5 min a 1,8 m/s (passo), 3 min a 4,0 m/s (trote), 2 min a 6,2 m/s (cânter), 1 min a 8,0 m/s e a 10,0 m/s (galope), seguidos de um período de desaquecimento a 3,0 m/s (trote) por 2 min e a 1,6 m/s (passo) por 2 min²⁷.

Após o último dia de treinamento, os animais não foram submetidos à atividade física por 48 h antes de realizarem a segunda prova de exercício (P2). Em ambas as provas, foi observada a distância percorrida de cada animal.

Amostras de sangue foram colhidas para obtenção de soro (Vacuum II[®] – Labnew Ind. e Com. Ltda., Campinas, SP, Brasil), antes do início do exercício (M0), imediatamente após, e 15 min, 30 min, 2 h, 6 h, 12 h e 24 h após o exercício em ambas as provas, e armazenadas à -80°C até as análises. As amostras destinadas à determinação de vitamina E foram protegidas da luz.

2.3 Exames laboratoriais

As concentrações séricas de MDA e vitamina E foram mensuradas por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (HPLC – Shimadzu Corp., Tóquio, Japão), em fluoroscopia de acordo com Karatas et al.²⁸ e Arnaud et al.²⁹, respectivamente.

A concentração de cTnI foi determinada pela técnica “ELFA” (Ensaio fluorescente ligado à enzima) utilizando *kit* comercial (Vidas[®] Troponin I Ultra – bioMérieux Clinical Diagnostics, Marcy l'Etoile, França), cujo limite de detecção é de 0,01 a 30 µg/L.

Como não há na literatura nenhum trabalho utilizando este *kit* para a espécie eqüina, considerou-se necessária a validação do ensaio. Para isto, utilizou-se 1 g de miocárdio e 1 g de músculo esquelético (glúteo médio) de eqüino macerados e diluídos em solução salina fisiológica nas concentrações 1 g/100 mL (1%) e 1 g/10 mL (10%), conforme BEGG et al.³⁰ modificado. Após filtração e centrifugação, foi determinada a concentração de cTnI nos sobrenadantes, por meio do mesmo *kit* comercial.

2.4 Análise estatística

De acordo com a distribuição dos dados, analisados pelo Teste de Kolgomorov e Smirnov, as variáveis foram avaliadas segundo métodos estatísticos paramétricos ou não-paramétricos. Na ocorrência do primeiro caso, os dados foram inicialmente avaliados através de teste F de análise de variância, e quando significativo, as médias foram confrontadas pelo teste de múltipla amplitude de Tukey³¹. As análises foram processadas com o auxílio do programa estatístico computadorizado³². Todas as análises foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Malondialdeído (MDA) e vitamina E séricos

Avaliando o efeito do exercício progressivo, observa-se, em ambos os grupos e provas, que o MDA apresenta um discreto aumento imediatamente após o exercício, que se acentua em 15 min, com pico máximo em 30 min após. Neste momento houve maior detecção deste composto produzido em decorrência do exercício, porém esta elevação foi significativa apenas em 15 e 30 min do GE na P2 ($p < 0,006$). Os valores basais retornaram em 2 h após o exercício (Figura 1 e Tabela 1).

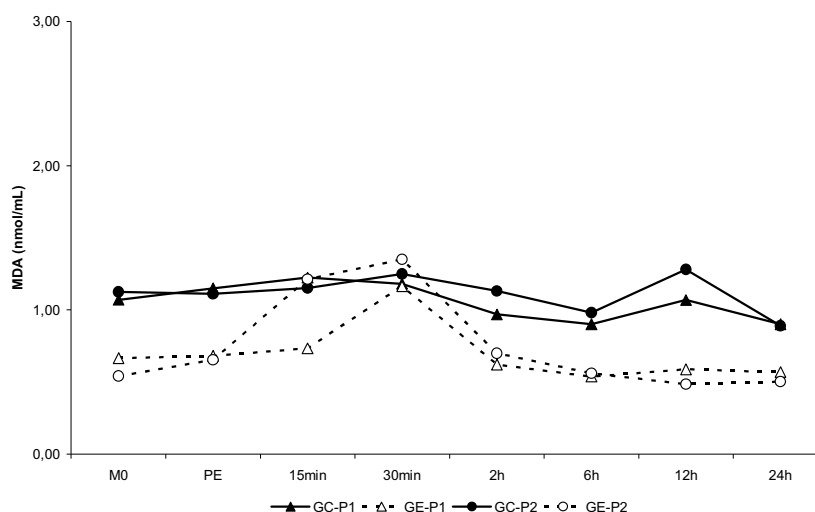


Figura 1. Médias da concentração sérica de malondialdeído (MDA) de equinos da raça Puro Sangue Árabe, nas provas P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento) de exercício progressivo em esteira, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), antes (M0), imediatamente após (PE) e 15 min, 30 min, 2h, 6 h, 12 h e 24 h após o exercício.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão da concentração de malondialdeído (MDA) sérico em equínos da raça Puro Sangue Árabe, nas provas P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento) de exercício progressivo em esteira, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE).

Momentos	MDA (nmol/L)			
	GC		GE	
	P1	P2	P1	P2
M0	1,07 ± 0,67	1,12 ± 0,96	0,66 ± 0,51	0,54 ± 0,3
PE	1,15 ± 0,94	1,11 ± 0,96	0,68 ± 0,31	0,65 ± 0,34
15 min	1,22 ± 0,88	1,15 ± 0,94	0,73 ± 0,38	1,21 ± 0,67*
30 min	1,18 ± 0,88	1,25 ± 0,99	1,16 ± 0,65	1,35 ± 0,85*
2 h	0,97 ± 0,88	1,13 ± 0,91	0,62 ± 0,30	0,70 ± 0,42
6 h	0,90 ± 0,85	0,98 ± 0,89	0,54 ± 0,30	0,56 ± 0,48
12 h	1,07 ± 0,85	1,28 ± 1,10	0,59 ± 0,30	0,48 ± 0,34
24 h	0,90 ± 0,79	0,89 ± 0,70	0,57 ± 0,35	0,50 ± 0,32

*Diferem dos demais momentos do mesmo grupo e prova ($p < 0,006$).

M0: repouso; PE: imediatamente após o exercício.

Ao confrontar as provas de exercício progressivo, não houve diferença do MDA entre P1 e P2, com resultados semelhantes antes e após o treinamento em ambos os grupos.

A análise do efeito da suplementação entre GC e GE não revelou diferença estatística entre os grupos avaliados, porém observa-se que os valores de MDA do GC foram superiores ao do GE em todos os momentos, exceto nos momentos em P2 de 15 e 30 minutos após o exercício.

Não houve diferença significativa entre os valores de vitamina E entre momentos, grupos e provas, entretanto mantiveram-se sempre superiores no grupo suplementado (Figura 2 e Tabela 2).

Observa-se um discreto aumento imediatamente após o exercício e, logo em seguida, um declínio na concentração de vitamina E em 15 min, retornando aos níveis basais somente de 6 h a 12 h após o exercício (Figura 2).

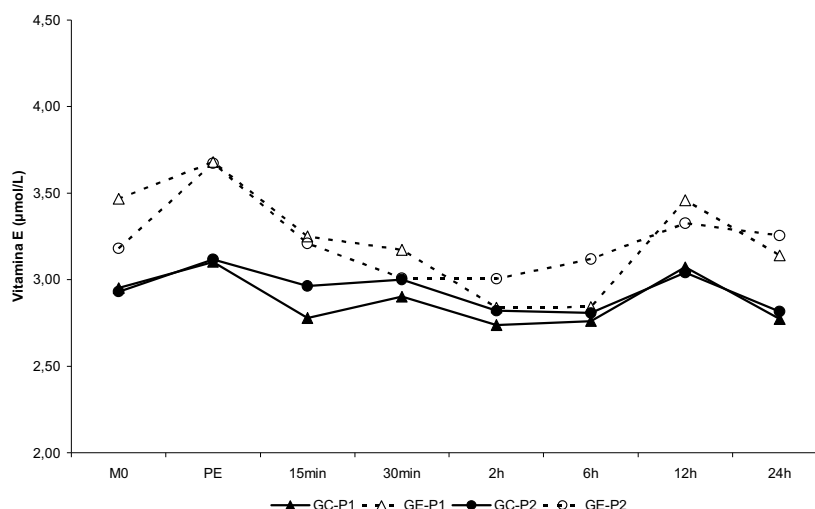


Figura 2. Médias da concentração sérica de vitamina E de eqüinos da raça Puro Sangue Árabe, nas provas P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento) de exercício progressivo em esteira, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), antes (M0), imediatamente após (PE) e 15 min, 30 min, 2h, 6 h, 12 h e 24 h após o exercício.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão da concentração de vitamina E sérica em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe, nas provas P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento) de exercício progressivo em esteira, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE).

