

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

**DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES CARDÍACOS E DE
LIPOPEROXIDAÇÃO EM EQUINOS SOB INFLUÊNCIA DE
EXERCÍCIOS DE ALTA E BAIXA INTENSIDADE EM ESTEIRA DE
ALTA VELOCIDADE E SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E
(DL-ALFA-TOCOFEROL)**

LETÍCIA ANDREZA YONEZAWA

Botucatu – SP
2011

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

**DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES CARDÍACOS E DE
LIPOPEROXIDAÇÃO EM EQUINOS SOB INFLUÊNCIA DE
EXERCÍCIOS DE ALTA E BAIXA INTENSIDADE EM ESTEIRA DE
ALTA VELOCIDADE E SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E
(DL-ALFA-TOCOFEROL)**

LETÍCIA ANDREZA YONEZAWA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária
como requisito para obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária, área de
Clínica Veterinária

Orientadora: Profª Drª Aguemi Kohayagawa

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Yonezawa, Letícia Andreza.

Determinação dos marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos sob influência de exercícios de alta e baixa intensidade em esteira de alta velocidade e suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol) / Letícia Andreza Yonezawa. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Aguemi Kohayagawa

Capes: 50501062

1. Equino. 2. Exercícios físicos.

Palavras-chave: Albumina modificada pela isquemia; Antioxidante; Cavalo; CK-MB; Exercício; Malondialdeído; Troponina I cardíaca.

Nome do autor: Letícia Andreza Yonezawa

Título: Determinação dos marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos sob influência de exercícios de alta e baixa intensidade em esteira de alta velocidade e suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol).

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Agnemi Kohayagawa
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – Unesp – Botucatu

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

Profª Drª Maria Lucia Gomes Lourenço
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – Unesp – Botucatu

Profª Drª Maria Helena Matiko Akao Larsson
Membro
Departamento de Clínica Médica
FMVZ – USP

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

Data da defesa: 20 de abril de 2011.

Dedicatória



*Dedico humildemente este fruto do meu esforço,
estudo e trabalho aos meus queridos pais,
Marino Toshiro Yonezawa e Cazumi Hyodo Yonezawa,
que tanto se esforçaram para eu poder alcançar meus objetivos
e obter minhas vitórias.
Espero ser digna do orgulho de vocês.
お世話になりました!*

Agradecimientos



"Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre", Cecília Meireles.

Se hoje conquisto mais um importante degrau em minha carreira acadêmica é porque este trabalho envolveu muitas pessoas e instituições. Expresso minha gratidão eterna àqueles que tornaram tudo isso possível.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo subsídio financeiro por meio da concessão do Auxílio à Pesquisa (08/57366-9) e Bolsa de Doutorado (07/59842-0).

Ao **Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária** desta Faculdade, por permitir minha formação acadêmica.

À querida orientadora **Profª Drª Agnemi Kohayagawa**, por me dar uma oportunidade e confiança na concretização dos projetos de pesquisa, pela constante preocupação maternal em todos esses anos, por tanta sabedoria que pôde compartilhar comigo. Ainda tenho muito a aprender com a senhora!

Ao **Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe**, exemplo de profissionalismo e incansável dedicação à pesquisa e aos cavalos. Agradeço por tantos conselhos e momentos de descontração.

À companheira de equipe **Tatiana de Sousa Barbosa**, pela amizade, pelos inúmeros obstáculos superados, pela cooperação e principalmente pela paciência em me aguentar nos meus melhores e piores dias!

À **Camila Luz Marinho** e **Jhônatas Luís Knaut**, alunos de iniciação científica que acordaram muito cedo, seja sol ou chuva, para nos ajudar com o condicionamento dos cavalos e realização dos testes.

À querida amiga **Lilian Emy dos Santos Michima**, pela amizade, por tantas discussões acerca da cardiologia equina, por ser solidária a algumas frustrações que a pesquisa nos envolve, pelos exames ecocardiográficos e análise estatística dos dados. Peço perdão ao **André** por disputar a atenção de sua mãe e agradeço por sua paciência.

À querida amiga **Mere Erika Saito**, por todo desabafo, por compartilhar seu amplo conhecimento, pelo incansável incentivo, por tanto empenho e energia, pela amizade, por muitas viagens divertidas.

À **Profª Drª Maria Terezinha Serrão Peraçoli**, por tantas horas despendidas para a padronização da anidrase carbônica III, sempre com muita disposição e um sorriso maravilhoso no rosto.

Ao **Prof. Dr. Roberto C. Burini, Fernando Moreto e Silvia Regina T. Estevam**, pelo auxílio nas dosagens de malondialdeído e vitamina E no Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (Cemenutri) da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

À **Drª Débora Damasceno** e à **Bruna Dallaqua** pelas dosagens de troponina I cardíaca, CK-MB e mioglobina no Laboratório Experimental do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Ao **Márcio J. Figueira**, pelas dosagens bioquímicas no Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade.

Aos meus pais **Marino T. Yonezawa e Cazumi H. Yonezawa**, minhas irmãs **Lina A. Yonezawa e Laiza A. Yonezawa**, meu cunhado **Nilton H. Ishitani**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, ao mais novo integrante da família, meu sobrinho **Caio H. Ishitani**, por tornar tudo mais feliz com seu sorriso, e à **Luna** por toda ternura e companheirismo.

Às minhas melhores amigas **Larissa M. Yano** e **Tatiana A. Hossaka**, por compreenderem minha prolongada ausência durante tantos anos e, mesmo assim, puderam me apoiar em cada pequeno ou grande ato em minha vida.

Aos docentes do Laboratório Clínico Veterinário, **Prof^a Dr^a Elizabeth M. dos S. Schmidt**, **Prof. Dr. Raimundo de S. Lopes**, **Prof^a Regina K. Takahira**, pelos aconselhamentos e pelo auxílio na realização do projeto de pesquisa.

Aos docentes da Clínica de Grandes Animais, **Prof. Dr. Alexandre S. Borges**, **Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves**, **Prof. Dr. Rogério M. Amorim** e **Prof. Dr. Simone B. Chiacchio**, que me acolheram e muito me ensinaram desde minha vinda à Botucatu.

Aos docentes da Cirurgia de Grandes Animais, **Prof^a Dr^a Ana Liz G. Alves**, **Prof. Dr. Carlos A. Husni** e **Prof. Dr. Marcos J. Watanabe**, pela colaboração e por permitirem a realização do projeto de pesquisa nas dependências do Centro de Medicina Esportiva Equina.

Às residentes da Cirurgia de Grandes Animais, **Cristina de F. Mantovani**, **Juliana de M. Alonso** e **Karoline A. Rodrigues**, por todo apoio e preocupação com os cavalos.

Aos meus queridos e eternos mestres, **Prof. Dr. Enrico L. Ortolani**, que me mostrou o caminho para o fascinante mundo da pesquisa clínica, e ao **Prof. Dr. Wilson R. Fernandes**, que me motivou a querer continuar percorrê-lo.

À querida **Regina M. S. Mirandola**, por me mostrar o lado bonito do Laboratório Clínico.

Ao **time de Softbol da Unesp de Botucatu**, pelos sete anos de convivência, pelo muito que pude aprender e ensinar, por tantos campeonatos, por cada vitória suada e derrota superada, por tantos churrascos e amistosos. Agradeço a todos que passaram por esse time-família, mas principalmente à **Alina (Kebra)**, **Bruna (Soum)**, **Cíntia (Tiru)**, **Cristina (Tost)**, **Danilo (Sodo)**,

Edson (Dilixo), Fausto (Notoko), Jéssica (Toko), Joyce (Gummys), Juliana (Fia), Marcos (Funga), Mateus (Tong Pô), Renata (Bonsai), Ricardo (Kuna), Rodrigo (Tink), Thaís (Cô).

Aos meus amigos que deixei em São Paulo, **Adriana Y. Kono, Ana Paula M. Prina, Diogo Wakizaka, Felipe H. Tung, Fernanda S. U. Osako, Flávio B. Brandespim, Peng C. Pin, Pérsio H. Kunitake, Sandra S. Kitamura, Tsu Li Chang**, que sempre me retribuíram com todo apoio e compreensão.

Aos amigos da FMVZ de Botucatu, **Ana Lúcia Yoshida, Thiago Osório, Cláudia Z. Garcia, Juliana Junqueira, Lídia M. Matsubara e Livia F. Moraes, Renata M. Venturini**, por tantas risadas, por todo carinho.

Aos amigos médicos veterinários espalhados por esse Brasil afora, **Arlete B. de Souza** (Joinville/SC), **Luciana P. Machado** (Bom Jesus/PI), **Luciano S. da Fonseca** (Teresina/PI), **Satie Katagiri** (Aracaju/SE), **Veridiana F. da Silveira** (Cruz das Almas/BA), por toda torcida.

Aos **funcionários do Hospital Veterinário** desta Faculdade, que cuidaram de nossos cavalos.

Às funcionárias do Departamento de Clínica Veterinária desta Faculdade, **Marlene D. Camargo e Izabel C. Castro**, pela prontidão em ajudar nos ritos burocráticos e pelo bom humor de sempre.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação desta Faculdade, **José R. de Lalla Júnior, Maria Aparecida D. de A. Manuel e Patrícia L. de S. Ramos**, pela paciente disponibilidade em auxiliar nas mais diversas situações.

À **Rosemeire A. Vicente**, funcionária da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação, pelo auxílio com a ficha catalográfica.

A **Deus**, que me garantiu saúde mental e física em todas as adversidades perpassadas, que permitiu a vivência de muitas alegrias e o aprendizado com ambas as situações.

Aos cavalos que foram a alma e coração desse trabalho: **Anabella, Ariel, Batur, Bugre, Issa, Lalau, Manu, Miss Regra, Oklana e Raph.**

Se me deslembrei de alguém, novamente peço que perdoe esta mente alterada ainda mais pela idade.

*"De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.
Portanto, devemos
Fazer da interrupção um caminho novo
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro."*

Fernando Sabino (O encontro marcado)

Lista de siglas e abreviaturas

AMI = albumina modificada pela isquemia

CK-MB = isoenzima MB da creatinoquinase

ERO = espécie reativa de oxigênio

MDA = malondialdeído

MIO = mioglobina

TIC = troponina I cardíaca

TLD = teste de baixa intensidade e longa duração

TRA = teste de rápida aceleração e curta duração

SUMÁRIO

	Página
Lista de siglas e abreviaturas	x
RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I	3
Introdução	3
Revisão de Literatura.....	4
CAPÍTULO II	11
Resumo	12
Introdução.....	13
Material e Métodos.....	15
Resultados.....	17
Discussão.....	21
Conclusões.....	24
Referências.....	25
CAPÍTULO III	29
Resumo	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	38
Conclusões.....	40
Referências.....	41
CAPÍTULO IV	45
Resumo	46
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	48
Resultados.....	50
Discussão.....	51
Conclusões.....	53
Referências.....	54
CAPÍTULO V	57
Considerações Finais.....	57
Bibliografia.....	57

Resumo e Abstract



YONEZAWA, L.A. **Determinação dos marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos sob influência de exercícios de alta e baixa intensidade em esteira de alta velocidade e suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol)**. Botucatu, 2011. 65p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo pretendeu avaliar o efeito fisiológico do exercício sobre os marcadores cardíacos e de lipoperoxidação, o efeito da suplementação com vitamina E, e a determinação da albumina modificada pela isquemia (AMI) como um possível marcador de isquemia miocárdica em equinos sem treinamento prévio e submetidos ao exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA) e de baixa intensidade e longa duração (TLD). Para tanto, foram utilizados 10 equinos, sendo cinco Árabes e cinco Crioulos, sem treinamento prévio, que realizaram o primeiro TRA e, sete dias depois, o TLD1. Em seguida, durante 52 dias os equinos receberam vitamina E (dl-alfa-tocoferol) na dose de 1.000 UI/dia e, posteriormente, realizaram o TRA2 e o TLD2 com sete dias de intervalo. Determinou-se o malondialdeído (MDA) plasmático, as concentrações séricas de troponina I cardíaca (TCI), isoenzima MB da creatinoquinase (CK-MB), mioglobina e AMI. Observou-se que os exercícios dos testes TRA e TLD promoveram estresse miocárdico em equinos evidenciado pelo aumento de CK-MB, mas não foi considerado grave. Houve ainda o efeito benéfico da suplementação da vitamina E pela diminuição da concentração de MDA plasmático em ambos os tipos de exercícios, e de TCI sérica no TRA2. A AMI não se mostrou eficaz na detecção de isquemia miocárdica nos equinos avaliados, uma vez que em ambos os tipos de exercício não promoveram alterações significativas, sugerindo-se que não seja sensível para esse tipo de avaliação nessa espécie.

Palavras-chave: malondialdeído, troponina I cardíaca, CK-MB, mioglobina, albumina modificada pela isquemia, exercício, cavalo, antioxidante.

YONEZAWA, L.A. **Determination of cardiac and lipoperoxidation markers in horses under the influence of high and low intensity exercises on high-speed treadmill and vitamin E (dl-alpha-tocopherol) supplementation.** Botucatu, 2011. 65p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the physiological effect of exercise on cardiac and lipoperoxidation markers, effect of vitamin E supplementation, and ischemia modified albumin (AMI) determination as a possible marker for myocardial ischemia in horses submitted to rapid acceleration and short duration (TRA) exercise and to low intensity and long duration (TLD) exercise. Ten horses, five Arabian and five Crioulo, performed the first TRA, and TLD1 seven days later. Horses received vitamin E (dl-alpha-tocopherol) for 52 days at a daily dose of 1,000 IU, and then they performed TRA2, and TLD2 seven days after. Plasma malondialdehyde (MDA), serum cardiac troponin I (TIC), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), myoglobin and AMI were determined. Both TRA and TLD caused myocardial stress in horses revealed by the CK-MB increase, but it was not considered serious. There was also a beneficial effect of vitamin E by decreased plasma MDA concentration in both types of exercise, and by lower TIC level in TRA2. AMI was not effective in detecting myocardial ischemia in horses, since in both exercise types there were no significant changes, suggesting that it is not a sensitive marker to assess ischemic condition in this species.

Key words: malondialdehyde, cardiac troponin I, CK-MB, myoglobin, ischemia modified albumin, exercise, horse, antioxidant.

Capítulo I



INTRODUÇÃO

O equino é considerado um atleta nato entre os mamíferos uma vez que o sistema cardiovascular evoluiu permitindo o maior consumo de oxigênio em relação às demais espécies. As modificações cardiovasculares ao longo da evolução incluem o coração, cuja frequência cardíaca pode variar de 20 a 240 batimentos por minuto, e a reserva de eritrócitos no baço capaz de dobrar o volume globular e o fornecimento de oxigênio durante o exercício máximo (YOUNG, 2003). Por ser um animal atleta e participante de competições esportivas, há constante preocupação com a queda de desempenho em decorrência de diversas disfunções orgânicas. Dentre elas, as cardiovasculares são responsáveis por alterações que acarretam desde uma intolerância ao exercício até a morte súbita e são referidas como a terceira maior causa de queda de desempenho (MARTIN et al., 2000; YONEZAWA et al., 2009).