Momentos	VITAMINA E (µmol/L)			
	GC		GE	
	P1	P2	P1	P2
M0	2,95 ± 0,98	2,93 ± 0,75	3,47 ± 0,89	3,18 ± 0,98
PE	3,10 ± 0,99	3,12 ± 1,18	3,68 ± 0,99	3,67 ± 1,24
15 min	2,78 ± 0,79	2,96 ± 0,96	3,25 ± 0,72	3,21 ± 0,96
30 min	2,90 ± 0,79	3,00 ± 1,73	3,17 ± 0,77	3,01 ± 0,84
2 h	2,74 ± 0,76	2,82 ± 0,77	2,84 ± 0,76	3,01 ± 0,87
6 h	2,76 ± 0,75	2,81 ± 0,93	2,84 ± 0,56	3,12 ± 0,91
12 h	3,07 ± 0,95	3,04 ± 1,21	3,46 ± 1,15	3,33 ± 1,09
24 h	2,77 ± 0,91	2,81 ± 1,02	3,14 ± 0,73	3,25 ± 1,09

M0: repouso; PE: imediatamente após o exercício.

3.2 Troponina I cardíaca (cTnI)

Utilizando o miocárdio e o músculo esquelético eqüino, foi possível realizar a validação do *kit* comercial empregado. As concentrações de cTnI para as diluições de 1% e 10% foram, respectivamente, 0,10 e 0,53 µg/L no músculo esquelético, e >30,0 µg/L, em ambas as diluições no miocárdio.

A concentração sérica de cTnI, na maioria dos animais e momentos, permaneceu abaixo do limite de detecção do *kit* de $<0,01 \mu\text{g/L}$. Entretanto, elevou-se em três animais do GE em P2, no momento 6 h após o exercício (animais 11, 15 e 16, respectivamente: 0,03; 0,18 $\mu\text{g/L}$ e 0,05), retornando aos níveis basais nos animais 11 e 16 ($<0,01 \mu\text{g/L}$) em 12 h. No animal 15, a concentração permaneceu aumentada (0,06 $\mu\text{g/L}$) em 12 h, mas retornou ao valor de repouso ($<0,01 \mu\text{g/L}$) em 24 h.

4 DISCUSSÃO

Estudos relacionados à suplementação com antioxidantes e o estresse oxidativo no exercício físico aumentam cada vez mais em virtude do maior interesse no bem-estar animal, desempenho atlético e conhecimento da fisiologia do exercício.

As concentrações de MDA deste estudo, no repouso, são superiores às observadas por Silveira³⁵ em 10 eqüinos hígidos da raça Puro Sangue Árabe ($0,039 \pm 0,008 \text{ nmol/mL}$). Em relação à vitamina E, este autor cita a concentração de $3,42 \pm 0,94 \mu\text{mol/L}$ como valor basal em animais não suplementados, sendo superior aos valores de repouso do grupo controle deste estudo e semelhante ao grupo suplementado, em ambas as provas.

Avellini et al.³ demonstraram que a suplementação com vitamina E associada a um período de treinamento de 70 dias foram suficientes para aumentar os sistemas detoxificadores e reduzir as ERO, demonstrados pela diminuição dos níveis plasmáticos de MDA. Embora não apresentando diferença significativa, no presente estudo, os animais do grupo suplementado com vitamina E tiveram menores concentrações séricas de MDA, no repouso e a partir de 2 h após o exercício, sugerindo que a suplementação foi benéfica. Contudo, a suplementação não preveniu o estresse oxidativo provocado pelo exercício, demonstrado pelo aumento de MDA em 15 e 30 min em ambos os grupos e provas, que foi significativo apenas no GE na P2 ($p < 0,006$), mas foi capaz de impedir a propagação deste estresse, evidenciado pelo rápido retorno de MDA aos níveis basais em 2 h.

Silveira³⁵ observou elevação do MDA sérico após exercício progressivo em esteira inclinada a +6% em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe, com o

pico máximo em 30 min após o exercício, retornando aos valores basais apenas em 12 h. Em concordância, o mesmo comportamento evidenciado pela maior concentração de MDA ocorreu em 30 min após o exercício, entretanto, retornou aos valores de repouso em 2 h. Sugere-se que o sistema antioxidante dos eqüinos deste estudo foi mais eficiente evitando a propagação da lipoperoxidação e estabilizando as ERO em menor período de tempo, mesmo em uma prova de maior intensidade.

Para Chiaradia et al.², o exercício físico produz ERO causando a lipoperoxidação, sendo que seus efeitos estão relacionados à intensidade do exercício. Neste estudo, o grupo GE na P2 percorreu maior distância ($p<0,01$) em relação à P1 e apresentou valores de MDA discretamente mais elevados em 15 min e 30 min entre as provas, embora não significativos, demonstrando que o estresse oxidativo foi proporcional a esse maior esforço físico.

Pelos resultados de MDA semelhantes antes e após o treinamento, sugere-se que este protocolo de treinamento não foi capaz de amenizar a lipoperoxidação ocasionada pelo exercício físico.

A concentração sérica da vitamina E sempre se manteve mais elevada no GE em relação ao GC, embora não apresentar diferença estatística. McMeniman e Hintz⁷, Siciliano et al.³³ e Deaton et al.³⁴ não encontraram diferença na concentração plasmática de vitamina E em eqüinos suplementados e submetidos a exercício. No presente estudo, também não foram observadas grandes alterações nos níveis de vitamina E em consequência ao exercício ou treinamento.

O discreto aumento da concentração de vitamina E logo após o exercício, em ambos os grupos e provas, pode estar relacionado à redistribuição deste composto no organismo, a fim de evitar as lesões oxidativas resultantes do exercício, conforme descrito por Silveira³⁵. A diminuição da vitamina E em 15 min coincide com o aumento da concentração de MDA, sugerindo o consumo deste antioxidante para evitar a propagação do estresse oxidativo.

Especula-se que o estresse oxidativo ocasionado pelo exercício físico promove a lipoperoxidação e lesão de membrana dos cardiomiócitos devido ao aumento de ERO, favorecendo a liberação de cTnI do compartimento citosólico e seu aumento na circulação^{22,23}. No entanto, neste estudo, não foi possível

correlacionar as concentrações séricas do indicador de lipoperoxidação, o MDA, com as de cTnI.

Muitos trabalhos descrevem que a cTnI do miocárdio eqüino apresenta alta reação cruzada com os *kits* de imunoensaios humanos de cTnI, podendo ser utilizada como biomarcador de lesão de cardiomiócitos^{11,13,14,15,36}. De acordo com a validação do ensaio, o *kit* comercial utilizado neste experimento, de uso humano, mostrou-se capaz de determinar a troponina I no miocárdio eqüino, com mínima reação cruzada com a troponina I do músculo esquelético.

Observa-se que apenas três animais apresentaram níveis de cTnI superiores ao valor de limite de detecção analítica do teste de 0,01 µg/L. A cinética da cTnI sérica observada nestes animais foi semelhantemente encontrada por Durando et al.¹², que observaram uma elevação discreta das concentrações de cTnI em 3 a 6 horas, retornando aos níveis pré-exercício em 24 horas após exercício de alta intensidade e curta duração em esteira, em eqüinos de corrida de diversas raças.

Michima²⁰, avaliando a concentração sérica de cTnI em eqüinos de enduro, utilizou o valor de 0,3 µg/L como limite de normalidade, baseado no 99º percentil dos resultados obtidos. Considerando como referência, sugere-se que não houve aumento dos níveis de cTnI após o exercício que indiquem uma lesão cardíaca expressiva. Segundo Holbrook et al.¹⁹, em eqüinos, não está definido um limite de concentração de cTnI que considere a gravidade da lesão cardíaca, nem se os mecanismos ou doenças podem causar leve, moderada ou severa elevação desses níveis.

Embora existam poucos relatos sobre a concentração de cTnI em eqüinos saudáveis, estes valores normais são variáveis. Estas diferenças são atribuídas aos diversos sistemas analisadores, que utilizam aminoácidos distintos para composição dos anticorpos monoclonais¹². Para Michima²⁰, a tentativa de extrapolar os resultados com aqueles apresentados na literatura, em eqüinos, é dificultada uma vez que há divergência de metodologias e tipos de amostragem.

Os resultados do presente estudo sugerem que o exercício promoveu estresse oxidativo, sendo este atenuado pela suplementação com vitamina E, mas que não ocasionou lesão miocárdica expressiva. Pôde-se observar que não houve efeito do treinamento sobre esse estresse nestas condições.

Portanto, especula-se que o estresse oxidativo ocasionado pelo exercício físico nestas condições promove a lipoperoxidação, mas não é suficiente para causar uma lesão cardíaca significativa.

Projeto aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 116/2005-CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

5 REFERÊNCIAS

- 1 Avellini L, Chiaradia E, Rueca F, Spaterna A, Gaiti A, Fruganti G (1996) Oxidative stress during exercise in racehorses: relationships between nutrition, training and biochemical defences against free radicals. *Pferdeheilkunde* 12:557-560.
- 2 Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A, Porciello F, Antonioni M et al. (1998) Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 119:833-836.
- 3 Avellini L, Chiaradia E, Gaiti A (1999) Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 123:147-154.
- 4 Ferreira ALA, Matsubara LS (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43:61-68.
- 5 Jenkins RR (2000). Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *American Journal of Clinical Nutrition* 72:670S-674S.
- 6 Avellini L, Silvestrelli M, Gaiti A (1995). Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. *Veterinary Research Communication* 19:179-184.
- 7 McMeniman NP, Hintz HF (1992). Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. *Equine Veterinary Journal* 24:482-484.
- 8 Venditti P, Masullo P, Di Meo S, Agnisola C (1999). Protection against ischemia-reperfusion induced oxidative stress by vitamin E treatment. *Archives of Physiology and Biochemistry* 107:27-34.

- 9 Atalay M, Sen CK (1999). Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* 874:169-177.
- 10 Ascensão A, Magalhães J, Soares J, Oliveira J, Duarte JA (2003). Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 22:651-678.
- 11 Phillips W, Giguère S, Franklin RP, Hernandez J, Adin D, Peloso JG (2003). Cardiac troponin I in pastured and race-training thoroughbred horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17:597-599.
- 12 Durando MM, Reef VB, Kline K, Birks EK (2006). Acute effects of short duration maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 3:217-223.
- 13 O'Brien PJ, Landt Y, Landenson JH (1997). Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. *Clinical Chemistry* 43:2333-2338.
- 14 Cornelisse CJ, Schott HC, Olivier NB, Mullaney TP, Koller A, Wilson DV, et al. (2000). Concentration of cardiac troponin I in a horse with a ruptured aortic regurgitation jet lesion and ventricular tachycardia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217:231-235.
- 15 Schwarzwald CC, Hardy J, Buccellato M (2003). High cardiac troponin I serum concentration in a horse with multiform ventricular tachycardia and myocardial necrosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17:364-368.
- 16 Peek SF, Marques FD, Morgan J, Steinberg H, Zoromski DW, McGuirk S. (2004) Atypical acute monensin toxicosis and delayed cardiomyopathy in belgian draft horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18:761-764.
- 17 Slack JA, McGuirk M, Erb HN, Lien L, Coombs D, Semrad SD, et al. (2005) Biochemical markers of cardiac injury in normal, surviving septic, or nonsurviving septic neonatal foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 577-580.
- 18 Diana A, Guglielmini C, Candini D, Pietra M, Cipone M (2007). Cardiac arrhythmias associated with piroplasmosis in the horse: a case report. *Veterinary Journal* 174:193-195.
- 19 Holbrook TC, Birks EK, Sleeper MM, Durando M (2006). Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. *Equine Veterinary Journal Supplement* 36:27-31.

- 20 Michima LES (2007). Influência do exercício físico prolongado sobre a concentração sérica de troponina I cardíaca e sobre a função cardíaca em cavalos de enduro. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 21 Chen Y, Serfass RC, Mackey-Bojack SM, Kelly KL, Titus JT, Apple F (2000). Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum in rats after stressful, prolonged intense exercise. *Journal of Applied Physiology* 88:1749-1755.
- 22 Neumayr G, Pfister R, Mitterbauer G, Maurer A, Gaenzler H, Sturm W, et al. (2002) Effect of the "Race across the Alps" in elite cyclists on plasma cardiac troponins I and T. *American Journal of Cardiology* 89:484-486.
- 23 Whyte GP, George K, Sharma S, Lumley S, Gates P, Prasad K, et al. (2000). Cardiac fatigue following prolonged endurance exercise of differing distances. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 32:1067-1072.
- 24 Collinson PO, Boa FC, Gaze DC (2001). Measurement of cardiac troponins. *Annals of Clinical Biochemistry* 38:423-449.
- 25 Lewis LD (2000). Nutrição clínica eqüina: alimentação e cuidados. São Paulo: Roca.
- 26 Klei TR (1997). Parasite controls programs. In: Robinson NE (ed). *Current therapy in equine medicine*, 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 709-713.
- 27 Machado LP, Saito ME, Silveira VF, Yonezawa LA, Taconeli CA, Kohayagawa A (2007). Susceptibilidade eritrocitária ao estresse osmótico em eqüinos da raça Árabe: efeito do exercício, treinamento e suplementação com vitamina E. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida Suplemento*, 27:134-136.
- 28 Karatas F, Karatepe M, Baysar A (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 311:76-79.
- 29 Arnaud J, Fortis I, Blachier D, Favier D (1991). Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 572:103-116.

- 30 Begg LM, Hoffmann KL, Begg AP (2006). Serum and plasma cardiac troponin I concentrations in clinically normal Thoroughbreds in training in Australia. *Australian Veterinary Journal* 84:336-337.
- 31 Sampaio IBM (1998). *Estatística aplicada à experimentação animal*, 1st ed. Belo Horizonte: UFMG, 221p.
- 32 Minitab (2000). *The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education – 13.0 Release. User's Manual*. New York: Addison – Wesley.
- 33 Siciliano PD, Parker AL, Lawrence LM (1997). Effect of dietary vitamin E supplementantion on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. *Journal of Animal Science* 75:1553-1560.
- 34 Deaton CM, Marlin DJ, Roberts CA, Smith N, Harris PA, Kelly FJ, et al. (2002) Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. *Equine Veterinary Journal Supplement* 34:58-65.
- 35 Silveira VF (2005). Malondialdeído, vitamina E, cortisol, hemograma e enzimas musculares em eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 36 Rishniw M, Simpson KW (2005). Cloning and sequencing of equine cardiac troponin I and confirmation of its usefulness as a target analyte for commercial troponin I analyzers. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation* 17:582-584.

Capítulo III



Eletrocardiograma em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E

Trabalho a ser enviado para o periódico *Equine and Comparative Exercise Physiology*.

ISSN: 1755-2540

Normas para publicação disponível em:

http://assets.cambridge.org/CEP/CEP_ifc.pdf

Eletrocardiograma em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E

RESUMO

Avaliou-se o efeito do exercício físico, treinamento e suplementação com vitamina E sobre os parâmetros eletrocardiográficos, utilizando oito eqüinos da raça Puro Sangue Árabe, sedentários, divididos em dois grupos: controle (GC, n=8) e suplementado com vitamina E (GE, n=8) na dose diária de 1.000 UI. Os animais foram submetidos a uma prova de exercício progressivo (P1) em esteira de alta velocidade inclinada a +7%, em seguida a um período de treinamento de 20 dias e posteriormente uma nova prova de exercício progressivo (P2). Realizou-se a análise e interpretação dos traçados eletrocardiográficos, quanto ao ritmo, frequência cardíaca, duração e amplitude das ondas e intervalos antes, imediatamente após e 30 min após o exercício progressivo, além da determinação sérica de troponina I cardíaca. Os resultados indicam que o eletrocardiograma é eficiente na detecção das alterações cardíacas promovidas pelo exercício físico, e na detecção de lesão cardíaca leve, associada à determinação de cTnI. A suplementação de vitamina E nestas condições não influenciou os parâmetros eletrocardiográficos.