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 dos fluidos extracelulares, ocasionando lipoperoxidação das membranas celulares e lesão tecidual (WILLIAMS e CARLUCCI, 2006; YONEZAWA et al., 2010a). Deste modo, 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. Como a deficiência de antioxidantes, o estresse oxidativo induzido e a consequente intolerância ao exercício físico já foram claramente estabelecidos, o oposto, ou seja, a suplementação de antioxidantes para melhoria do desempenho atlético, ainda precisa ser comprovado (DE MOFFARTS et al., 2005; YONEZAWA et al., 2010a).

Um dos antioxidantes amplamente utilizados é a vitamina E (dl-alfa-tocoferol) que reduz os efeitos da peroxidação lipídica sobre as estruturas celulares, capturando as ERO e diminuindo os peróxidos lipídicos que são tóxicos e destroem as células, reduzindo a ocorrência de lesões (CERQUEIRA et al., 2007). Embora haja evidências diretas da ocorrência de estresse oxidativo e de lipoperoxidação, a vitamina E pode promover proteção do coração contra situações deletérias decorrentes do exercício agudo. 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 exacerbada de ERO. Contudo, no coração, a capacidade antioxidante parece ser limitada, tornando-o susceptível à lesão tecidual por estresse oxidativo após um período de exercício agudo (ASCENSÃO et al., 2003; YONEZAWA et al., 2010a).

Ainda não foi totalmente estabelecido se o exercício físico, tanto de curta como o de longa duração, pode promover lesão cardíaca e por qual mecanismo de ação. Especula-se que a lesão miocárdica possa ocorrer em decorrência de uma isquemia durante o exercício e deva estar associada ao acúmulo de ERO (WHYTE et al., 2000). Adicionalmente, em equinos, ainda parece ser difícil a detecção e quantificação da injúria miocárdica.

Embora a prática de exercícios físicos seja amplamente recomendada, a participação em eventos esportivos cada vez mais exaustivos exige o conhecimento da resposta fisiológica cardíaca para a segurança do animal atleta. Portanto, o presente trabalho pretendeu avaliar o efeito fisiológico do exercício e deletério das ERO, sob o ponto de vista bioquímico, sobre as células musculares cardíacas por meio da determinação de marcadores cardíacos séricos e de lipoperoxidação, e o efeito da suplementação com vitamina E em equinos submetidos ao exercício de rápida aceleração e curta duração (Capítulo II) e de baixa intensidade e longa duração (Capítulo III) em esteira de alta velocidade. Além do mais, objetivou-se a determinação da albumina modificada pela isquemia como um provável marcador de isquemia miocárdica na espécie equina (Capítulo IV).

REVISÃO DE LITERATURA

Para a manutenção da integridade e função celular, ocorrem reações de óxido-redução responsáveis pelo fornecimento de energia no organismo. A maior parte do oxigênio consumido é transformada em dióxido de carbono e água (WILLIAMS et al., 2004). Contudo, 1 a 5% são reduzidos em metabólitos reativos ou radicais livres, que são definidos como átomos ou moléculas altamente reativos que contêm um ou mais elétrons não-emparelhados em sua

última camada eletrônica, sendo sua reatividade consequente da atração ao elétron. Os derivados de oxigênio não-radicais, como o ozônio e o peróxido de hidrogênio que são mais reativos que o próprio oxigênio, são também capazes de induzir oxidação. Tanto os radicais livres como os derivados não-radicais são coletivamente denominados de espécies reativas de oxigênio (DEATON e MARLIN, 2003; SOFFLER, 2007).

Embora a mitocôndria se apresente como a principal produtora de ERO, existem outras fontes celulares para sua formação. Algumas se encontram ativas em condições fisiológicas, mas outras são ativadas apenas em circunstâncias especiais, tais como situações de isquemia-reperusão, administração de fármacos ou exercício intenso. Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação, acarretando alterações em sua estrutura e permeabilidade. Como consequência, a lesão oxidativa pode levar à perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas, formação de produtos citotóxicos, inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, ao aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e à morte celular. No entanto, há evidências de que um certo nível de ERO é imprescindível para muitas funções fisiológicas, tais como a transcrição de genes após oxidação transitória, além de baixas concentrações de oxidantes que estimulam a proliferação celular (ASCENSÃO et al., 2003; CERQUEIRA et al., 2007).

As ERO são formadas como parte do metabolismo celular normal, mas podem se tornar prejudiciais causando considerável dano irreversível às células e às membranas celulares, levando à injúria ou doença. Uma vez formadas, as ERO podem iniciar uma cadeia de reações resultando um efeito cascata em muitas outras moléculas dentro das células e em suas membranas, desencadeando o estresse oxidativo (KANE, 2009). Esse fenômeno é ocasionado quando há desequilíbrio entre os mecanismos de produção e neutralização das ERO, de modo que os primeiros sejam os predominantes (YONEZAWA et al., 2010a). O estresse oxidativo pode ocorrer como resultado da produção acrescida de ERO, mas com a capacidade e função oxidantes normais; de uma produção normal de ERO, porém com a capacidade antioxidante diminuída; da combinação de ambas as situações; ou do

desequilíbrio entre os diferentes componentes antioxidantes. Entretanto, a presença de estresse oxidativo não implica necessariamente em dano oxidativo (DEATON e MARLIN, 2003).

Um considerável número de estudos já demonstrou que o exercício físico promove o estresse oxidativo em cavalos, sendo que existem diversos mecanismos de produção de ERO. O exercício aumenta o consumo de oxigênio e a formação excessiva de ERO está associada ao metabolismo energético aumentado. Esse aumento do consumo pode ser de 2 mL/min/kg de peso vivo, no repouso, podendo aumentar a 114,9 mL/min/kg no exercício máximo em equinos segundo Watanabe et al. (2009). A principal fonte de ERO produzida pelo exercício físico é a cadeia respiratória da mitocôndria, embora outros mecanismos como a ativação dos fagócitos pela explosão respiratória e por diversas enzimas, e a auto-oxidação de catecolaminas e da oxi- para meta-hemoglobina também contribuam para o aumento da liberação de ERO (DEATON e MARLIN, 2003; DE MOFFARTS et al., 2005). Essas ERO podem contribuir para lesões celulares, tissulares e orgânicas, prejudicando o desempenho do atleta (ASCENSÃO et al., 2003; KOURY e DONANGELO, 2003).

O estresse oxidativo induzido pelo exercício extremo parece contribuir para uma fadiga muscular acelerada e lesão da fibra muscular, levando à intolerância ao exercício e queda de desempenho atlético nos animais, assim como diminuição da defesa imunológica do organismo (DE MOFFARTS et al., 2005). Para avaliação da intensidade dessa condição, determina-se o malondialdeído (MDA), formado pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, definido como o principal produto da lipoperoxidação (BUEGE e AUST, 1978; LYKKESFELDT e SVENDSEN, 2007). Avellini et al. (1995) e Chiaradia et al. (1998) observaram elevações de MDA no plasma de equinos após realização de esforço físico, confirmando a ocorrência de estresse oxidativo induzido pelo exercício.

Como os componentes celulares não são protegidos totalmente pelos antioxidantes endógenos, é indispensável a obtenção desses componentes na dieta para uma defesa apropriada contra processos oxidativos e manutenção da saúde (CERQUEIRA et al., 2007). 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). Segundo Kirschvink et al. (2007), um achado interessante é o fato de que as alterações dos níveis antioxidantes induzidas pelo exercício não necessariamente aparecem durante ou imediatamente após o exercício, mas sim podem ser detectadas em 16 a 24 horas após. McMeniman e Hintz (1992), 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 pelo aumento do estresse oxidativo induzido pelo exercício.

Embora existam evidências diretas da ocorrência de estresse oxidativo e de lipoperoxidação, a vitamina E pode assumir um papel fundamental na proteção do coração contra situações deletérias decorrentes do exercício agudo. Como o músculo cardíaco apresenta um alto metabolismo aeróbico, exibe 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 (ASCENSÃO et al., 2003; YONEZAWA et al., 2010a). Se por um lado o exercício parece apresentar-se como uma atividade benéfica do ponto de vista da saúde, em contrapartida constitui-se como uma agressão orgânica devido à produção de ERO, quando extenuante. Além disso, no coração, a capacidade antioxidante parece ser limitada, o que parece torná-lo susceptível à lesão tecidual por estresse oxidativo após um período de exercício agudo. Assim, o tecido muscular cardíaco encontra-se vulnerável a essas situações que podem alterar sua homeostasia (ASCENSÃO et al., 2003).

Parece consensual que o exercício agudo promove no coração um aumento dos indicadores oxidativos de lesão celular. No entanto, a escassez de trabalhos com humanos que analisam os indicadores de estresse oxidativo e de lesão oxidativa cardíaca limita-se à dificuldade de obtenção de amostras de tecido cardíaco (ASCENSÃO et al., 2003; YONEZAWA et al., 2010a), podendo extrapolar-se para a espécie equina.

Benderitter et al. (1996) avaliaram em ratos a relação entre as concentrações cardíacas de vitamina E e de marcadores de lipoperoxidação. Verificaram uma diminuição das concentrações do antioxidante nos animais

exercitados até a exaustão, sem quaisquer alterações nas concentrações dos marcadores no coração, permitindo evidenciar o auxílio da vitamina E no combate à lipoperoxidação cardíaca induzida pelo exercício. Outros estudos em ratos verificaram a relação inversa entre os marcadores cardíacos de lipoperoxidação e os diversos sistemas antioxidantes após a realização de diferentes tipos de exercício (POWERS et al., 1993; TIIDUS e HOUSTON, 1994; VENDITTI e DI MEO, 1996; LEEUWENBURGH et al., 1997).

Em humanos, o exercício pode causar elevação de marcadores bioquímicos cardioespecíficos. Dosagens séricas da isoenzima MB da creatinoquinase (CK-MB), de mioglobina e troponina I cardíaca (TIC) são comumente realizadas quando há suspeita de lesão dos cardiomiócitos (COLLINSON e GAZE, 2007). Mas em equinos, parece ser difícil a detecção e quantificação da injúria miocárdica. Tradicionalmente, a concentração sérica da isoenzima CK-MB é mensurada, com limitações baseadas na meia-vida curta e reatividade cruzada com o músculo esquelético (PHILLIPS et al., 2003; MICHIMA et al., 2010). Reimer et al. (1992) relatam aumento da concentração da CK-MB sérica como método de diagnosticar injúria miocárdica em equinos com taquicardia ventricular. A mioglobina é uma hemoproteína presente no citosol tanto das células de músculo estriado esquelético quanto cardíaco (VALBERG, 2008), sendo que sua determinação é rotineiramente utilizada para diagnóstico de infarto agudo do miocárdio em humanos. Entretanto, não possui cardio-especificidade, elevando-se também após lesões musculares esqueléticas (GODOY et al., 1998).

As troponinas cardíacas são consideradas o teste de escolha para determinação de necrose miocárdica em humanos (COLLINSON e GAZE, 2007). Em medicina veterinária, a TIC foi descrita como um marcador cardíaco altamente específico e sensível para injúria miocárdica em muitas espécies de mamíferos, sendo que sua estrutura é muito parecida entre elas (SERRA et al., 2010; YONEZAWA et al., 2010b). Contudo, parece haver diferenças nas respostas espécie-específicas para os vários kits comerciais de determinação disponíveis no mercado (APPLE et al., 2008).

A maior parte da troponina (>90%) está ligada à tropomiosina no filamento fino da miofibrila, sendo que o remanescente é representado por um *pool* citosólico. Até o presente momento, a função desse *pool* ainda é

desconhecida, mas sugere-se que seja um reservatório para regeneração da troponina ligada à tropomiosina (SHAVE et al., 2010).

Segundo Shave et al. (2010), embora haja na literatura muitos trabalhos que relatam elevação da concentração sérica de troponina após atividade física, não há um consenso sobre a prevalência, os mecanismos e o significado clínico da liberação de troponina induzida pelo exercício. Contudo, como a maioria dos dados da literatura envolve indivíduos saudáveis, especula-se que essa liberação seja um processo benigno e que não esteja relacionada com necrose miocárdica (MARTINS, 2009; SHAVE et al., 2010).

Durando et al. (2007), avaliando o exercício intenso de curta duração em esteira de alta velocidade em equinos, verificaram que as concentrações máximas de TIC ocorrem três a seis horas após o exercício. Este período parece ser ótimo para mensurar a TIC com o intuito de detectar lesão miocárdica induzida pelo exercício em equinos. Shave et al. (2004) avaliaram a TIC em atletas após exercício máximo em esteira e não encontraram elevação nas troponinas. Ao contrário do que ocorre em humanos, equinos que realizam um teste de exercício máximo, do qual tornam-se hipoxêmicos, devem apresentar um maior estresse cardiovascular, por isso, correspondem a um leve aumento da TIC (DURANDO et al., 2007).

Os marcadores cardíacos disponíveis atualmente apresentam limitada sensibilidade em casos de condição isquêmica reversível no início da lesão. A albumina modificada pela isquemia (AMI) foi relatada em humanos como marcador capaz de refletir a condição isquêmica do miocárdio, em contraste aos demais marcadores cardíacos que são liberados quando ocorre necrose. Trata-se do único teste clínico para detecção de isquemia miocárdica aprovado pelo FDA americano (*U.S. Food and Drug Administration*) (SBAROUNI et al., 2008; LEE et al., 2010; YONEZAWA et al., 2010b). Lee et al. (2007) demonstraram que a AMI apresentou sensibilidade maior como marcador de triagem em relação aos demais marcadores cardíacos (mioglobina, CK-MB e troponina T cardíaca) para identificar se pacientes com dor torácica e suspeita de síndromes coronarianas agudas necessitavam de terapia intensiva ou tratamento de emergência.

A albumina possui a característica de se ligar a várias moléculas, agindo como um agente quelante para moléculas tóxicas endógenas ou exógenas na

circulação. A porção amino-terminal da albumina é o local de ligação para metais de transição como o cobalto, cobre e níquel. Durante a isquemia, essa porção é alterada, possivelmente como resultado de hipóxia, acidose, injúria causada por ERO ou exposição ao ferro e cobre livres, reduzindo sua afinidade aos metais. O aumento da quantidade de AMI resulta em menor ligação ao cobalto, que fica disponível na forma residual para formar o complexo com o cromógeno, que é mensurado fotometricamente. Essa é a base para o teste de ligação do cobalto à albumina (LEE et al., 2007; SBAROUNI et al., 2008; KIM et al., 2008; LEE et al., 2010; YONEZAWA et al., 2010b; SBAROUNI et al., 2011). Para Piva et al. (2010), a AMI também pode ser utilizada como indicador de estresse oxidativo.