Palavras-chave: eletrocardiograma, exercício, treinamento, vitamina E, eqüino.

1 INTRODUÇÃO

O exercício extremo em humanos é amplamente conhecido por apresentar uma variedade de riscos à saúde. Embora não se considere a disfunção miocárdica como um risco, observa-se que, com a participação em eventos cada vez mais exaustivos, o conhecimento da resposta cardíaca tornou-se essencial para a segurança do atleta¹.

Na medicina eqüina, há a preocupação com a queda de desempenho em decorrência às disfunções cardiovasculares, responsáveis por alterações que se estendem desde uma intolerância ao exercício até a morte súbita². Do mesmo modo, a suplementação de antioxidantes para melhoria do

desempenho atlético ainda necessita ser comprovada³.

Em eqüinos, as anormalidades cardíacas são referidas como a terceira maior causa de queda de desempenho em atletas, após as alterações músculo-esqueléticas e respiratórias⁴. Entretanto, a disfunção miocárdica causada pelo exercício parece ser de difícil avaliação⁵.

Os mecanismos intercorrentes responsáveis pela lesão miocárdica e disfunção cardíaca resultante ainda precisam ser elucidados. Especula-se que esta lesão possa ocorrer em decorrência de uma isquemia durante o exercício, podendo danificar as membranas celulares do miocárdio, aumentando, assim, a concentração de troponina I cardíaca (cTnI) na circulação^{6,7}. Igualmente, esses mecanismos de injúria miocárdica podem causar uma instabilidade elétrica e aumento do potencial arritmogênico do músculo cardíaco⁸.

O eletrocardiograma é um método de diagnóstico para investigação de processos cardíacos, cujo papel fundamental é a avaliação da atividade elétrica do coração que podem interferir no desempenho atlético dos animais^{9,10}. Além do baixo custo, é um exame não invasivo e de fácil realização^{11,12}. É utilizado, na medicina eqüina, para verificar a existência de arritmias e avaliar o efeito do treinamento.

Segundo Jesty et al.¹³, as arritmias cardíacas, no eqüino, são muito comuns, mas a maioria é benigna. Algumas arritmias aparecem por um breve intervalo imediatamente após o exercício moderado em muitos animais. Embora o sistema nervoso autônomo provavelmente esteja envolvido na gênese de muitas arritmias, as lesões orgânicas são a causa de muitas outras¹⁴.

Há evidências de que a “síndrome do coração atleta”, descrito em humanos, ocorre no eqüino, referindo-se às adaptações fisiológicas, podendo ser confundidas com doenças cardíacas ou limitações do desempenho atlético dos animais¹⁵. Essa síndrome representa uma adaptação reversível, estrutural e funcional do tecido miocárdico, provocado pelo longo e regular treinamento físico. A resposta fisiológica ao exercício físico é caracterizada tanto por modificações transitórias como ajustes estáveis em consequência ao condicionamento do sistema cardiovascular em resposta aos programas de treinamento¹⁶.

Skarda et al.¹⁷ avaliaram a influência do treinamento sobre a frequência

cardíaca, duração dos intervalos PQ e QT e do complexo QRS, no repouso e após exercício submáximo padronizado, durante nove semanas de treinamento em eqüinos inicialmente sedentários. Entretanto, não observaram alterações significativas que comprovassem uma melhora do estado atlético com o treinamento.

Costa et al.¹⁸ observaram, em eqüinos adultos sem treinamento, valores dos parâmetros eletrocardiográficos similares às médias de animais treinados, porém no limite inferior. Chabchoub et al.¹⁹ observaram diferenças na duração da onda T, de QRS e no intervalo QT entre eqüinos considerados de alto e baixo desempenho.

O significado clínico das alterações eletrocardiográficas durante e após o exercício ainda é desconhecido para a espécie eqüina. Por ser muito lábil, a avaliação do eletrocardiograma é extremamente difícil. Por essa razão, é importante definir as características eletrocardiográficas que se modificam com o treinamento, permitindo a diferenciação dos animais que podem apresentar miocardite ou outras alterações patológicas²⁰.

Portanto, o presente estudo objetivou a análise e interpretação do eletrocardiograma de eqüinos da raça Puro Sangue Árabe, submetidos ao exercício progressivo em esteira de alta velocidade, ao treinamento e à suplementação com vitamina E.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados oito eqüinos adultos, da raça Puro Sangue Árabe, fêmeas, sedentárias, com idade variando de 4,5 a 12 anos e peso médio de 383kg, clinicamente sadias e selecionadas mediante exames hematológico, bioquímico sérico, videoendoscopia do aparelho respiratório anterior com o animal em repouso, laringoscopia com o animal em movimento, cinemática do aparelho locomotor, exame eletrocardiográfico de repouso e ecocardiografia bidimensional completa, modo-M e Doppler colorido.

Os animais foram mantidos em piquetes no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista - (Unesp), Campus de Botucatu, sob as mesmas condições

de manejo alimentar, sanitário e treinamento. O manejo nutricional consistiu de alimentação à base de feno de capim *coast-cross* (*Cynodon dactylon*), ração comercial para eqüinos (Proequi 13[®], Guabi – Mogiana Alimentos S/A, Campinas, SP, Brasil), suplemento mineral (Sal Mineral Guabiphos Centauro 80[®] – Mogiana Alimentos S/A, Campinas, SP, Brasil) e água *ad libitum*, conforme recomendações de Lewis²¹. A medicação anti-helmíntica à base de ivermectina (Eqvalan[®], 0,2 mg/kg/VO, Merial Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) foi administrada por via oral a cada oito semanas²².

Os eqüinos foram distribuídos em dois grupos de quatro animais: Controle (GC) e Suplementado com Vitamina E (E-Tabs, Sigma Pharma, Hortolândia, SP, Brasil) (GE). A suplementação da vitamina E no grupo GE teve início 15 dias antes da primeira prova de exercício na dose de 1.000 UI/animal, via oral, diariamente, sem interrupção até o final do experimento.

2.2 Delineamento experimental

Foram realizadas duas provas de exercício progressivo, denominadas de P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento), as quais foram realizadas em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG - Kagra, Suíça) inclinada a +7%. O exercício iniciou-se a 5 min no passo a 1,8 m/s, seguindo de 3 min no trote a 4,0 m/s, 2 min no cânter a 6,0 m/s e em seguida 1 min no galope a 8,0 m/s, 9,0 m/s, 10,0 m/s, 11,0 m/s ou até quando o animal pudesse manter-se em exercício, mesmo sendo estimulado²³.

Entre P1 e P2 houve intervalo, no qual os animais foram submetidos a um período de treinamento, realizado uma vez ao dia, seis vezes por semana com um dia sem realizar trabalho, até completarem 20 dias. O protocolo de treinamento adotado foi de 5 min a 1,8 m/s (passo), 3 min a 4,0 m/s (trote), 2 min a 6,2 m/s (cânter), 1 min a 8,0 m/s e a 10,0 m/s (galope), seguidos de um período de desaquecimento a 3,0 m/s (trote) por 2 min e a 1,6 m/s (passo) por 2 min²³.

Após o último dia de treinamento, os animais não foram submetidos à atividade física por 48 h antes de realizarem a segunda prova de exercício (P2).

Amostras de sangue foram colhidas para obtenção de soro (Vacuum II[®] – Labnew Ind. e Com. Ltda., Campinas, SP, Brasil) antes do início do exercício

(M0), imediatamente após, e 2 h, 6 h, 12 h e 24 h após o exercício em ambas as provas, e armazenadas à -80°C até as análises.

2.3 Exame eletrocardiográfico

O exame eletrocardiográfico foi realizado antes (M0), imediatamente após (PE) e 30 min após o exercício nas provas P1 e P2. Procedeu-se em ambiente fechado sem estímulos externos, com o animal mantido em tronco de contenção com piso revestido por placas de borracha para evitar interferências no traçado. Os eletrodos foram fixados à pele por meio de cliques tipo “jacaré” com algodão, no qual aplicou-se álcool. Os traçados foram obtidos, segundo a técnica descrita por Fregin¹¹, por meio do aparelho ECAFIX ECG-6 (Funbec, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil), registrados e padronizados com sensibilidade de 1 mV = 1 cm, para a derivação bipolar DII em velocidade de 25 mm/s para avaliação do ritmo e frequência cardíaca, e em 50 mm/s para mensurar a duração e amplitude das ondas e intervalos.

2.4 Determinação da troponina I cardíaca (cTnI) sérica

A concentração de cTnI foi determinada pela técnica “ELFA” (Ensaio fluorescente ligado à enzima) utilizando *kit* comercial (Vidas[®] Troponin I Ultra – bioMérieux Clinical Diagnostics, Marcy l'Etoile, França), cujo limite de detecção é de 0,01 a 30 µg/L.

2.5 Análise estatística

De acordo com a distribuição dos dados, analisados pelo Teste de Kolgomorov e Smirnov, as variáveis foram avaliadas segundo métodos estatísticos paramétricos ou não-paramétricos. Na ocorrência do primeiro caso, os dados foram inicialmente avaliados através de teste F de análise de variância, e quando significativo, as médias foram confrontadas pelo teste de múltipla amplitude de Tukey²⁴. No caso de testes não-paramétricos os mesmos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis²⁵. As análises foram processadas com o auxílio do programa estatístico computadorizado²⁶. Todas as análises foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Os dados referentes aos parâmetros eletrocardiográficos estão apresentados em conjunto (oito animais) (Tabela 1), uma vez que não houve efeito da suplementação com vitamina E ($p>0,05$) entre os grupos controle e suplementado.

Tabela 1. Médias ($\pm$ desvios-padrão) da frequência cardíaca, duração de P, amplitude de PII, intervalo PR, duração de QRS, amplitude de R, intervalo QT e duração da onda T, e medianas da amplitude de PI e de Q, em oito equinos da raça Puro Sangue Árabe, nas provas P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento) de exercício progressivo em esteira, no repouso (M0), imediatamente após (PE) e 30 min após o exercício.

Parâmetros eletrocardiográficos	Prova	Momentos		
		M0	PE	30 min
Frequência cardíaca (bpm)	P1	43,1 $\pm$ 5,9 ^{Aa}	88,1 $\pm$ 9,9 ^b	62,5 $\pm$ 16,7 ^c
	P2	35,6 $\pm$ 4,2 ^{Ba}	91,3 $\pm$ 11,3 ^b	62,5 $\pm$ 15,7 ^c
Duração de P (s)	P1	0,097 $\pm$ 0,022	0,092 $\pm$ 0,016	0,099 $\pm$ 0,018
	P2	0,114 $\pm$ 0,018	0,097 $\pm$ 0,020	0,095 $\pm$ 0,019
Amplitude de PI (mV)	P1	0,1232	-0,0941	0,1149
	P2	0,1295	-0,1086	0,1087
Amplitude de PII (mV)	P1	0,237 $\pm$ 0,035	0,304 $\pm$ 0,092	0,202 $\pm$ 0,077
	P2	0,258 $\pm$ 0,060	0,310 $\pm$ 0,082	0,264 $\pm$ 0,100
Intervalo PR (s)	P1	0,239 $\pm$ 0,031 ^a	0,205 $\pm$ 0,028 ^b	0,214 $\pm$ 0,029 ^{ab}
	P2	0,270 $\pm$ 0,035 ^a	0,207 $\pm$ 0,027 ^b	0,229 $\pm$ 0,032 ^b
Duração de QRS (s)	P1	0,107 $\pm$ 0,030	0,107 $\pm$ 0,028	0,111 $\pm$ 0,031
	P2	0,110 $\pm$ 0,029	0,103 $\pm$ 0,028	0,114 $\pm$ 0,034
Amplitude de Q (mV)	P1	0,2668	0,3793	0,3129
	P2	0,2690	0,2649	0,3105
Amplitude de R (mV)	P1	0,553 $\pm$ 0,246	0,600 $\pm$ 0,300	0,502 $\pm$ 0,198
	P2	0,623 $\pm$ 0,220	0,522 $\pm$ 0,215	0,434 $\pm$ 0,283
Intervalo QT (s)	P1	0,363 $\pm$ 0,057 ^a	0,291 $\pm$ 0,043 ^b	0,320 $\pm$ 0,046 ^{ab}
	P2	0,379 $\pm$ 0,043 ^a	0,262 $\pm$ 0,054 ^b	0,332 $\pm$ 0,043 ^b
Duração de T (s)	P1	0,096 $\pm$ 0,044	0,116 $\pm$ 0,059	0,121 $\pm$ 0,036
	P2	0,111 $\pm$ 0,034	0,125 $\pm$ 0,080	0,118 $\pm$ 0,025

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística entre si.

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística entre si.

A frequência cardíaca aumentou significativamente ($p<0,0001$) após o exercício e não retornou aos valores de repouso após 30 min do exercício, em ambas as provas. Houve diminuição significativa com o treinamento, mas

apenas na frequência de repouso ($p < 0,01$).

Observa-se redução significativa, em ambas as provas, dos intervalos PR ($p < 0,05$ em P1 e $p < 0,003$ em P2) e QT ($p < 0,02$ em P1 e $p < 0,0001$ em P2), imediatamente após o exercício, retornando aos valores próximos aos de repouso em 30 min em P1, mas não em P2.

Não houve alterações significativas da duração de QRS e das amplitudes de Q e R.

Em relação às ondas P e T, não houve alterações na duração após o exercício, nem com o treinamento. Entretanto, a morfologia de ambas variaram com o exercício.

Em P1, três animais apresentaram a morfologia da onda P monofásica positiva (+), e nos cinco restantes, bifida e positiva (+/+). Logo após o término do exercício, observou-se alteração na polaridade da onda P, pela ocorrência da forma difásica, com o componente PI negativo e PII positivo (-/+) em sete animais. Após 30 min, três animais ainda permaneceram com a forma difásica (-/+) e os demais retornaram ao normal. Já em P2, todos os eqüinos apresentaram a forma bifida (+/+) no repouso, e seis, a forma difásica (-/+) logo após o exercício, sendo que dois ainda permaneceram com esta 30 min após.

A onda T foi a forma mais variável. Houve uma tendência de inversão da polaridade da onda T na maioria dos animais, tornando-se negativa após o exercício.

Somente três eqüinos (animais 8, 15 e 16) apresentaram contrações ventriculares prematuras (VPC) monomórficas e isoladas imediatamente após o exercício. O animal 8 exibiu dois VPC somente em P1, imediatamente após o exercício. O eqüino 15 apresentou três VPC logo após e um em 30 min após o exercício, em P2. O eqüino 16 apresentou um VPC em P1, e quatro em P2, logo após o exercício em ambas as provas.

O animal 8 não apresentou alteração na concentração sérica de cTnI, permanecendo com o nível de $< 0,01$ $\mu\text{g/L}$. No animal 15, a cTnI se elevou a 0,18 $\mu\text{g/L}$ em 6h, 0,06 $\mu\text{g/L}$ em 12 h e retornou ao valor de repouso em 24 h. No eqüino 16, a cTnI sérica foi 0,05 $\mu\text{g/L}$ em 6 h após o exercício, retornando ao nível inicial de $< 0,01$ $\mu\text{g/L}$ em 12 h. A concentração sérica de cTnI, no restante dos animais, permaneceu abaixo do limite de detecção do *kit* de $< 0,01$ $\mu\text{g/L}$.

4 DISCUSSÃO

Os valores dos parâmetros observados antes do período de treinamento (P1), no repouso (M0), são similares aos da literatura referentes à raça Puro Sangue Árabe citados por Yonezawa et al.²⁷ em 20 eqüinos sedentários, embora o intervalo QT seja maior ($0,3534 \pm 0,0497$ s). Os valores obtidos após o treinamento são semelhantes aos encontrados por Fazio¹⁶ em eqüinos de trote submetidos à corrida de 2.000 m, apesar da duração de QRS ($0,070 \pm 0,0222$ s) seja visivelmente maior.