Há relatos que a concentração de AMI aumenta dentro de seis a dez minutos após o início da isquemia miocárdica, permanecendo elevada por até seis horas, permitindo a detecção de condição isquêmica antes do desenvolvimento de necrose miocárdica evidenciada pela mensuração de CK-MB, troponina cardíaca e mioglobina (CHRISTENSON et al., 2001; SBAROUNI et al., 2008). Considerando a depuração da AMI, as alterações à molécula de albumina não são irreversíveis, e podem retornar às condições pré-isquêmicas em poucas horas (12 a 24 h) com a remoção das ERO ou rápida depuração devido a modificações conformacionais da proteína (SBAROUNI et al., 2011).

Muitos estudos foram realizados avaliando o valor da AMI como marcador de isquemia em pessoas que realizaram diversos tipos de atividade física (APPLE et al., 2002; ROY et al., 2004; VAN DER ZEE et al., 2005; SBAROUNI et al., 2006; KIM et al., 2008; LEE et al., 2010). Sabe-se que não há uma resposta homogênea em alterações dos níveis de AMI induzidas pelo exercício e há um consenso que novos estudos devem ser realizados para suprir a carência dessas informações. Em medicina veterinária, não há dados referentes à AMI, sendo o presente estudo o primeiro relato de utilização como marcador de isquemia cardíaca.

Capítulo II



Efeito da suplementação com vitamina E sobre os metabolismos oxidativo e cardíaco em equinos submetidos a exercício de alta intensidade em esteira

Artigo a ser enviado para o periódico *Comparative Exercise Physiology*.

ISSN: 1755-2540

Normas para publicação disponível em:

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

Efeito da suplementação com vitamina E sobre os metabolismos oxidativo e cardíaco em equinos submetidos a exercício de alta intensidade em esteira

RESUMO

A suplementação antioxidante visa prevenir os danos oxidativos induzidos pelo exercício físico em diversos tecidos, como o miocárdio. Nesse contexto, esse estudo objetivou avaliar os marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos no teste de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA), antes e após a suplementação com vitamina E. Para tanto, foram utilizados 10 equinos, sendo cinco Árabes e cinco Crioulos, machos e fêmeas, clinicamente saudáveis e sem treinamento prévio. Realizou-se o primeiro TRA, com carga de trabalho fundamentada no consumo máximo de oxigênio individual ($VO_{2\text{máx}}$). Em seguida, durante 52 dias os equinos receberam vitamina E (dl-alfa-tocoferol) na dose de 1.000 UI/dia, por via oral e, posteriormente, realizaram um segundo TRA com o mesmo protocolo de TRA1. As amostras de sangue foram colhidas nos momentos antes do exercício, imediatamente após o término do teste e em 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h subsequentes. Determinou-se o malondialdeído (MDA) plasmático, como índice de lipoperoxidação, e as concentrações séricas de troponina I cardíaca (TIC), isoenzima MB da creatinoquinase (CK-MB) e mioglobina como marcadores cardíacos. Como efeito do exercício, observou-se aumento discreto de MDA, de TIC e de CK-MB, sendo significativo apenas para CK-MB. A suplementação foi capaz de amenizar a produção de ERO, evidenciada pela menor concentração de MDA em TRA2 em 24 h, além de causar um efeito protetor no miocárdio, devido à diminuição de TIC em 6 h no TRA2 em relação ao TRA1. Não houve grandes alterações na dinâmica de liberação da mioglobina. Concluiu-se que o exercício de alta intensidade promoveu estresse miocárdico em equinos, mas de forma leve. Verificou-se também o efeito benéfico da vitamina E sobre a lipoperoxidação e na proteção miocárdica dos equinos.

Palavras-chave: antioxidante, fisiologia do exercício, troponina I cardíaca, CK-MB, mioglobina, malondialdeído, cavalo.

INTRODUÇÃO

O fornecimento de energia no organismo é normalmente acompanhado por reações de óxido-redução para a manutenção da integridade e função das células. Grande parte do oxigênio consumido é transformada em dióxido de carbono e água. Contudo, 1 a 5% são reduzidos a metabólitos reativos conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem causar danos celulares^{1,2}.

No exercício, há elevação da demanda de oxigênio em relação ao estado de repouso e, com aumento do consumo de oxigênio pela mitocôndria e do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, ocorre maior produção de ERO. Em exercícios anaeróbicos, o organismo utiliza principalmente os fosfatos de alta energia estocados nas células e o sistema glicolítico láctico como vias metabólicas para ressíntese de ATP. Assim, a produção de ERO também ocorre por outros mecanismos, como a ativação da xantina oxidase devido ao fenômeno da isquemia-reperfusão, a explosão respiratória dos leucócitos devido a processos inflamatórios e a oxidação de catecolaminas e de ácido láctico³. Quando as defesas antioxidantes das células e dos fluidos extracelulares não são capazes de neutralizar as ERO, institui-se o estresse oxidativo, do qual pode ocorrer lipoperoxidação das membranas celulares e lesão tecidual^{4,5}.

Embora as defesas antioxidantes endógenas sejam efetivas, os componentes celulares não estão totalmente protegidos, sendo indispensável a obtenção de antioxidantes na dieta para uma defesa apropriada contra processos oxidativos e manutenção da saúde⁶. Considerando o efeito deletério da produção excessiva de ERO e a evidência de que o exercício induz o estresse oxidativo em equinos, a suplementação com antioxidantes objetiva restabelecer ou manter o equilíbrio oxidante/antioxidante e parece ser uma perspectiva promissora para o bem-estar animal e prevenção de lesões⁶.

A vitamina E (dl-alfa-tocoferol) é um antioxidante amplamente estudado para prevenção de lesões oxidativas^{5,7,8,9,10} e parece assumir um papel determinante na proteção do coração contra situações deletérias decorrentes do exercício agudo. Como o músculo cardíaco apresenta um alto metabolismo aeróbico, há elevada taxa de metabolismo oxidativo geralmente associada à

produção acrescida de ERO. Contudo, no coração, a capacidade antioxidante parece ser limitada, tornando-o susceptível à lesão tecidual por estresse oxidativo após um período de exercício agudo^{4,5}.

Segundo Durando et al.¹¹, na espécie equina é difícil a avaliação de disfunção miocárdica que ocorre durante o exercício. Embora os exames eletro e ecocardiográficos sejam excelentes ferramentas diagnósticas para arritmias e função ventricular, requerem equipamentos sofisticados e conhecimento das técnicas, que nem sempre estão disponíveis. Seria muito conveniente um teste diagnóstico que pudesse complementar a avaliação dos efeitos do exercício na função cardíaca em cavalos, uma vez que as alterações cardíacas são referidas como importante causa de queda de desempenho em equinos^{5,11}.

Tradicionalmente, a concentração sérica da isoenzima MB da creatinoquinase (CK-MB) é mensurada, com limitações baseadas na meia-vida curta e reatividade cruzada com o músculo esquelético¹². Reimer et al.¹³ relataram aumento da concentração da CK-MB sérica como método de diagnosticar injúria miocárdica em equinos com taquicardia ventricular. Em humanos, utiliza-se também a mensuração da mioglobina para avaliação de doenças miocárdicas, mas não apresenta cardioespecificidade, devendo ser acompanhada dos demais marcadores cardíacos para suprir essa deficiência¹⁴.

A troponina I cardíaca (TIC) foi descrita como um marcador cardíaco altamente específico e sensível para injúria miocárdica em equinos^{6,12}. Muitos trabalhos descrevem que a TIC do miocárdio equino apresenta alta reatividade com os kits de imunoensaios humanos de TIC, podendo ser utilizada como biomarcador de lesão de cardiomiócitos^{5,11,12,15,16}.

Embora haja na literatura muitos trabalhos que relatam a elevação da concentração sérica de troponina após atividade física, não há um consenso sobre a prevalência, os mecanismos e o significado clínico da liberação de troponina induzida pelo exercício¹⁷. Deste modo, o presente estudo objetivou a determinação dos marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos submetidos a exercício de rápida aceleração e curta duração, considerado de alta intensidade, nas condições de pré- e pós-suplementação com vitamina E.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se 10 equinos, sendo cinco da raça Puro Sangue Árabe e cinco da raça Crioula, sem treinamento físico por mais de um ano, com idade variando de oito a 10 anos, peso médio de $372,1 \pm 32,9$ kg, clinicamente hígidos. Os animais foram mantidos em piquetes do 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 e sanitário. O manejo nutricional consistiu de alimentação à base de feno de capim “coast-cross” (*Cynodon dactylon*), ração comercial para equinos (Royal Horse Sport, Socil, Brasil), suplemento mineral (Equifós, Matsuda, Brasil) e água *ad libitum*.

Delineamento experimental

Os equinos foram submetidos a um teste padrão de exercício progressivo em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) inclinada a 6%, na qual a velocidade foi elevada gradualmente, conforme o protocolo de exercício proposto por Watanabe et al.¹⁸. Utilizou-se a máscara de análise de trocas gasosas e dados ventilatórios (Metavet, Cortex, Alemanha), para se extrair a carga de trabalho para cada equino, com base no consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx}}$)¹⁸, sendo o valor médio dos animais de $110,4 \pm 20,4$ mL/kg/min.

Após sete dias do teste progressivo, os equinos foram submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) 1. O teste considerado de exercício predominantemente anaeróbico (concentração de lactato maior que 4 mmol/L) consistiu, em esteira inclinada a 6%, um período de aquecimento de 5 min com a carga de trabalho de 50% do $VO_{2\text{máx}}$ (velocidade média de $3,7 \pm 0,9$ m/s), seguido por mais 5 min à velocidade de 1,5 m/s. A manta da esteira foi acelerada tão rapidamente quanto possível para a velocidade individual calculada, para alcançar a carga de trabalho de 105% do $VO_{2\text{máx}}$ (velocidade média de $9,2 \pm 2,1$ m/s), com duração de 90 s. Logo após, houve um período de desaquecimento consistindo de 5 min à velocidade de 3,0 m/s, com a esteira na posição horizontal¹⁹ (Figura 1).

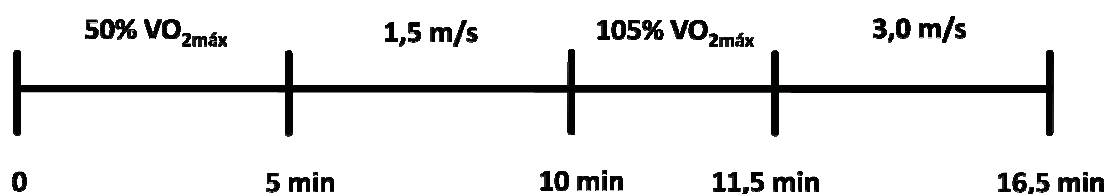


Figura 1. Protocolo de exercício do teste de rápida aceleração e curta duração (TRA).

A suplementação da vitamina E (dl-alfa-tocoferol) dos animais teve início logo após o teste TRA1, na dose de 1.000 UI/animal²⁰, por meio de cápsulas gelatinosas (E-tabs 1000 UI, Sigma Pharma, Hortolândia, Brasil) misturadas a raspas de rapadura, por via oral, diariamente e sem interrupção até o final do experimento. Após 52 dias do início da suplementação, os equinos realizaram o segundo teste (TRA2) com o mesmo protocolo de TRA1.

Colheita e processamento das amostras

As colheitas de sangue foram realizadas nos momentos M0 (antes do exercício), PE (imediatamente após) e 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h após o término do teste, em tubos contendo ativador da coagulação e tubos com EDTA potássico. O soro e o plasma foram imediatamente separados e congelados à temperatura de -80°C até serem processadas.

A avaliação de lipoperoxidação foi realizada por meio da determinação de malondialdeído (MDA) plasmático, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Corp., Tóquio, Japão), segundo Nielsen et al.²¹. O perfil dos marcadores cardíacos foi realizado pelas determinações séricas de troponina I cardíaca, CK-MB e mioglobina por meio de kit comercial (Immulite, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, EUA) pelo ensaio imunoenzimático de fase sólida por quimioluminescência.

Análise estatística

Realizou-se a análise estatística, inicialmente pela análise descritiva das variáveis e a comparação entre os momentos e provas pela análise de variância, com posterior teste de múltipla amplitude de Tukey em caso de

distribuição paramétrica ou teste de Kruskal-Wallis em caso de distribuição não-paramétrica dos dados. A correlação entre os marcadores cardíacos foi realizada por meio de teste de correlação dos postos de Spearman. Todas as análises foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Considerando as raças de equinos utilizadas, não houve diferença estatística entre as variáveis e, assim, os dados estão apresentados em conjunto. As concentrações plasmáticas de MDA não se alteraram estatisticamente com o exercício em ambas as provas, embora haja um discreto aumento imediatamente após o exercício, retornando ao nível basal em 1 h. Com relação ao efeito da suplementação com vitamina E, em todos os momentos observou-se valores menores de MDA após a suplementação (TRA2), porém houve diferença significativa somente no momento 24 h ($P < 0,03$) (Tabela 1, Figura 2).

O exercício causou um aumento discreto na concentração de TIC sérica, sendo observado o valor máximo de 0,09 ng/mL em 6 h em TRA1, mas sem diferença estatística. Nesse momento, houve diminuição significativa ($P < 0,05$) após a suplementação, sendo o valor de 0,05 ng/mL em TRA2. Observou-se também, exceto pelos momentos M0 e 1 h, menores níveis da TIC após a suplementação em todos os momentos, entretanto, sem diferença estatística (Tabela 1, Figura 3).

Com relação à CK-MB, o exercício promoveu elevação significativa ($P < 0,03$) em TRA1, em 12 h. Em TRA2 também houve aumento da isoenzima, porém mais discreto e não significativo. Com exceção do M0, a concentração de CK-MB em todos os momentos foi menor em TRA2 em relação a TRA1, porém sem significância (Tabela 1, Figura 4).

A concentração de mioglobina apresentou uma pequena elevação com valor máximo em 12 h após o exercício, em ambas as provas, porém não houve diferença estatística. Tampouco houve diferença pré- e pós-suplementação (Tabela 1, Figura 5).

Tabela 1. Médias ($\pm$ desvios-padrão) de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) e de mioglobina (ng/mL) e medianas (percentil 25; percentil 75) de troponina I cardíaca (ng/mL) e CK-MB (ng/mL) de 10 equinos no teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2).