Os resultados indicam que os parâmetros eletrocardiográficos não retornaram aos valores normais de repouso 30 min após o término do exercício nas duas provas, o mesmo observado por Chabchoub et al.¹⁹ em eqüinos da raça Puro Sangue Árabe de corrida e por Piccione et al.²⁸ em eqüinos de salto.

A frequência cardíaca é determinada pelo equilíbrio entre as atividades simpática e parassimpática, por catecolaminas e temperatura corpórea²⁹. Em P1 e P2, aumentou com o exercício, como observado por Piccione et al.²⁸, em eqüinos de salto. Estes autores atribuíram o estímulo do tônus simpático relacionado à maior frequência cardíaca necessária para acrescer o débito cardíaco resultante do esforço físico.

Muñoz et al.²⁰ verificaram a redução da frequência cardíaca de repouso após o treinamento, em eqüinos da raça Andaluz, assegurando que esta diminuição seja devido ao treinamento e ao menor grau de excitação dos animais quando entram em contato com as pessoas. Neste estudo, observou-se uma menor frequência cardíaca em P2, mas sugere-se que seja devido ao manejo dos animais, uma vez que não houve diminuição durante a fase de recuperação após o exercício.

Em relação ao intervalo PR, houve diminuição significativa após o exercício, como reportado por alguns autores^{14,16,28}, que pode ser explicado pelo aumento da frequência cardíaca.

O intervalo QT diminuiu significativamente com o efeito do exercício físico. Além disso, apresentou-se menor que o valor de repouso durante o período de recuperação (30 min). Senta et al.¹⁴ observaram o mesmo, justificando que provavelmente houve influência dos nervos autonômicos na permeabilidade da membrana celular, alterações eletrolíticas, temperatura e hipóxia da musculatura ventricular, mas não identificou os fatores

primariamente responsáveis pelo intervalo QT mais curto na recuperação.

A morfologia da onda P bífida (+/+) observada na maioria dos animais em repouso é um achado normal no eletrocardiograma do Puro Sangue Inglês, do American Trotter¹¹, do Puro Sangue Árabe²⁷, do Mangalarga³⁰ e de eqüinos da raça Espanhola³¹, podendo ser dividida em componentes I (PI) e II (PII). Esse fenômeno pode ser atribuído aos diferentes pontos de ativação do átrio, confirmados através da vetocardiografia³².

Senta et al.¹⁴, em eqüinos de trote, e Ayala et al.³¹, em eqüinos da raça Espanhola, descreveram que o aumento da frequência cardíaca durante o exercício fez com que houvesse a fusão dos dois componentes e, assim, a onda P assumiu um contorno monofásico positivo. Em contraste, neste estudo observou-se a inversão da polaridade, sendo que a onda P apresentou-se difásica (-/+). Esta alteração pode ser explicada pelo estímulo do átrio direito posterior perto do seio coronário³².

A onda T compreende o parâmetro mais variável do eletrocardiograma³³. Sua interpretação é muito difícil por variar de forma e amplitude³⁴. Ayala et al.³¹ também observou a inversão da polaridade da onda T em eqüinos da raça Espanhola, submetidos a exercício extenuante. A taquicardia transitória parece afetar a direção desta onda, sugerindo que o processo de repolarização no miocárdio ventricular deva ser afetado pela duração da diástole e fatores que afetam essa duração, incluindo efeitos autonômicos e possivelmente os metabólicos nas fibras miocárdicas influenciadas pela circulação coronariana³³.

Não foram utilizados animais que apresentassem alterações eletrocardiográficas de repouso que pudessem interferir no desempenho. Mesmo assim, pôde-se constatar a ocorrência de VPC isolados em três animais após o exercício, ocorrendo somente durante a recuperação do exercício, entre logo após e 30 min após o exercício. Senta et al.¹⁴ acreditam que os VPC desse tipo, após atividade física, são funcionais e induzidos pelo reajuste do tônus nervoso autonômico e, portanto, benignos. Entretanto, em dois animais, foi possível a detecção do aumento de cTnI sérica, sugerindo a ocorrência de uma lesão miocárdica. Porém, pode-se considerar como uma injúria leve, uma vez que Michima³⁵ considera como limite normal de 0,3 µg/L de cTnI, mas que não indica uma lesão cardíaca expressiva.

Portanto, o eletrocardiograma mostrou-se eficiente na avaliação das

alterações cardíacas promovidas pelo exercício físico e na detecção de lesão cardíaca leve, associada à determinação de cTnI. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar o significado clínico desta lesão. A suplementação de vitamina E nestas condições não influenciou os parâmetros eletrocardiográficos.

Projeto aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 116/2005-CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

5 REFERÊNCIAS

- 1 Douglas P, O'Toole M, Douglas W, Hiller B, Hackney K, Reichel N (1987). Cardiac fatigue after prolonged exercise. *Circulation* 76:1206-1213.
- 2 Kiryu K, Machida N, Kashida Y, Yoshihara T, Amada A, Yamamoto T (1999). Pathologic and electrocardiographic findings in sudden cardiac death in racehorses. *Journal of Veterinary Medicine Science* 61:921-928.
- 3 De Moffarts B, Kirschvink N, Pincemail J, Lekeux P (2005). Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained Thoroughbred horses. *The Veterinary Journal* 169:65-74.
- 4 Martin BB, Reef VB, Parente EJ, Sage AD (2000). Causes of poor performance of horses during training, racing, or showing: 348 cases (1992-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216:554-558.
- 5 Durando MM, Reef VB, Kline K, Birks EK (2006). Acute effects of short duration maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 3:217-223.
- 6 Whyte GP, George K, Sharma S, Lumley S, Gates P, Prasad K, et al. (2000). Cardiac fatigue following prolonged endurance exercise of differing distances. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 32:1067-1072.
- 7 Neumayr G, Pfister R, Mitterbauer G, Maurer A, Gaenzler H, Sturm W, et al. (2002). Effect of the "Race across the Alps" in elite cyclists on plasma cardiac troponins I and T. *American Journal of Cardiology* 89:484-486.

- 8 Leroux AJ, Schott HC, Hines MT (1995). Ventricular tachycardia associated with exhaustive exercise in a horse. *Journal of American Veterinary Medical Association* 207:335-337.
- 9 White NA, Rhode EA (1974). Correlation of electrocardiographic findings to clinical disease in the horse. *Journal of American Veterinary Medical Association* 164:46-56.
- 10 Reef VB (1999). Ambulatory and exercise electrocardiography and post-exercise echocardiography. In: Marr CM. *Cardiology of the horse*, Philadelphia: W B Saunders Company, pp.150-160.
- 11 Fregin GF (1982). The equine electrocardiogram with standardized body and limb positions. *Cornell Veterinarian* 72:304-324.
- 12 Fernandes WR, Larsson, MHMA, Alves ALG, Fantoni DT, Belli CL (2004). Características eletrocardiográficas em eqüinos clinicamente normais da raça Puro Sangue Inglês. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 56:143-149.
- 13 Jesty AS, Reef VB (2006). Evaluation of the horse with acute cardiac crisis. *Clinical Techniques in Equine Practice* 5:93-103.
- 14 Senta T, Smetzer DL, Smith CR (1970). Effects of exercise on certain eletrocardiographic parameters and cardiac arrhythmias in the horse. A radiotelemetric study. *Cornell Veterinarian* 60:552-569.
- 15 Evans DL (1999). Cardiac responses to exercise and training. In: Marr CM. *Cardiology of the horse*, Philadelphia: W B Saunders Company, pp.32-46.
- 16 Fazio F, Ferrantelli V, Piccione G, Caola G (2003). Variations in some electrocardiographic parameters in the trotter during racing and training. *Veterinary Research Communications* 27:229-232.
- 17 Skarda RT, Muir WW, Milne DW, Gabel AA (1976). Effects of training on resting and postexercise ECG in Standardbred horses, using a standardized exercise test. *American Journal of Veterinary Research* 37:1485-1488.
- 18 Costa G, Illera M, García-Sacristán A (1985). Electrocardiographical values in non-trained horses. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 32:196-201.
- 19 Chabchoub A, Landolsi F, Oueslati S (1999). Comparaison de la fréquence cardiaque et des paramètres hématologiques et

électrocardiographiques chez le cheval pur-sang arabe performant et non performant em Tunisie. *Revue de Médecine Vétérinaire* 150:467-472.