		Momentos							P
		M0	PE	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	
MDA	TRA 1	1,38 ($\pm 0,35$)	1,54 ($\pm 0,38$)	1,21 ($\pm 0,29$)	1,39 ($\pm 0,45$)	1,21 ($\pm 0,54$)	1,16 ($\pm 0,47$)	1,26 ^A ($\pm 0,25$)	0,354
	TRA 2	1,06 ($\pm 0,34$)	1,32 ($\pm 0,59$)	1,06 ($\pm 0,49$)	1,23 ($\pm 0,48$)	1,16 ($\pm 0,47$)	1,04 ($\pm 0,37$)	0,83 ^B ($\pm 0,49$)	0,360
	P	0,053	0,333	0,430	0,449	0,847	0,536	0,023	
TIC	TRA 1	0,04 (0,03; 0,05)	0,07 (0,05; 0,11)	0,04 (0,03; 0,05)	0,06 (0,04; 0,14)	0,09 ^A (0,06; 0,26)	0,07 (0,03; 0,12)	0,07 (0,03; 0,10)	0,085
	TRA 2	0,05 (0,01; 0,06)	0,04 (0,04; 0,05)	0,04 (0,02; 0,05)	0,05 (0,03; 0,09)	0,05 ^B (0,03; 0,05)	0,04 (0,03; 0,15)	0,03 (0,02; 0,04)	0,437
	P	0,817	0,127	0,291	0,849	0,048	0,909	0,052	
CK-MB	TRA 1	4,55 ^a (3,80; 6,50)	7,40 ^{ab} (5,50; 10,55)	5,55 ^{ab} (4,38; 7,68)	7,8 ^{ab} (6,05; 10,40)	9,35 ^{ab} (5,68; 12,10)	10,65 ^b (6,53; 13,13)	8,70 ^{ab} (5,38; 10,38)	0,024
	TRA 2	5,10 (3,90; 6,55)	5,75 (4,63; 7,80)	4,75 (4,48; 4,95)	6,65 (5,55; 8,63)	7,05 (5,45; 8,50)	7,00 (5,00; 10,00)	5,45 (4,60; 6,53)	0,089
	P	0,596	0,307	0,325	0,376	0,384	0,364	0,056	
MIO	TRA 1	0,26 ($\pm 0,07$)	0,28 ($\pm 0,08$)	0,28 ($\pm 0,07$)	0,27 ($\pm 0,04$)	0,32 ($\pm 0,11$)	0,36 ($\pm 0,15$)	0,27 ($\pm 0,09$)	0,149
	TRA 2	0,30 ($\pm 0,10$)	0,25 ($\pm 0,04$)	0,29 ($\pm 0,09$)	0,26 ($\pm 0,08$)	0,30 ($\pm 0,07$)	0,33 ($\pm 0,06$)	0,31 ($\pm 0,11$)	0,334
	P	0,212	0,331	0,844	0,689	0,597	0,546	0,211	

M0: antes do exercício, PE: imediatamente após o exercício, MDA: malondialdeído, TIC: troponina I cardíaca, CK-MB: isoenzima MB da creatinoquinase, MIO: mioglobina.
 Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística entre momentos.
 Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística entre provas.

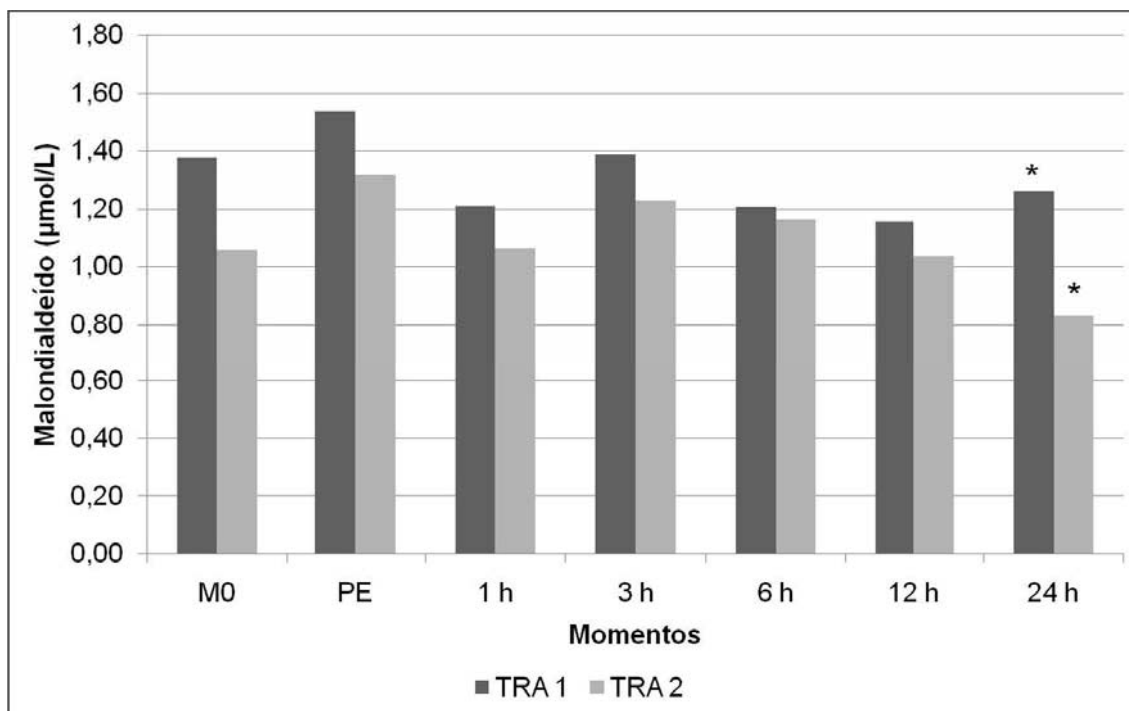


Figura 2. Médias da concentração de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2). *Diferença estatística entre provas ($P < 0,03$, Tukey).

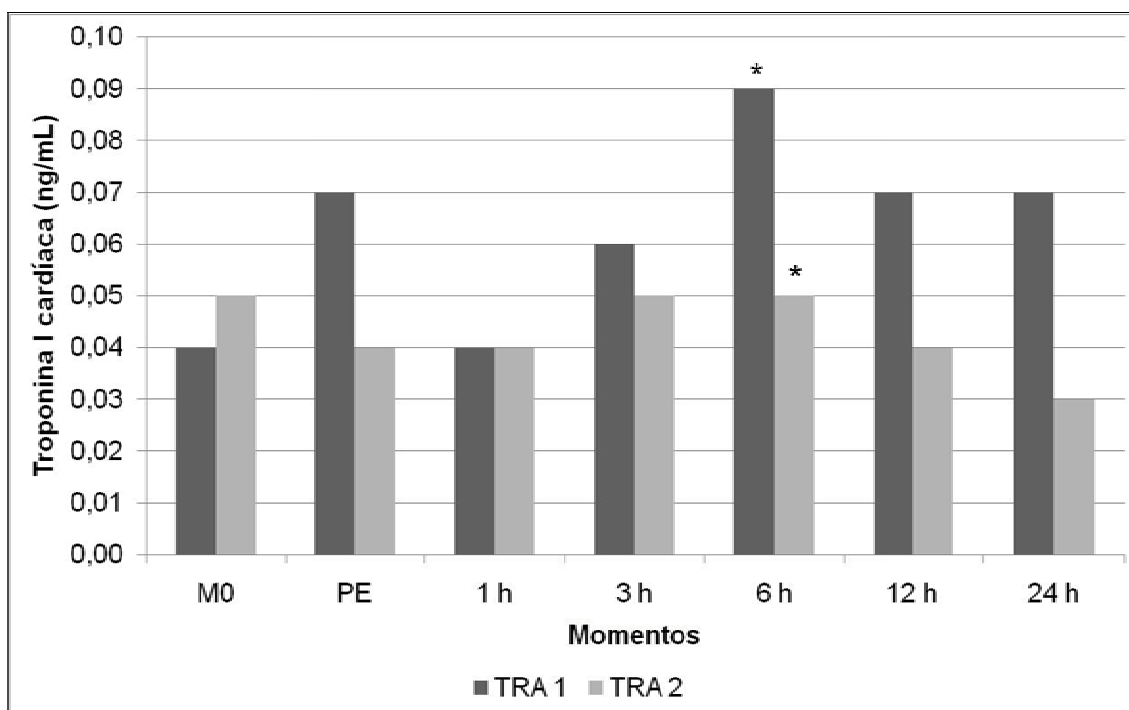


Figura 3. Medianas da concentração de troponina I cardíaca (ng/mL) de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2). *Diferença estatística entre provas ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis).

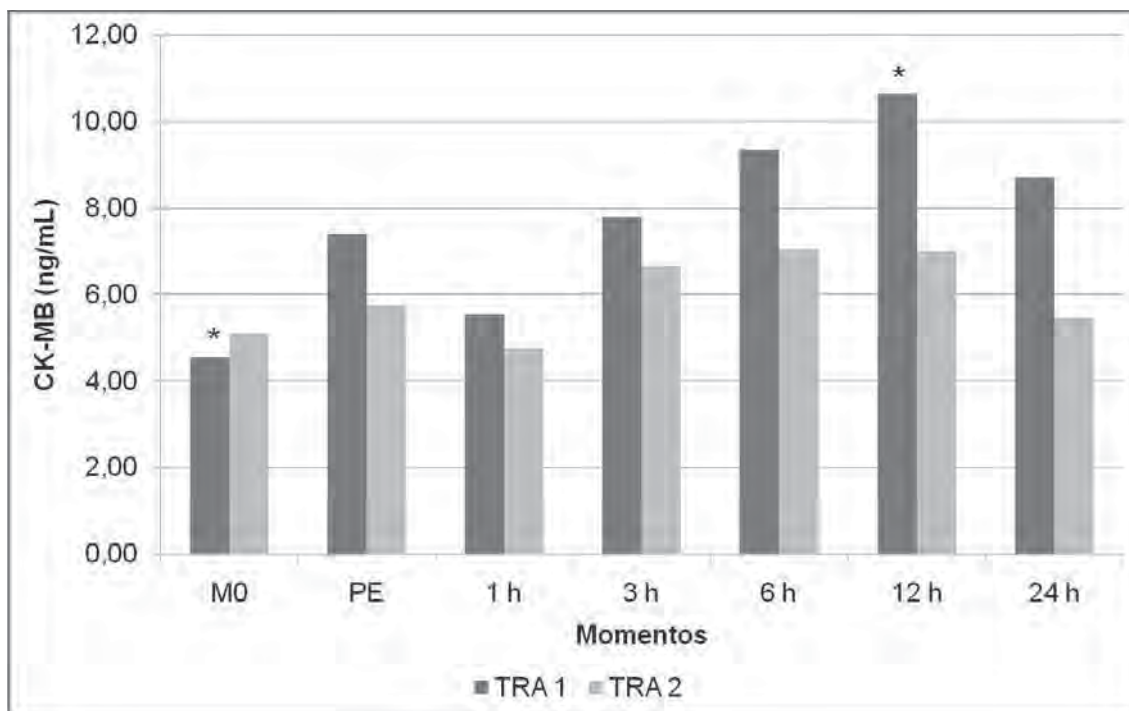


Figura 4. Medianas da concentração de CK-MB (ng/mL) de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2). *Diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis).

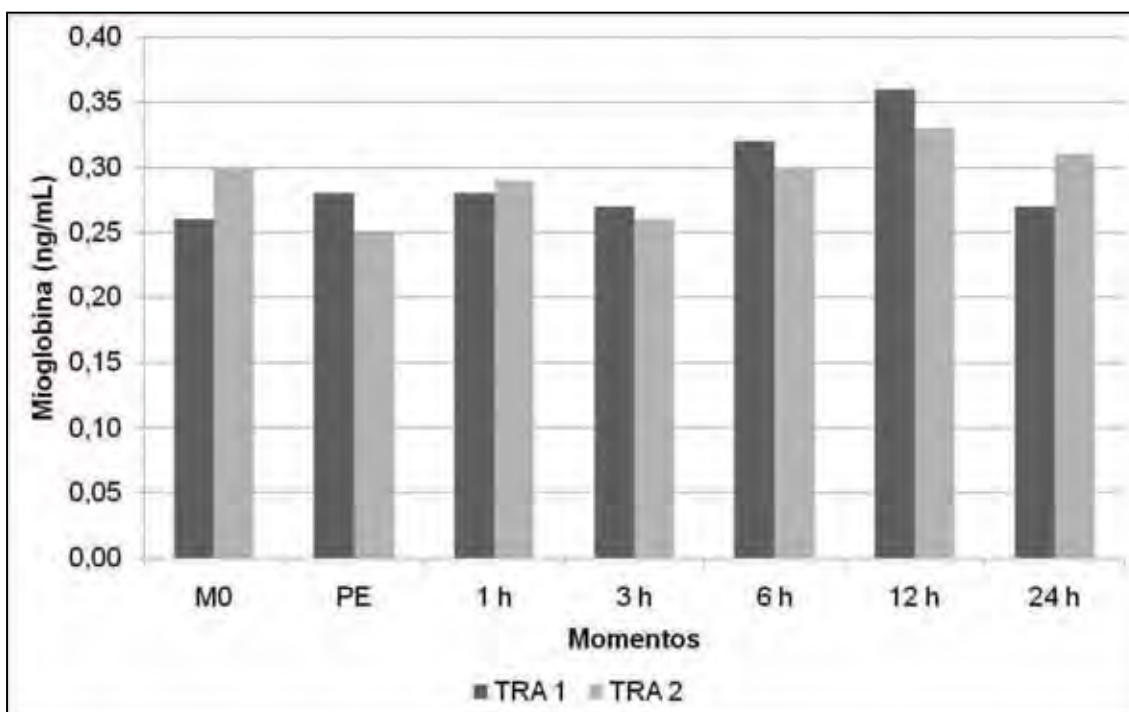


Figura 5. Médias da concentração de mioglobina (ng/mL) de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2).

Quanto à correlação dos marcadores cardíacos, a TIC e a CK-MB apresentaram uma correlação significativa ($r=0,60$; $P=0,000$). Porém, a correlação foi considerada muito baixa entre a CK-MB e a mioglobina ($r=0,22$; $P=0,009$) e não houve entre TIC e mioglobina ($r=0,14$; $P=0,099$).

DISCUSSÃO

Os marcadores de peroxidação lipídica e a vitamina E são os mais extensivamente estudados com relação à formação e redução do estresse oxidativo, respectivamente, induzido pelo exercício físico^{1,22}. Entretanto, há uma ampla variação de resultados e não foram estabelecidos ainda os benefícios reais da utilização desse antioxidante^{5,23}. A inconsistência desses resultados pode ser reflexa de diferentes intensidades de exercício, duração, tipo ou treinamento, ou método usado para averiguar a peroxidação lipídica¹.

As concentrações de MDA de repouso pré- e pós-suplementação foram superiores às encontradas por Yonezawa et al.⁵ em equinos submetidos a exercício progressivo, sendo $1,07 \pm 0,67 \mu\text{mol/L}$ para o grupo controle e $0,66 \pm 0,51 \mu\text{mol/L}$ para o grupo suplementado com vitamina E na mesma dose de 1.000 UI por dia. Houve uma clara tendência do exercício de alta intensidade em promover maior produção de ERO evidenciada pela elevação dos níveis de MDA em ambas as provas, em acordo com os dados da literatura^{5,7,24}. Duberstein et al.²³ submeteram equinos a treinamento e suplementação com vitamina E na dose de 3.000 UI por dia e, no final do treinamento, realizaram teste de exercício progressivo. Os autores encontraram uma concentração pós-exercício menor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que incluem o MDA, em relação ao pré-exercício, provavelmente devido à rápida depuração do MDA, uma vez que apresenta meia-vida curta. Sugere-se que, no presente estudo, o protocolo de exercício não foi intenso o suficiente para promover estresse oxidativo e/ou possivelmente o bom condicionamento físico dos animais, embora não fossem treinados, associado à rápida depuração do MDA do organismo.

A suplementação foi benéfica ao amenizar a produção de ERO, sendo verificada pelos menores valores plasmáticos de MDA em todos os momentos de TRA2 em relação ao TRA1, porém houve diferença estatística somente em

24 h. No estudo de Avellini et al.⁷, houve aumento significativo das defesas antioxidantes, que reduziu o fenômeno peroxidativo induzido pelo exercício de alta intensidade ao associar um período de treinamento com a suplementação de selênio e vitamina E por 70 dias. Entretanto, Yonezawa et al.⁵ observaram maior produção de MDA pelo grupo suplementado com vitamina E em relação ao grupo controle de equinos submetidos a exercício progressivo, possivelmente em decorrência do efeito pró-oxidante da vitamina E. Williams e Carlucci⁹ não encontraram diferenças nos parâmetros de estresse oxidativo ao suplementarem equinos de trote com 0, 5.000 e 10.000 UI de acetato de *dl*-alfa-tocoferol por três semanas e submeterem a exercício intenso. Os autores ainda recomendam que a dose de 10.000 UI deve ser evitada pois pode ser prejudicial à absorção de beta-caroteno.

Segundo van Erck et al.²⁵, a disfunção cardíaca está associada a altos níveis de marcadores de estresse oxidativo. No presente estudo, não foi possível correlacionar os valores de MDA com os de TIC. Observou-se leve aumento da concentração de TIC no TRA1 em 6 h (0,09 ng/mL) acima do limite da variação considerada normal proposta por Divers et al.²⁶ em 83 cavalos, de 0,0 a 0,06 ng/mL, indicando que o protocolo de exercício causou um certo grau de estresse miocárdico, porém pouco expressivo. Em acordo, Durando et al.¹¹ verificaram aumento discreto dos níveis de TIC em equinos submetidos a exercício máximo de curta duração, assim como Nostell e Häggström¹⁶ e Yonezawa et al.⁵, que ainda associaram a elevação à ocorrência de contrações ventriculares prematuras.

Ainda que existam na literatura muitos trabalhos que relatam elevação da concentração sérica de troponina após atividade física, não há um consenso sobre a prevalência, os mecanismos e o significado clínico da liberação de troponina induzida pelo exercício, existindo várias hipóteses. Uma delas é o aumento da permeabilidade sarcolemal do miocárdio que pode facilitar a liberação da TIC citosólica. Assim, é possível que a elevação da troponina pós-exercício ocorra devido à difusão passiva do compartimento intra para o extracelular. Esse aumento da permeabilidade pode ser ocasionado por mecanismos de estresse sobre os cardiomiócitos, produção elevada de ERO ou desequilíbrio ácido-base¹⁷. O exercício físico extremo pode ainda levar a aumentos da troponina, não só pelo maior consumo do oxigênio por parte do

miocárdio, como também por uma potencial diminuição da perfusão coronariana por vasoespasma induzido pelas catecolaminas endógenas. Outro mecanismo de liberação de troponina induzida pelo exercício é a estimulação de integrinas por meio do estiramento do miocárdio. As integrinas agem como moléculas sinalizadoras e estão envolvidas no remodelamento cardíaco por sobrecarga de pressão ou após infarto do miocárdio. A estimulação das integrinas responsivas ao estiramento medeia o transporte de moléculas intactas de troponina para fora dos cardiomiócitos. Como a maioria dos dados da literatura envolve indivíduos saudáveis, especula-se que a liberação pós-exercício da TIC seja um processo benigno e que não está relacionada com necrose miocárdica^{17,27}. Contudo, não há dados que estimam se essa liberação transitória esteja relacionada a alterações cardíacas futuras.

Outro fator importante a ser considerado com relação às divergências dos dados na literatura são os diferentes sistemas analisadores que utilizam aminoácidos distintos para composição dos anticorpos monoclonais^{5,11}. A dificuldade em comparar os dados com os apresentados na literatura se deve a essa divergência de metodologias e tipos de amostragem⁵. Há necessidade de um estudo amplo comparando os diversos tipos de kits analisadores comerciais para determinação da TIC na espécie equina, como já realizado para humanos, ratos, cães e macacos^{28,29}.

Mesmo que o exercício não tenha promovido grandes alterações no nível de TIC, a suplementação com vitamina E proporcionou efeito protetor no coração, evidenciado pela menor liberação de troponina no momento 6 h de TRA 1 para TRA 2. Este é o primeiro relato desse efeito benéfico da vitamina E sobre o miocárdio de equinos.

Michima et al.³⁰ acreditam que a utilização da CK-MB como único marcador cardíaco não traz informações relevantes a respeito da integridade cardíaca sob influência do exercício. No presente estudo verificou-se aumento significativo da isoenzima em 12 h no TRA1, acompanhado por uma correlação significativa com a TIC. Os dados sugerem que, quando associada à troponina I cardíaca, a CK-MB pode aumentar sua especificidade na detecção de alteração miocárdica. Observou-se também uma tendência do mesmo efeito protetor da vitamina E devido aos menores níveis de CK-MB no TRA2 em relação ao TRA1, todavia sem significância.

Quanto à concentração de mioglobina, as alterações ocasionadas pelo exercício e pela suplementação foram muito sutis. A partir desses dados e por existir uma correlação muito baixa com a TIC e CK-MB, não se recomenda a utilização desse marcador para avaliação miocárdica em equinos submetidos a exercício de alta intensidade. Talvez essa proteína seja mais útil na avaliação da musculatura esquelética³¹.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o exercício de rápida aceleração e curta duração, considerado de alta intensidade, promoveu estresse miocárdico em equinos evidenciado pelo aumento de CK-MB, mas não foi considerado grave. Pelos dados do presente trabalho, ainda foi possível verificar o efeito benéfico da suplementação da vitamina E pela diminuição da concentração de MDA plasmático e de TIC sérica. Contudo, para uma melhor compreensão dos mecanismos de liberação dos marcadores cardíacos induzidos pelo exercício, são necessários novos estudos, principalmente que considerem os diferentes tipos de analisadores na espécie equina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo subsídio financeiro, à Dr^a Débora Damasceno pelas análises dos marcadores cardíacos, e à equipe do Prof. Dr. Roberto Carlos Burini pelas determinações de malondialdeído.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Projeto aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 188/2007-CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

REFERÊNCIAS

1. Deaton CM, Marlin DJ (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice* **2**: 278-291.
2. Soffler C (2007). Oxidative Stress. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* **23**: 135-157.
3. Kostaropoulos IA, Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Ikonomidou GV, Makrygiannis V, Papadopoulos G, Kouretas D (2006). Comparison of the blood redox status between long-distance and short-distance runners. *Physiological Research* **55**: 611-616.
4. Ascensão A, Magalhães J, Soares J, Oliveira J, Duarte JA (2003). Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Revista Portuguesa de Cardiologia* **22**: 651-678.
5. Yonezawa LA, Machado LP, Silveira VF, Watanabe MJ, Saito ME, Kitamura SS, Kohayagawa A (2010). Malondialdeído e troponina I cardíaca em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E. *Ciência Rural* **40**: 1321-1326.
6. Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova* **30**: 441-449.
7. 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* **123**: 147-154.
8. Kirschvink N, de Moffarts B, Farnir F, Pincemail J, Lekeux P (2006). Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breeds. *Equine Veterinary Journal Supplement* **36**: 239-244.
9. Williams CA, Carlucci SA (2006). Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin E and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Veterinary Journal. Supplement* **36**: 617-621.
10. Williams CA (2008). Oxidative stress or oxidant/antioxidant dis-equilibrium in horses? A hot topic. *Veterinary Journal* **177**: 157-178.
11. Durando MM, Reef VB, Kline K, Birks EK (2007). Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* **3**: 217-223.

12. 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.
13. Reimer JM, Reef VB, Sweeney RW (1992). Ventricular arrhythmias in horses: 21 cases (1984-1989). *Journal of American Veterinary Medical Association* **201**: 1237-1243.
14. Godoy MF, Braile DM, Purini Neto J (1998). A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* **71**: 629-633.
15. Michima LES, Miyashiro P, Bonomo CMC, Fernandes WR (2007). Influência do exercício físico prolongado nos valores séricos de troponina I cardíaca em cavalos de enduro. *Anais da VIII Conferência Anual da Abraveq*. Disponível em:
http://www.abraveq.com.br/artigos_viiiconferencia2007/arquivo58.pdf.
Acesso em 07 jan 2011.
16. Nostell K, Häggström J (2008). Resting concentrations of cardiac troponin I in fit horses and effect of racing. *Journal of Veterinary Cardiology* **10**: 105-109.
17. Shave R, Baggish A, George K, Wood M, Scharhag J, Whyte G, Gaze D, Thompson PD (2010). Exercise-induced cardiac troponin elevation. *Journal of the American College of Cardiology* **56**: 169-176.
18. Watanabe MJ, Silveira VF, Machado LP, Yonezawa LA, Kohayagawa A, Thomassian A (2009). Aplicação da espirometria durante teste padrão de exercício progressivo em esteira para avaliação da troca gasosa respiratória de equinos da raça Árabe. *Archives of Veterinary Science* **14**: 17-24.
19. Prince A, Geor R, Harris P, Hoekstra K, Gardner S, Hudson C, Pagan J (2002). Comparison of the metabolic responses of trained Arabians and Thoroughbreds during high- and low-intensity exercise. *Equine Veterinary Journal. Supplement* **34**: 95-99.
20. Nutrient Requirements of Horses (2007). Sixth edition. Disponível em:
<http://nrc88.nas.edu/nrh/>.
21. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry* **43**: 1209-1214.

22. Williams CA (2010). Antioxidant supplementation to the exercising horse. *Revista Brasileira de Zootecnia* **39**: 145-150.
23. Duberstein KJ, Johnson SE, McDowell LR, Ott EA (2009). Effects of vitamin E supplementation and training on oxidative stress parameters measured in exercising horses. *Comparative Exercise Physiology* **6**: 17-25.
24. Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A, Porciello F, Antonioni MT, Gaiti A (1998). Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative and Biochemistry and Physiology. Part B* **119**: 833-836.
25. van Erck E, Loigerot C, Lekeux P, Kirschvink N (2008). Oxidative stress and clinical status in working Standardbred horses. *Proceedings of 47th British Equine Veterinary Association Congress*. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/beva/2008/part4.pdf#nameddest=8>. Acesso em 07 jan 2011.
26. Divers TJ, Kraus MS, Radcliffe RM, Jesty SA, Gelzer A, Soderholm LV, Mitchell LM, Ducharme NG (2010). Measurement and clinical use of cardiac troponin I (TIC) in horses. *Proceedings of 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2010/z9100110000277.pdf>. Acesso em 07 de jan 2011.
27. Martins CS (2009). Troponina. Estrutura, fisiopatologia e importância clínica para além da isquemia miocárdica. *Arquivos de Medicina* **23**: 221-240.
28. Panteghini M, Pagani F, Yeo KTJ, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Ravkilde J, Wu AHB (2004). Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clinical Chemistry* **50**: 327-332.
29. Apple FS, Murakami MM, Ler R, Walker D, York M (2008). Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clinical Chemistry* **54**:1982-1989.
30. Michima LES, Mirandola RMS, Fernandes WR (2010). Estudo da isoenzima creatina quinase CKMB sérica em equinos de enduro após exercício físico prolongado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **47**: 23-30.

31. Holmgren N, Valberg S (1992). Measurement of serum myoglobin concentrations in horses by immunodiffusion. *American Journal of Veterinary Research* **53**: 957-960.

Capítulo III



Avaliação dos marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos submetidos a exercício de baixa intensidade e longa duração antes e após suplementação com vitamina E

Artigo a ser enviado para o periódico *Comparative Exercise Physiology*.

ISSN: 1755-2540

Normas para publicação disponível em:

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

Avaliação dos marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos submetidos a exercício de baixa intensidade e longa duração antes e após suplementação com vitamina E**RESUMO**

O exercício físico de longa duração pode promover o estresse oxidativo pela produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio. Assim, a vitamina E suplementar visa prevenir os danos oxidativos induzidos em diversos tecidos, como o miocárdio. Deste modo, esse estudo objetivou avaliar os marcadores cardíacos e de lipoperoxidação em equinos no teste de exercício de baixa intensidade e longa duração (TLD), antes e após a suplementação com vitamina E. Para tanto, foram utilizados 10 equinos, sendo cinco Árabes e cinco Crioulos, machos e fêmeas, clinicamente saudáveis e sem treinamento prévio. Realizou-se o primeiro TLD, com carga de trabalho fundamentada no consumo máximo de oxigênio individual ($VO_{2\text{máx}}$). Em seguida, durante 59 dias os equinos receberam vitamina E (dl-alfa-tocoferol) na dose de 1.000 UI/dia, por via oral e, posteriormente, realizaram um segundo TLD com o mesmo protocolo de TLD1. As amostras de sangue foram colhidas nos momentos antes do exercício, imediatamente após o término do teste e em 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h subsequentes. Determinou-se o malondialdeído (MDA) plasmático, como índice de lipoperoxidação, e a concentração sérica de troponina I cardíaca (TIC), isoenzima MB da creatinoquinase (CK-MB) e mioglobina como marcadores cardíacos. Como efeito do exercício, não se observou aumento significativo de MDA, de TIC nem de mioglobina, mas sim da concentração sérica de CK-MB, sugerindo-se o estresse miocárdico. A suplementação foi capaz de amenizar a produção de ERO, evidenciada pela menor concentração de MDA em todos os momentos avaliados ($P < 0,001$), porém não causou efeito protetor no miocárdio. Concluiu-se que o exercício de baixa intensidade e longa duração promoveu estresse miocárdico em equinos, mas de forma leve e a suplementação com vitamina E reduziu a lipoperoxidação.

Palavras-chave: troponina I cardíaca, CK-MB, mioglobina, malondialdeído, antioxidante, fisiologia do exercício, cavalo.

INTRODUÇÃO

Os equinos são considerados atletas natos e são participantes de diversos tipos de competições esportivas. Deste modo, há grande preocupação com a queda de desempenho em decorrência de diversas disfunções orgânicas. Dentre elas, as cardiovasculares são responsáveis por alterações que acarretam desde uma intolerância ao exercício até a morte súbita e são referidas como a terceira maior causa de queda de desempenho^{1,2}.