20 Muñoz A, Castejón F, Rubio MD, Tovar P, Santisteban R (1995). Electrocardiographic alterations in Andalusian horses associated with training. *Journal of Equine Veterinary Science* 15:72-79.

21 Lewis LD (2000). *Nutrição clínica eqüina: alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca.

22 Klei TR (1997). Parasite controls programs. In: Robinson NE (ed). *Current therapy in equine medicine*, 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 709-713.

23 Machado LP, Saito ME, Silveira VF, Yonezawa LA, Taconeli CA, Kohayagawa A (2007). Susceptibilidade eritrocitária ao estresse osmótico em eqüinos da raça Árabe: efeito do exercício, treinamento e suplementação com vitamina E. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida Suplemento*, 27:134-136.

24 Sampaio IBM (1998). *Estatística aplicada à experimentação animal*, 1st ed. Belo Horizonte: UFMG, 221p.

25 Siegel S (1975). *Estatística não-paramétrica*. São Paulo: McGraw-Hill, 350 p.

26 Minitab (2000). *The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education – 13.0 Release. User's Manual*. New York: Addison – Wesley.

27 Yonezawa LA, Silveira VF, Machado LP, Saito ME, Watanabe MJ, Kohayagawa A (2007). Alguns parâmetros eletrocardiográficos em eqüinos da raça Árabe. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida Suplemento*, 27:78-79.

28 Piccione G, Assenza A, Fazio F, Giudice E, Caola G (2003). Electrocardiographic changes induced by physical exercise in the jumper horse. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55:397-404.

29 Hamlin RL, Klepinger WL, Gilpin KW Smith CR (1972). Autonomic control of heart rate in the horse. *American Journal of Physiology* 222:976-978.

30 Vicenzi RC, Larsson MHMA, Fernandes WR (2000). Parâmetros eletrocardiográficos em eqüinos clinicamente normais da raça Mangalarga.

Parte III: amplitude e duração dos complexos e intervalos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 22:194-198.

31 Ayala I, Gutierrez-Panizo C, Benedito JL, Prieto F, Montes A (2000). Morphology and amplitude values of the electrocardiogram of Spanish-bred horses of different ages in the Dubois leads system. *Veterinary Research* 31:347-354.

32 Hamlin RL, Smetzer DL, Senta T, Smith R (1970). Atrial activation paths and P waves in horses. *American Journal of Physiology* 219:306-313.

33 Holmes JR, Rezakhani A (1975). Observations on the T wave of the equine electrocardiogram. *Equine Veterinary Journal* 7:55-62.

34 Sevestre J (1982). A eletrocardiografia no cavalo. *A Hora Veterinária* 2:28-36.

35 Michima LES (2007). Influência do exercício físico prolongado sobre a concentração sérica de troponina I cardíaca e sobre a função cardíaca em cavalos de enduro. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Capítulo IV



1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O exercício físico proporciona inúmeros benefícios ao organismo, porém, o exercício extremo pode acarretar uma variedade de riscos à saúde, principalmente em relação ao estresse oxidativo. A suplementação com antioxidantes objetiva restabelecer ou manter o equilíbrio oxidante/antioxidante e parece ser uma perspectiva promissora para o bem-estar animal e desempenho atlético.

Observou-se que o exercício físico promoveu o estresse oxidativo, determinado pelo aumento do malondialdeído (MDA) sérico. Contudo, a suplementação não preveniu este estresse, mas foi capaz de impedir sua propagação, evidenciado pelo rápido retorno de MDA aos níveis basais.

Neste estudo, não foi possível correlacionar as concentrações séricas do MDA com as de troponina I cardíaca (cTnI), e o protocolo de exercício não foi suficiente para promover uma lesão miocárdica expressiva.

O eletrocardiograma se mostrou eficiente na avaliação das alterações cardíacas promovidas pelo exercício físico e na detecção de lesão cardíaca leve, associada à determinação de cTnI. Entretanto, desconhece-se o significado clínico desta lesão.

Necessita-se de mais estudos referentes ao estresse oxidativo promovido pelo exercício físico relacionado às alterações cardiovasculares, uma vez que ainda há necessidade de elucidar os mecanismos intercorrentes, e se o treinamento e a suplementação com vitamina E melhoram a capacidade antioxidante dos eqüinos, prevenindo lesões orgânicas e, especificamente, cardíacas.

2 BIBLIOGRAFIA (Capítulo I)

ADAMS, J.E.; BODOR, G.S.; DÁVILA-ROMÁN, V.G.; DELMEZ, J.A.; APPLE, F.S.; LADENSON, J.H.; JAFFE, A.S. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*, v.88, p.101-106, 1993.

ART, T.; LEKEUX, P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. *Livest. Prod. Sci.*, v.92, p.101-111, 2005.

ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J.; OLIVEIRA, J.; DUARTE, J.A. Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Rev. Port. Cardiol.*, v.22, n.5, p.651-678, 2003.

ATALAY, M.; SEN, C.K. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Ann. N.Y. Acad.Sci.*, v.874, p.169-177, 1999.

AVELLINI, L.; SILVESTRELLI, M.; GAITI, A. Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. *Vet. Res. Commun.*, v.19, n.3, p.179-184, 1995.

BIRETTONI, F. How to do an electrocardiogram in a horse. (Como eseguire um elettrocardiogramma in um cavallo). In: 11th ANNUAL MEETING OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF EQUINE VETERINARIANS, 2005, Pisa. *Proceedings...* Disponível em:
<<http://www.ivis.org/proceedings/SIVE/2005/howtodo/birettoni.pdf>>. Acesso em 31 Mar 2006.

CHIARADIA, E.; AVELLINI, L.; RUECA, F.; SPATERNA, A.; PORCIELLO, F.; ANTONIONI, M.; GAITI, A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v.119, n.4, p.833-836, 1998.

CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic. Biol Med.*, v.11, n.2, p.215-232, 1991.

CLAYCOMBE, K.J.; MEYDANI, S.N. Vitamin E and genome stability. *Mutat. Res.*, v.475, n.1-2, p.37-44, 2001.

COLLINSON, P.O.; BOA, F.C.; GAZE, D.C. Measurement of cardiac troponins. *Ann. Clin. Biochem.*, London, v.38, n.5, p.423-449, set. 2001.

CORNELISSE, C. J.; SCHOTT, H. C.; OLIVIER, N. B. et al. Concentration of cardiac troponin I in a horse with a ruptured aortic regurgitation jet lesion and

ventricular tachycardia. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, v.217, n.2, p.231-235, jul. 2000.

COSTA, G.; ILLERA, M.; GARCÍA-SACRISTÁN, A. Electrocardiographical values in non-trained horses. *Zentralbl. Veterinarmed A*, v.32, n.3, p.196-201, 1985.

DE MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.*, v.169, p.65-74, 2005.

DIANA, A., GUGLIELMINI, C., CANDINI, D., PIETRA, M., CIPONE, M. Cardiac arrhythmias associated with piroplasmosis in the horse: a case report. *Vet. J.*, v.174, p.193-5, 2007.

DOUGLAS, P.; O'TOOLE, M.; DOUGLAS, W.; HILLER, B.; HACKNEY, K.; REICHEK, N. Cardiac fatigue after prolonged exercise. *Circulation*, v.76, n.6, p.1206-1213, 1987.

DURANDO, M.M.; REEF, V.B.; KLINE, K. et al. Acute effects of short duration maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine Comp. Exercise Physiol.*, v.3, n.4, p.217-223, 2006.

EVANS, D.L. Cardiac responses to exercise and training. In: MARR, C.M. *Cardiology of the horse*. Philadelphia: W B Saunders Company, 1999. chap 3, p.32-46.