Sabe-se que o exercício físico é capaz de produzir as espécies reativas de oxigênio (ERO) e, uma vez formadas, podem iniciar uma cadeia de reações prejudiciais às membranas celulares, ocasionando lipoperoxidação^{3,4,5}. As ERO são normalmente formadas como parte do metabolismo celular, mas quando há o desequilíbrio entre ERO e antioxidantes, estabelece-se o estresse oxidativo, podendo causar considerável dano irreversível às células, determinando lesão ou doença^{3,6}.

No exercício aeróbico, a produção de ATP é a via mais importante e há uma elevação da demanda de oxigênio em relação ao estado de repouso, com aumento do consumo de oxigênio pela mitocôndria e do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, ocasionando uma maior produção de ERO⁷. Um estudo em humanos, comparando diversos tipos de intensidade de exercício, observou que a corrida de maratona promoveu estresse oxidativo mais intenso comparada às atividades de curta e média duração. Sugere-se que a corrida de longa duração poderia conduzir o organismo a uma falta de capacidade em suportar o estresse oxidativo por um longo tempo, mostrando a necessidade de suplementação dietética com antioxidantes⁸.

Deste modo, 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. Como a deficiência de antioxidantes, o estresse oxidativo induzido e a consequente intolerância ao exercício físico já foram claramente estabelecidos, o oposto, ou seja, a suplementação de antioxidantes para prevenção de injúrias ou até melhoria do desempenho atlético, ainda precisa ser comprovada^{5,9}.

Enquanto que uma elevada demanda de oxigênio ocorre no coração durante o exercício físico e consequente demasiada produção de ERO, a

capacidade antioxidante parece ser limitada no músculo cardíaco, tornando-o susceptível à lesão tecidual por estresse oxidativo após um período de exercício agudo. Embora haja evidências diretas da ocorrência de estresse oxidativo e de lipoperoxidação, a vitamina E pode promover proteção do coração contra situações deletérias decorrentes do exercício^{5,10,11}.

Ainda não foi totalmente estabelecido se o exercício físico, tanto de curta como o de longa duração, pode promover lesão cardíaca e por qual mecanismo de ação. Especula-se que a lesão miocárdica possa ocorrer em decorrência de uma isquemia durante o exercício e deva estar associada ao acúmulo de ERO¹². Adicionalmente, em equinos, parece ser difícil a detecção e quantificação da injúria miocárdica.

Ainda que a prática de exercícios físicos seja amplamente recomendada, a participação em eventos esportivos cada vez mais exaustivos exige o conhecimento da resposta fisiológica cardíaca para a segurança do animal atleta. Portanto, o presente trabalho pretendeu avaliar o efeito fisiológico do exercício e deletério das ERO, sob o ponto de vista bioquímico, nas células musculares cardíacas por meio da determinação de marcadores cardíacos séricos e de lipoperoxidação, e o efeito da suplementação com vitamina E em equinos submetidos ao exercício de baixa intensidade e longa duração em esteira de alta velocidade.

MATERIAL e MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se 10 equinos, sendo cinco da raça Puro Sangue Árabe e cinco da raça Crioula, sem treinamento físico por mais de um ano, com idade variando de oito a 10 anos, peso médio de $372,1 \pm 32,9$ kg, clinicamente hígidos. Os animais foram mantidos em piquetes do 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 e sanitário. O manejo nutricional consistiu de alimentação à base de feno de capim “coast-cross” (*Cynodon dactylon*), ração comercial para equinos (Royal Horse Sport, Socil, Brasil), suplemento mineral (Equifós, Matsuda, Brasil) e água *ad libitum*.

Delineamento experimental

Os equinos foram submetidos a um teste padrão de exercício progressivo em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) inclinada a 6%, da qual a velocidade foi elevada gradualmente, com o protocolo de exercício proposto por Watanabe et al.¹³. Utilizou-se a máscara de análise de trocas gasosas e dados ventilatórios (Metavet, Cortex, Alemanha), para se extrair a carga de trabalho para cada equino, com base no consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$)¹³, sendo o valor médio dos animais de $110,4 \pm 20,4$ mL/kg/min.

Após 14 dias do teste progressivo, os equinos foram submetidos ao primeiro teste de baixa intensidade e longa duração (TLD). O teste, considerado de exercício predominantemente aeróbico (concentração de lactato inferior a 4 mmol/L), foi realizado com a esteira inclinada a 6%, à velocidade de 35% do $VO_{2máx}$ de cada animal pelo período de 60 min¹⁴, correspondendo a uma velocidade média de $2,3 \pm 0,5$ m/s.

A suplementação da vitamina E (dl-alfa-tocoferol) dos animais teve início logo após o teste TLD1, na dose de 1.000 UI/animal¹⁵, por meio de cápsulas gelatinosas (E-tabs 1000 UI, Sigma Pharma, Hortolândia, Brasil) misturadas a raspas de rapadura, por via oral, diariamente e sem interrupção até o final do experimento. Após 59 dias do início da suplementação, os equinos realizaram o segundo teste (TLD2) com o mesmo protocolo de TLD1. A temperatura e a umidade relativa do ar do salão do Centro de Medicina Esportiva Equina da Unesp de Botucatu onde os testes foram realizados variou de 17,0 a 20,6°C e 66 a 81%, respectivamente.

Colheita e processamento das amostras

As colheitas de sangue foram realizadas nos momentos M0 (antes do exercício), PE (imediatamente após) e 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h após o término do teste, em tubos contendo ativador da coagulação para obtenção de soro, e tubos com EDTA potássico. O soro e o plasma foram imediatamente separados e congelados a -80°C até serem processadas.

A avaliação de lipoperoxidação foi realizada por meio da determinação de malondialdeído (MDA) plasmático, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Corp., Tóquio, Japão), segundo Nielsen et al.¹⁶. O

perfil dos marcadores cardíacos foi realizado pelas determinações séricas de troponina I cardíaca (TIC), isoenzima MB da creatinoquinase (CK-MB) e mioglobina foram realizadas por meio de kit comercial (Immulite, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, EUA) pelo ensaio imunoenzimático de fase sólida por quimioluminescência.

Análise estatística

Realizou-se a análise estatística, inicialmente pela análise descritiva das variáveis e a comparação entre os momentos e provas pela análise de variância, com posterior teste de múltipla amplitude de Tukey em caso de distribuição paramétrica ou teste de Kruskal-Wallis em caso de distribuição não-paramétrica dos dados. Todas as análises foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Considerando as raças de equinos utilizadas, não houve diferença estatística entre as variáveis e, assim, os dados estão apresentados em conjunto. O exercício físico não promoveu efeito sobre os valores de MDA plasmáticos, uma vez que não houve diferença significativa entre os momentos em ambas as provas. Entretanto, verificou-se influência da vitamina E sobre a produção de ERO, pela menor concentração de MDA ($P < 0,001$) em todos os momentos após a suplementação (Tabela 1, Figura 1).

As concentrações de TIC (Tabela 1, Figura 2) e mioglobina (Tabela 1, Figura 3) séricas não se alteraram nem durante o exercício nem entre as provas, embora se observe uma clara tendência à elevação de TIC em 3 h em TLD1, mas sem significância. No entanto, observou-se aumento significativo ($P < 0,05$) dos níveis de CK-MB durante o exercício em TLD1 e TLD2, sendo que o valor máximo ocorreu em 12 h em ambas as provas (Tabela 1, Figura 4).

Tabela 1. Médias ($\pm$ desvios-padrão) de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) e de mioglobina (ng/mL) e medianas (percentil 27; percentil 75) de troponina I cardíaca (ng/mL) e CK-MB (ng/mL) de 10 equinos no teste de baixa intensidade e longa duração (TLD) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2).

		Momentos							
		M0	PE	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	P
MDA	TLD 1	1,56 ^A (±0,40)	1,61 ^A (±0,39)	1,50 ^A (±0,21)	1,56 ^A (±0,34)	1,58 ^A (±0,39)	1,38 ^A (±0,57)	1,29 ^A (±0,28)	0,443
	TLD 2	0,84 ^B (±0,19)	0,94 ^B (±0,25)	0,87 ^B (±0,30)	0,72 ^B (±0,15)	0,70 ^B (±0,18)	0,71 ^B (±0,23)	0,71 ^B (±0,21)	0,090
	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
TIC	TLD 1	0,03 (0,02; 0,04)	0,03 (0,02; 0,04)	0,03 (0,00; 0,05)	0,07 (0,03; 0,18)	0,03 (0,01; 0,06)	0,04 (0,03; 0,06)	0,03 (0,01; 0,04)	0,249
	TLD 2	0,04 (0,03; 0,06)	0,04 (0,03; 0,05)	0,04 (0,02; 0,06)	0,04 (0,04; 0,05)	0,04 (0,03; 0,09)	0,04 (0,03; 0,18)	0,04 (0,03; 0,05)	0,960
	P	0,129	0,495	0,344	0,495	0,185	0,940	0,288	
CK-MB	TLD 1	3,65 ^a (2,83; 4,15)	3,40 ^a (1,85; 3,58)	3,50 ^{ab} (2,80; 4,05)	6,55 ^{ab} (4,08; 9,38)	5,60 ^{ab} (3,98; 7,76)	7,15 ^b (6,05; 10,48)	3,75 ^{ab} (3,20; 6,58)	0,001
	TLD 2	3,45 ^a (2,93; 4,85)	4,0 ^{ab} (3,08; 4,98)	3,40 ^{ab} (3,00; 5,18)	6,10 ^{ab} (4,33; 8,08)	6,55 ^{ab} (4,35; 8,95)	7,03 ^b (5,55; 9,85)	4,35 ^{ab} (3,75; 4,85)	0,007
	P	0,411	0,107	0,791	0,471	0,449	0,762	0,910	
MIO	TLD 1	0,23 (±0,06)	0,25 (±0,07)	0,22 (±0,10)	0,24 (±0,06)	0,22 (±0,09)	0,30 (±0,10)	0,28 (±0,09)	0,221
	TLD 2	0,28 (±0,06)	0,24 (±0,12)	0,26 (±0,06)	0,27 (±0,09)	0,28 (±0,08)	0,30 (±0,05)	0,29 (±0,07)	0,707
	P	0,108	0,757	0,187	0,442	0,143	0,888	0,625	

M0: antes do exercício, PE: imediatamente após o exercício, MDA: malondialdeído, TIC: troponina I cardíaca, CK-MB: isoenzima MB da creatinoquinase, MIO: mioglobina.
 Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística entre momentos.
 Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística entre provas.

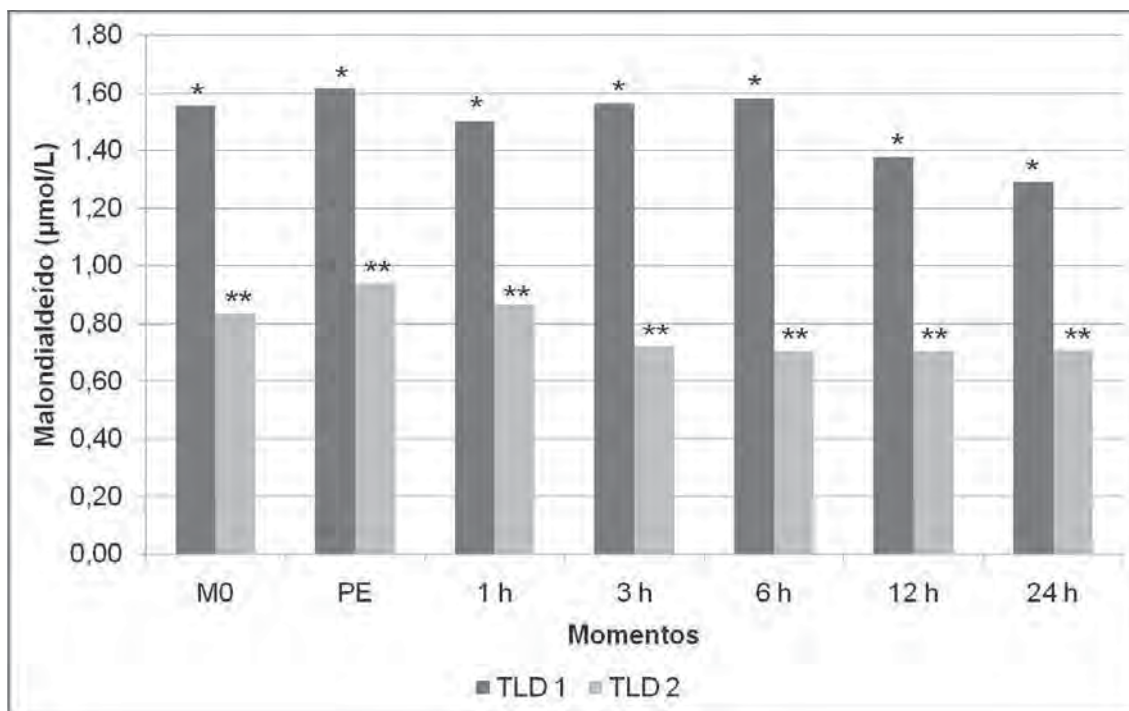


Figura 1. Médias da concentração de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de 10 equinos submetidos ao teste de baixa intensidade e longa duração (TLD) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2). * e ** indicam diferença estatística entre provas ($p < 0,001$, Tukey).

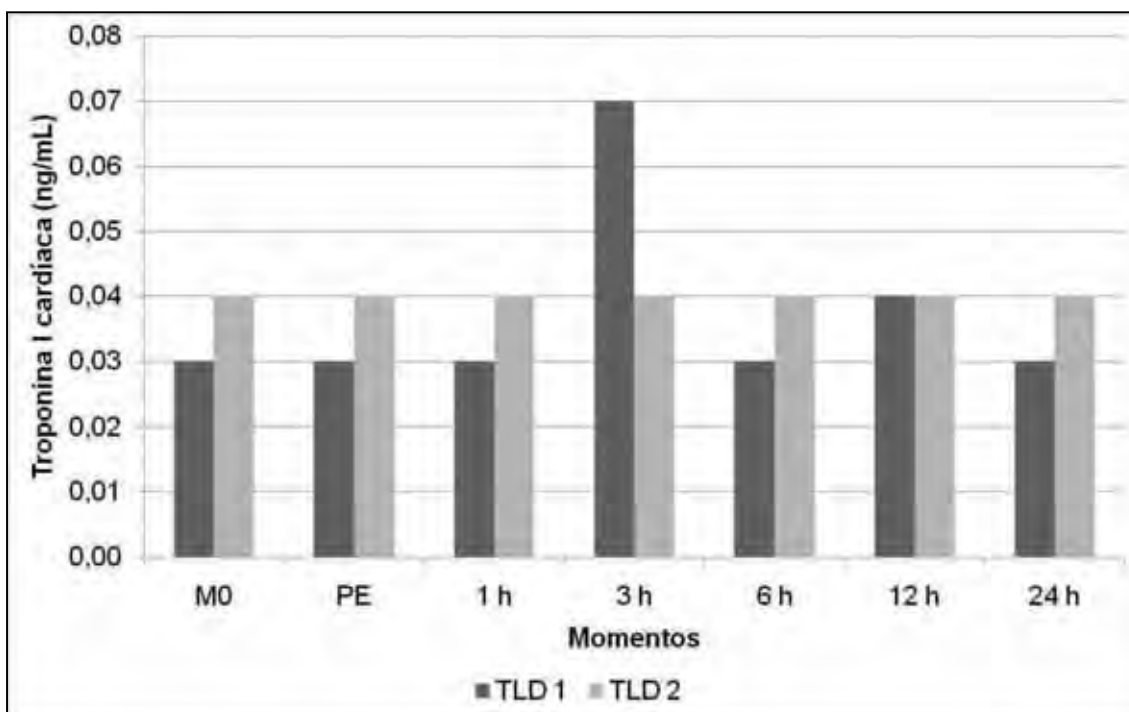


Figura 2. Medianas da concentração de troponina I cardíaca (ng/mL) de 10 equinos submetidos ao teste de baixa intensidade e longa duração (TLD) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2).

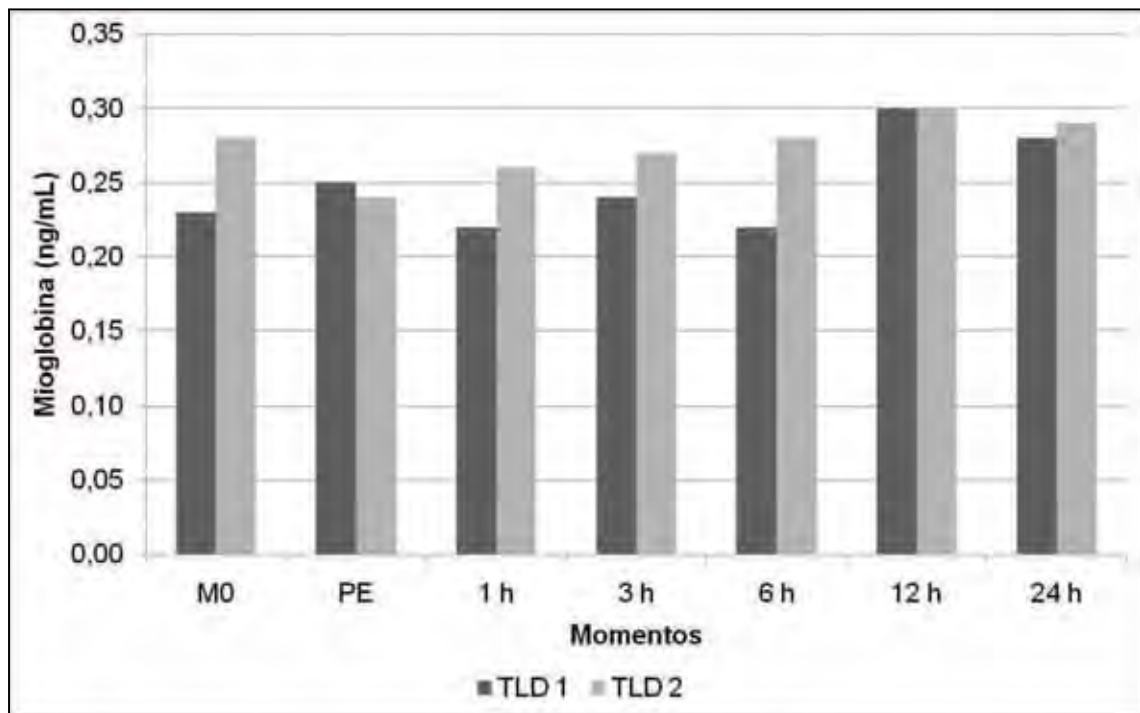


Figura 3. Médias da concentração de mioglobina (ng/mL) de 10 equinos submetidos ao teste de baixa intensidade e longa duração (TLD) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2).

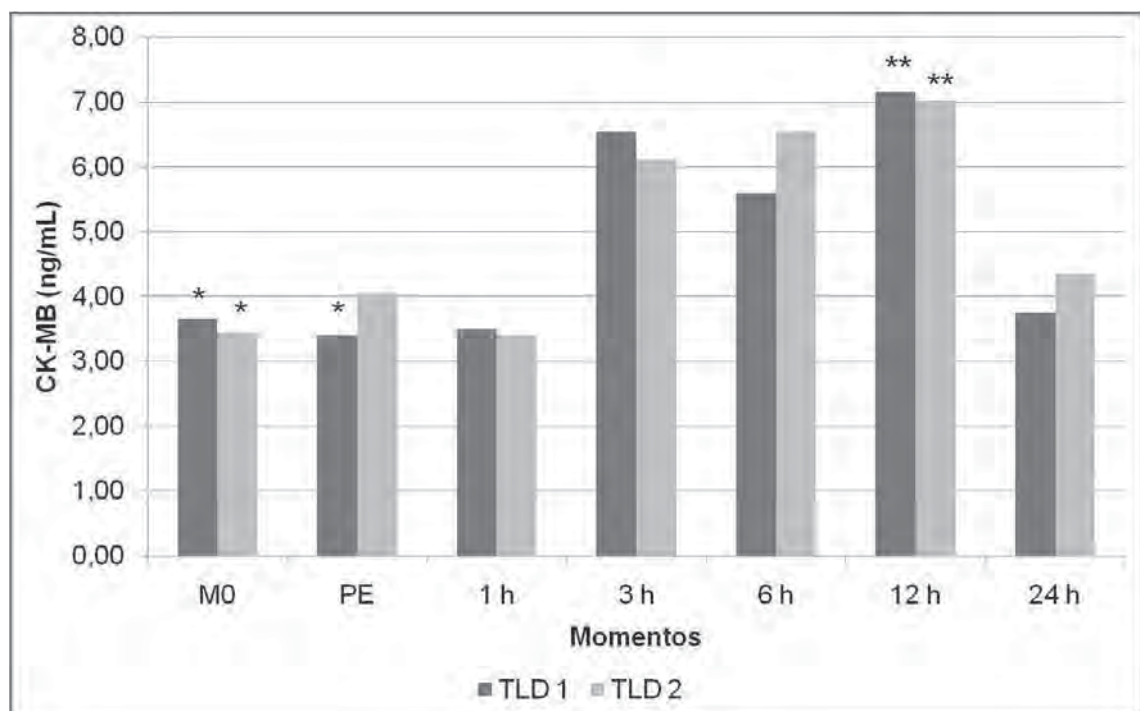


Figura 4. Medianas da concentração de CK-MB (ng/mL) de 10 equinos submetidos ao teste de baixa intensidade e longa duração (TLD) antes (1) e após a suplementação com vitamina E (2). * e ** indicam diferença estatística entre momentos dentro da mesma prova ($p < 0,01$, Kruskal-Wallis).

DISCUSSÃO

O exercício prolongado de enduro promove o estresse oxidativo, sendo avaliado pelo aumento dos níveis de MDA¹⁷. Neste experimento, o exercício não causou elevações na concentração de MDA tanto em TLD1 como em TLD2. Al-Qudah et al.¹⁷ demonstraram aumento do MDA de $1,56 \pm 0,65$ nmol/mL para 4,58 nmol/mL em equinos após completarem 90 km de uma prova de enduro de 120 km, com variação de temperatura de 15 a 25°C e de umidade de 30 a 32%. Marlin et al.¹⁸ também encontraram valores aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que incluem o MDA, após prova de enduro de 140 km, em condições ambientais de 15 a 19°C de temperatura e 62 a 88% de umidade. A temperatura e umidade do salão onde os animais realizaram os testes neste estudo foram próximas das encontradas por Marlin et al.¹⁸. Segundo Mills et al.¹⁹, o ambiente quente e úmido parece aumentar a lipoperoxidação e exacerbar o estresse oxidativo. A temperatura e umidade amenas do presente estudo possivelmente influenciaram nesse aspecto, ocasionando menor taxa de peroxidação lipídica. Acredita-se ainda que o protocolo experimental e/ou possivelmente o bom condicionamento físico dos animais, embora não fossem treinados, não permitiram demonstrar a evidência clássica de estresse oxidativo.

Williams et al.²⁰ relataram que o fornecimento de uma quantidade média de 2.557 UI do antioxidante por dia não estimulou o desempenho atlético tampouco promoveu a melhoria na saúde e bem-estar de um modo geral em equinos participantes de prova de enduro de 80 km. Em contrapartida, de acordo com os resultados, observou-se nitidamente o efeito benéfico da suplementação com vitamina E ao diminuir os níveis do marcador de lipoperoxidação.

Segundo Atalay e Sen¹⁰, um episódio de exercício físico agudo pode causar danos oxidativos ao coração. No presente estudo, foi constatado um pequeno aumento da concentração de TIC em 3 h em TLD1, discretamente acima do limite superior da variação de normalidade descrita por Divers et al.²¹ de 0,0 a 0,06 ng/mL, porém sem significância. Michima et al.²² não encontraram elevação do nível de TIC após provas de enduro de 60, 80, 120 e 160 km, mesmo nos animais desqualificados por alterações metabólicas, concluindo

que esse tipo de exercício não causa injúrias cardíacas graves. Em desacordo, Holbrook et al.²³ relataram aumento significativo de TIC após competições de enduro de 80 e 160 km. Os autores não observaram efeito significativo da distância percorrida, da posição de chegada e da velocidade média sobre os valores do marcador, incluindo os animais desqualificados, exceto na prova de 80 km da qual os animais desqualificados apresentaram maior concentração em relação aos animais que não alcançaram as 10 primeiras colocações. Assim, sugeriram que o exercício de enduro causa certo grau de estresse miocárdico em alguns cavalos, apesar de que os fatores predisponentes associados com o exercício, como o nível de condicionamento físico e o desequilíbrio hidroeletrolítico, não foram determinados nesse estudo.

Embora os mecanismos de liberação de TIC induzida pelo exercício ainda não tenham sido totalmente estabelecidos, especula-se que a via principal seja por aumento da permeabilidade dos cardiomiócitos, que libera a troponina dissolvida no citosol celular, causando pequena elevação da proteína na circulação, de maneira reversível e não por uma necrose permanente como ocorre no infarto do miocárdio^{23,24}. Sabe-se que em cães a troponina livre no citosol corresponde a 2 a 8% do total²⁴ e em humanos, 3,5%²⁵, sendo que na espécie equina esse valor não é conhecido.

Um fator importante a ser considerado com relação às divergências dos dados na literatura são os diferentes sistemas analisadores que utilizam aminoácidos distintos para composição dos anticorpos monoclonais^{5,26}. A dificuldade em comparar os dados com os apresentados na literatura se deve a essa divergência de metodologias e tipos de amostragem⁵. Há necessidade de um estudo amplo comparando os diversos tipos de kits analisadores comerciais para determinação da TIC na espécie equina, como já realizado para humanos, ratos, cães e macacos^{27,28}.

Observou-se aumento da CK-MB em 3 h em ambas as provas, porém somente em 12 h foi significativamente maior em relação ao M0. Esses dados sugerem que houve um leve estresse miocárdico, mas sem significância clínica aparente. Michima et al.²⁹ não verificaram aumento da CK-MB em equinos de enduro, tanto os que finalizaram as provas como os desqualificados por causa metabólica ou claudicação. Os autores acreditam que a utilização da CK-MB como único marcador cardíaco não traz informações relevantes a respeito da

integridade cardíaca sob influência do exercício. Neste estudo, o aumento de CK-MB foi acompanhado pela pequena elevação de TIC, embora tenha ocorrido somente em TLD1, sugerindo o estresse miocárdico. Não foi evidenciado o efeito protetor da vitamina E sobre o miocárdio, uma vez que os níveis tanto de TIC como de CK-MB não se alteraram após a suplementação.

Quanto à concentração de mioglobina, as alterações ocasionadas pelo exercício e pela suplementação foram muito sutis. Com base nesses dados, sugere-se que a utilização desse marcador não seja adequada para avaliação miocárdica em equinos submetidos a exercício de baixa intensidade. Talvez essa proteína seja mais útil na avaliação da musculatura esquelética³⁰.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente estudo, foi possível concluir que o exercício de baixa intensidade e longa duração promoveu um estresse miocárdico em equinos evidenciado pelo aumento de CK-MB, mas não foi considerado grave. Verificou-se também o efeito benéfico da suplementação da vitamina E pela diminuição da concentração de MDA plasmática em todos os momentos avaliados, porém não houve influência do antioxidante sobre miocárdio. Para uma melhor compreensão dos mecanismos de liberação dos marcadores cardíacos induzidos pelo exercício, recomenda-se novas pesquisas, principalmente que considerem os diferentes tipos de analisadores na espécie equina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo subsídio financeiro, à Dr^a Débora Damasceno pelas análises dos marcadores cardíacos, e à equipe do Prof. Dr. Roberto Carlos Burini pelas determinações de malondialdeído.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Projeto aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 188/2007-CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

REFERÊNCIAS

1. 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 American Veterinary Medical Association* **216**: 554-558.
2. Yonezawa LA, Machado LP, Silveira VF, Watanabe MJ, Saito ME, Kitamura SS, Agumi K (2009). Exame eletrocardiográfico em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade e à suplementação com vitamina E. *Archives of Veterinary Science* **14**: 134-142.
3. Kane ED (2009). Vitamin E: an essential nutrient for horses? *Advances in Equine Nutrition* **4**: 73-85.
4. Williams CA, Carlucci SA (2006). Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin E and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Veterinary Journal Supplement* **36**: 617-621.
5. Yonezawa LA, Machado LP, Silveira VF, Watanabe MJ, Saito ME, Kitamura SS, Kohayagawa A (2010). Malondialdeído e troponina I cardíaca em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E. *Ciência Rural* **40**: 1321-1326.
6. Lykkesfeldt J, Svendsen O (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal* **173**: 502-511.
7. Kostaropoulos IA, Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Ikonomou GV, Makrygiannis V, Papadopoulos G, Kouretas D (2006). Comparison of the blood redox status between long-distance and short-distance runners. *Physiological Research* **55**: 611-616.
8. Souza Jr TP, Oliveira PR, Pereira B (2005). Exercício físico e estresse oxidativo. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência

- urinária e malondialdeído plasmático. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **11**: 91-96.
9. de Moffarts B, Kirschvink N, Art T, Pincemail J, Lekeux P (2005). Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Veterinary Journal* **165**: 65-74.
10. Atalay M, Sen CK (1999). Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Annals of New York Academy of Sciences* **874**: 169-177.
11. Ascensão A, Magalhães J, Soares J, Oliveira J, Duarte JA (2003). Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Revista Portuguesa de Cardiologia* **22**: 651-678.
12. Whyte GP, George K, Sharma S, Lumley S, Gates P, Prasad K, McKenna WJ (2000). Cardiac fatigue following prolonged endurance exercise of differing distances. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **32**: 1067-1072.
13. Watanabe MJ, Silveira VF, Machado LP, Yonezawa LA, Kohayagawa A, Thomassian A (2009). Aplicação da espirometria durante teste padrão de exercício progressivo em esteira para avaliação da troca gasosa respiratória de equinos da raça Árabe. *Archives of Veterinary Science* **14**: 17-24.
14. Prince A, Geor R, Harris P, Hoekstra K, Gardner S, Hudson C, Pagan J (2002). Comparison of the metabolic responses of trained Arabians and Thoroughbreds during high- and low-intensity exercise. *Equine Veterinary Journal. Supplement* **34**: 95-99.
15. Nutrient Requirements of Horses (2007). Sixth edition. Disponível em: <http://nrc88.nas.edu/nrh/>.
16. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry* **43**: 1209-1214.
17. Al-Qudah KM, Al-Majali AM (2008). Higher lipid peroxidation indices in horses eliminated from endurance race because of synchronous diaphragmatic flutter (thumps). *Journal of Equine Veterinary Science* **28**: 573-578.
18. Marlin DJ, Fenn K, Smith N, Deaton CD, Roberts CA, Harris PA, Dunster C, Kelly FJ (2002). Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *Journal of Nutrition* **132**: 1622S-1627S.