FERNANDES, W.R. *Alterações dos parâmetros do eletrocardiograma e da crase sangüínea em eqüinos das raças Árabe e Mangalarga, bem como de mestiços, submetidos à prova de enduro*. 1994. 74p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERNANDES, W.R.; LARSSON, M.H.M.A.; ALVES, A.L.G.; FANTONI, D.T.; BELLI, C.L. Características eletrocardiográficas em eqüinos clinicamente normais da raça Puro Sangue Inglês. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.56, n.2, p.143-149, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FREGIN, G.F. The equine electrocardiogram with standardized body and limb positions. *Cornell Vet.*, v.72, p.304-324, 1982.

GILMOUR JR, R.F. Eletrofisiologia do coração. In: REECE, W.O. *Dukes, Fisiologia dos animais domésticos*. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap.12, p.187-196.

GILMOUR JR, R.F.; MOÏSE, N.S. O eletrocardiograma e arritmias cardíacas. In: REECE, W.O. *Dukes, Fisiologia dos animais domésticos*. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap.13, p.197-207.

GODOY, M.F.; BRAILE, D.M.; PURINI NETO, J. Troponina como marcador de injúria celular miocárdica. *Arq Bras Cardiol*, v.71, n.4, p.629-633, 1998.

GÓRECKA, R.; SITARSKA, E.; KLUCIŃSKI, W.; KLECZKOWSKI, M. Antioxidant status in horses. *Pol J Vet Sci*, v.2, n.3, p.133-136, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HAMLIN, R.L.; HIMES, J.A.; GUTTRIDGE, H.; KIRKHAM, W. P wave in the electrocardiogram of the horse. *Am. J. Vet. Res.*, v.31, n.6, p.1027-1031, 1970.

HOLBROOK, T.C.; BIRKS, E.K., SLEEPER, M.M., DURANDO, M.M. Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. *Equine Vet. J. Suppl.*, v.36, p.27-31, 2006.

HOLMES, J.R.; ALPS, B.J. The effect of exercise on rhythm irregularities in the horse. *Vet. Rec.*, v.78, n.20, p.672-683, 1966.

HOLMES, J.R.; REZAKHANI, A. Observations on the T wave of equine electrocardiogram. *Equine Vet. J.*, v.7, n.2, p.55-62, 1975.

JENKINS, R.R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.72, p.670S-674S, 2000.

JESTY, A.S; REEF, V.B. Evaluation of the horse with acute cardiac crisis. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.5, p.93-103, 2006.

KEFFER, J.H. Myocardial markers of injury. Evolution and insights. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.105, p.305-320, 1996.

KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet. J.*, doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.033. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 03 dez. 2007.

KIRYU, K.; MACHIDA, N.; KASHIDA, Y.; YOSHIHARA, T.; AMADA, A.; YAMAMOTO, T. Pathologic and electrocardiographic findings in sudden cardiac death in racehorses. *J. Vet. Med. Sci.*, v.61, p.921-928, 1999.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Ver. Nutr.*, v.16, n.4, p.433-441, 2003.

LEROUX, A.J.; SCHOTT, H.C.; HINES, M.T. Ventricular tachycardia associated with exhaustive exercise in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.207, n.3, p.335-337, 1995.

MARTIN, B.B.; REEF, V.B.; PARENTE, E.J.; SAGE, A.D. Causes of poor performance of horses during training, racing, or showing: 348 cases (1992-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.216, p.554-558, 2000.

MICHIMA, L.E.S. *Influência do exercício físico prolongado sobre a concentração sérica de troponina I cardíaca e sobre a função cardíaca em cavalos de enduro*. 2007. 94f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NEUMAYR, G.; PFISTER, R.; MITTERBAUER, G.; MAURER, A.; GAENZER, H.; STURM, W.; HOERTNAGL, H. Effect of the “race across the Alps” in elite cyclists on plasma cardiac troponins I and T. *Am. J. Cardiol.*, v.89, n.4, p.484-486, 2002.

O'BRIEN, P.J.; LANDT, Y.; LANDENSON, J.H. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. *Clin. Chem.*, v.43, n.12, p.2333-2338, 1997.

OAKLEY, D.; SHEFFIELD, U.K. The athlete's heart. *Heart*, v.86, p.72-726, 2001.

PEEK, S.F.; MARQUES, F.D.; MORGAN, J.; STEINBERG, H.; ZOROMSKI, D.W.; MCGUIRK, S. Atypical acute monensin toxicosis and delayed cardiomyopathy in belgian draft horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v.18, p.761-764, 2004.

PHILLIPS, W.; GIGUÈRE, S.; FRANKLIN, R.P.; HERNANDEZ, J.; ADIN, D. PELOSO, J.G. Cardiac troponin I in pastured and race-training thoroughbred horses. *J Vet. Intern. Med.*, v.17, p.597-599, 2003.

PICCIONE, G.; ASSENZA, A.; FAZIO, F.; GIUDICE, E.; CAOLA, G. Electrocardiographic changes induced by physical exercise in the jumper horse. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.397-404, 2003.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.*, v.58, n.4, p.1025-1033, 1999.

REEF, V.B. Ambulatory and exercise electrocardiography and post-exercise echocardiography. In: Marr, C.M. *Cardiology of the horse*, Philadelphia: W B Saunders Company, 1999, cap. 10, p.150-160.

REIMER, J.M.; REEF, V.B.; SWEENEY, R.W. Ventricular arrhythmias in horses: 21 cases (1984-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.201, n.8, p.1237-1243, 1992.

RIFAI, N.; DOUGLAS, P.S.; O'TOOLE, M.; RIMM, E.; GINSBURG, G.S. Cardiac troponin T and I, electrocardiographic wall motion analyses, and ejection fractions in athletes participating in the Hawaii Ironman Triathlon. *Am. J. Cardiol.*, v.83, n.7, p.1085-1089, 1999.

RISHNIW, M.; SIMPSON, K.W. Cloning and sequencing of equine cardiac troponin I and confirmation of its usefulness as a target analyte for commercial troponin I analyzers. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, v.17, p.582-584, 2005.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v.10, n.4, p.308-313, 2004.

SCHWARZWALD, C.C.; HARDY, J.; BUCCELLATO, M. High cardiac troponin I serum concentration in a horse with multiform ventricular tachycardia and myocardial necrosis. *J. Vet. Intern. Med.*, v.17, n.3, p.364-368, 2003.

SENTA, T.; SMETZER, D.L.; SMITH, C.R. Effects of exercise on certain eletrocardiographic parameters and cardiac arrhythmias in the horse. A radiotelemetric study. *Cornell Vet.*, v.60, n.4, p.552-569, 1970.

SEVESTRE, J. A eletrocardiografia no cavalo. *Hora Vet.*, v.2, n.10, p.28-36, 1982.

SKARDA, R.T.; MUIR, W.W.; MILNE, D.W.; GABEL, A.A. Effects of training on resting and postexercise ECG in Standardbred horses, using a standardized exercise test. *Am. J. Vet. Res.*, v.37, p.1485-1488, 1976.

SLACK, J.A.; McGUIRK, M.; ERB, H.N.; LIEN, L.; COOMBS, D.; SEMRAD, S.D.; RISEBERG, A.; MARQUES, F.; DARIEN, B.; FALLON, L.; BURNS, P.; MURAKAMI, M. A.; APPLE, F.S.; PEEK, S.F. Biochemical markers of cardiac injury in normal, surviving septic, or nonsurviving septic neonatal foals. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, p.577-580, 2005.

SNOW, D.H.; VALBERG, S.J. Muscle anatomy, physiology and adaptations to exercise and training. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. *The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. cap.8, p.145-180.

WHITE, N.A.; RHODE, E.A. Correlation of electrocardiographic findings to clinical disease in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.164, p.46-56, 1974.

WHYTE, G.P.; GEORGE, K.; SHARMA, S.; LUMLEY, S.; GATES, P.; PRASAD, K.; McKENNA, W.J. Cardiac fatigue following prolonged endurance exercise of differing distances. *Med. Sci. Sports Exercise*, v.32, n.6, p.1067-1072, 2000.

WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M.; SAKER, K.E.; WALDRON, J.N.; CRANDELL, K.M.; HOFFMAN, R.M.; HARRIS, P.A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J. Ani. Sci.*, v.82, n.2, p.588-594, 2004.