19. Mills PC, Smith NC, Casas I, Harris P, Harris RC, Marlin DJ (1996). Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **74**: 60-66.
20. Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, Saker KE, Waldron JE, Harris PA (2005). Vitamin E intake and systemic antioxidant status in competitive endurance horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* **2**: 149-152.
21. Divers TJ, Kraus MS, Radcliffe RM, Jesty SA, Gelzer A, Soderholm LV, Mitchell LM, Ducharme NG (2010). Measurement and clinical use of cardiac troponin I (TIC) in horses. *Proceedings of 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2010/z9100110000277.pdf>. Acesso em 07 de jan 2011.
22. Michima LES, Miyashiro P, Bonomo CMC, Fernandes WR (2007). Influência do exercício físico prolongado nos valores séricos de troponina I cardíaca em cavalos de enduro. *Anais da VIII Conferência Anual da Abraveq*. Disponível em:
http://www.abraveq.com.br/artigos_viiiconferencia2007/arquivo58.pdf. Acesso em 07 jan 2011.
23. 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.
24. Yonezawa LA, Silveira VF, Machado LP, Kohayagawa A (2010). Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Ciência Rural* **40**: 222-230.
25. Korff S, Katus HA, Giannitsis E (2006). Differential diagnosis of elevated troponins. *Heart* **92**: 987-993.
26. Durando MM, Reef VB, Kline K, Birks EK (2007). Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* **3**: 217-223.
27. Panteghini M, Pagani F, Yeo KTJ, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Ravkilde J, Wu AHB (2004). Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clinical Chemistry* **50**: 327-332.

28. Apple FS, Murakami MM, Ler R, Walker D, York M (2008). Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clinical Chemistry* **54**:1982-1989.
29. Michima LES, Mirandola RMS, Fernandes WR (2010). Estudo da isoenzima creatina quinase CKMB sérica em equinos de enduro após exercício físico prolongado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **47**: 23-30.
30. Holmgren N, Valberg S (1992). Measurement of serum myoglobin concentrations in horses by immunodiffusion. *American Journal of Veterinary Research* **53**: 957-960.

Capítulo IV



**Albumina modificada pela isquemia como indicador da condição
isquêmica do miocárdio de equinos exercitados em diferentes
intensidades na esteira de alta velocidade**

Artigo a ser enviado para o periódico *Comparative Exercise Physiology*.

ISSN: 1755-2540

Normas para publicação disponível em:

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

Albumina modificada pela isquemia como indicador da condição isquêmica do miocárdio de equinos exercitados em diferentes intensidades na esteira de alta velocidade

RESUMO

A albumina modificada pela isquemia (AMI) é considerada um marcador de isquemia miocárdica em humanos em contraste aos demais marcadores cardíacos que são liberados quando ocorre necrose. Pouco se sabe sobre suas condições de liberação no exercício, sendo este o primeiro relato na espécie equina. Desta forma, o presente estudo objetivou determinar a AMI para avaliação da condição isquêmica do miocárdio induzida pelo exercício de alta e baixa intensidades em equinos. Utilizaram-se 10 equinos, sendo cinco Árabes e cinco Crioulos, machos e fêmeas, clinicamente saudáveis e sem treinamento prévio, os quais foram submetidos a um teste de rápida aceleração e curta duração (TRA), considerado de alta intensidade e, sete dias após, a um teste de baixa intensidade e longa duração (TLD). As amostras de sangue foram colhidas nos momentos antes, durante, imediatamente após o término do teste e aos 15 e 30 min subsequentes. Determinou-se a AMI, lactato e albumina séricos e o malondialdeído (MDA) plasmático. Não se observou alterações significativas na concentração de AMI em nenhum dos testes, embora haja uma leve tendência à diminuição dos valores. Houve correlação negativa entre as concentrações de AMI e albumina em ambos os testes e entre AMI e lactato em TLD, mas não entre AMI e MDA. Concluiu-se que os testes TRA e TLD não promoveram alterações significativas na AMI, sugerindo-se que esse marcador não seja sensível para avaliação da isquemia miocárdica na espécie equina em condições de exercício.

Palavras-chave: marcador de isquemia, malondialdeído, cavalo, fisiologia do exercício.

INTRODUÇÃO

Em medicina esportiva equina, há constante preocupação com a queda de desempenho dos animais atletas em decorrência de diversas disfunções

orgânicas. Dentre elas, as cardiovasculares são responsáveis por alterações que acarretam desde uma intolerância ao exercício até a morte súbita e são referidas como a terceira maior causa de queda de desempenho^{1,2}.

Sabe-se que o exercício pode causar elevação de marcadores bioquímicos cardioespecíficos na corrente sanguínea^{3,4,5}. Entretanto, os marcadores cardíacos disponíveis atualmente apresentam limitada sensibilidade em casos de condição isquêmica reversível no início da lesão⁶. Assim, a albumina modificada pela isquemia (AMI) emergiu como uma modalidade diagnóstica muito útil para avaliar pacientes humanos com síndrome coronariana aguda, correspondendo ao único marcador de isquemia aprovado pelo FDA americano (*U.S. Food and Drug Administration*)^{7,8}.

A porção amino-terminal da albumina plasmática normalmente tem afinidade com metais de transição como o cobalto, cobre e níquel. Em condições de isquemia, a falta de oxigênio localizada em áreas do coração induz uma série de reações envolvendo espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a alteração da estrutura amino-terminal da albumina e produzindo a AMI com baixa afinidade aos metais^{6,8,9}. Sua mensuração é realizada indiretamente pelo método de ligação do cobalto à albumina, sendo que uma quantidade de cobalto constante reage com o soro do paciente e se liga à albumina, enquanto que o cobalto não ligado remanescente é mensurado por espectrofotometria^{6,9}.

Há relatos que a concentração de AMI aumenta dentro de seis a 10 minutos após o início da isquemia miocárdica, permanecendo elevada por até seis horas, permitindo a detecção de condição isquêmica antes do desenvolvimento de necrose miocárdica evidenciada pela mensuração de CK-MB, troponina cardíaca e mioglobina^{8,10}. Considerando a depuração da AMI, as alterações à molécula de albumina são reversíveis, e podem retornar às condições pré-isquêmicas em poucas horas (12 a 24 h) com a remoção das ERO ou rápida depuração devido a modificações conformacionais da proteína¹¹. Piva et al.¹² ainda sugerem que a AMI possa ser um indicador de estresse oxidativo.

Muitos estudos foram realizados avaliando o valor da AMI como marcador de isquemia em pessoas que realizaram diversos tipos de atividade física^{7,13,14,15,16,17}. Sabe-se que não há uma resposta homogênea em alterações

dos níveis de AMI induzidas pelo exercício e há um consenso que novos estudos devem ser realizados para suprir a carência dessas informações. Em medicina veterinária, não há dados referentes à AMI, sendo o presente estudo o primeiro relato de utilização como marcador de isquemia cardíaca em equinos. Deste modo, o presente estudo objetivou a determinação da albumina modificada pela isquemia para avaliação da condição isquêmica do miocárdio induzida pelo exercício de diferentes intensidades em equinos.

MATERIAL e MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se 10 equinos, sendo cinco da raça Puro Sangue Árabe e cinco da raça Crioula, sem treinamento físico por mais de um ano, com idade variando de oito a 10 anos, peso médio de $372,1 \pm 32,9$ kg, clinicamente hígidos. Os animais foram mantidos em piquetes do 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 e sanitário. O manejo nutricional consistiu de alimentação à base de feno de capim “coast-cross” (*Cynodon dactylon*), ração comercial para equinos (Royal Horse Sport, Socil, Brasil), suplemento mineral (Equifós, Matsuda, Brasil) e água *ad libitum*.

Delineamento experimental

Os equinos foram submetidos a um teste padrão de exercício progressivo em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) inclinada a 6%, da qual a velocidade foi elevada gradualmente, com o protocolo de exercício proposto por Watanabe et al.¹⁸. Utilizou-se a máscara de análise de trocas gasosas e dados ventilatórios (Metavet, Cortex, Alemanha), para se extrair a carga de trabalho para cada equino, com base no consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$)¹⁸, sendo o valor médio dos animais de $110,4 \pm 20,4$ mL/kg/min.

Após sete dias do teste progressivo, os equinos foram submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA). O teste, considerado de exercício predominantemente anaeróbico (concentração de lactato maior que 4

mmol/L) consistiu, em esteira inclinada a 6%, um período de aquecimento de 5 min para a carga de trabalho de 50% do $VO_{2\text{máx}}$ (velocidade média de $3,7 \pm 0,9$ m/s), seguido por mais 5 min à velocidade de 1,5 m/s. A manta da esteira foi então acelerada tão rapidamente quanto possível para a velocidade individual calculada, para alcançar uma carga de trabalho de 105% do $VO_{2\text{máx}}$ (velocidade média de $9,2 \pm 2,1$ m/s), com duração de 90 s. O equino foi então submetido a um período de desaquecimento consistindo de 5 min à velocidade de 3,0 m/s¹⁹, com a esteira na posição horizontal.

Sete dias após o primeiro TRA, os equinos foram submetidos ao teste de baixa intensidade e longa duração (TLD). O teste, considerado de exercício predominantemente aeróbico (concentração de lactato inferior a 4 mmol/L), foi realizado com a esteira inclinada a 6%, à velocidade de 35% do $VO_{2\text{máx}}$ de cada animal pelo período de 60 min¹⁹ correspondendo a uma velocidade média de $2,3 \pm 0,5$ m/s.

Colheita e processamento das amostras

No dia dos testes, cada equino foi preparado para o exercício que consistiu da cateterização da veia jugular com o uso de cateter 14 G, conectado a um extensor acoplado a uma torneira de três vias, para proceder a colheita de sangue mediante auxílio de seringa de 20 mL. As amostras obtidas foram transferidas para tubos contendo ativador da coagulação para obtenção de soro, e tubos com EDTA potássico. No circuito, após cada colheita, foi infundida solução fisiológica heparinizada (1.000 UI a cada 1 L de solução), para evitar coagulação de sangue no mesmo. O soro e o plasma foram imediatamente separados e congelados a -80°C até serem processadas.

As colheitas de sangue foram realizadas nos momentos M0 (antes do exercício), DE (durante o exercício), PE (imediatamente após) e aos 15 min e 30 min após o término do teste. No TRA, o momento durante o exercício compreendeu após o animal completar a velocidade de 105% do $VO_{2\text{máx}}$, enquanto que no TLD correspondeu aos 30 minutos de exercício, ou seja, após completar metade do protocolo.

A concentração sérica de AMI foi determinada pela técnica de ligação da albumina ao cobalto descrita por Bar-Or et al.²⁰, sendo os resultados expressos em unidades de absorbância (ABSU). Analisou-se ainda as concentrações

séricas de albumina e lactato séricos por meio de kit comercial (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil) e analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus, Roche, Montclair, EUA), e de malondialdeído plasmático por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Corp., Tóquio, Japão), segundo Nielsen et al.²¹.

Análise estatística

Realizou-se a análise estatística, inicialmente pela análise descritiva das variáveis e a comparação entre os grupos pela análise de variância e posterior teste de múltipla amplitude de Tukey. As correlações entre a AMI com as variáveis albumina, lactato e MDA foram determinadas pelo teste de Pearson. Todas as análises foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Considerando as raças de equinos utilizadas, não houve diferença estatística entre as variáveis e, assim, os dados estão apresentados em conjunto. As concentrações séricas de AMI, albumina e lactato e os níveis de malondialdeído plasmáticos estão apresentados na Tabela 1. O exercício físico promoveu discreta redução da concentração de AMI em ambas as provas, porém sem significância. A albumina se elevou discretamente durante o exercício no TRA e imediatamente após no TLD, porém só houve diferença estatística entre DE e 30 min ($P = 0,012$). Como esperado, os níveis de lactato aumentaram estatisticamente no teste de alta intensidade (TRA), permanecendo elevados até 30 min ($P < 0,01$), o que não ocorreu no teste de baixa intensidade (TLD). Observou-se aumento do MDA em ambas as provas, sendo que os valores de TLD foram sempre maiores que TRA, porém sem diferença significativa.

A AMI não apresentou correlação com o lactato em TRA ($r = -0,20$; $P = 0,167$), ao contrário de TLD ($r = -0,39$; $P = 0,0047$), embora considerada baixa, foi significativa. As correlações entre AMI e albumina também foram consideradas baixas mas significativas tanto em TRA ($r = -0,37$; $P = 0,007$) como TLD ($r = -0,30$; $P = 0,0349$). Não houve correlação entre a albumina modificada pela isquemia e MDA (TRA: $r = -0,17$; $P = 0,241$, TLD: $r = -0,054$; $P = 0,711$).

Tabela 1. Médias ($\pm$ desvios-padrão) da albumina modificada pela isquemia (ABSU), albumina sérica (g/dL), lactato sérico (mmol/L) e de malondialdeído (μ mol/L) de dez equinos no teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) e no teste de baixa intensidade e longa duração (TLD).

		Momentos					
		M0	DE	PE	15 min	30 min	P
AMI	TRA	0,292 (±0,056)	0,250 (±0,056)	0,242 (±0,071)	0,261 (±0,059)	0,276 (±0,057)	0,943
	TLD	0,277 (±0,021)	0,276 (±0,043)	0,246 (±0,026)	0,253 (±0,023)	0,250 (±0,026)	0,062
	P	0,478	0,274	0,882	0,711	0,228	
ALB	TRA	3,54 ^{ab} (±0,27)	3,72 ^a (±0,17)	3,66 ^{ab} (±0,27)	3,44 ^{ab} (±0,27)	3,35 ^b (±0,16)	0,012
	TLD	3,50 (±0,29)	3,47 (±0,44)	3,63 (±0,31)	3,55 (±0,31)	3,48 (±0,27)	0,5887
	P	0,774	0,132	0,856	0,464	0,235	
LAC	TRA	3,77 ^a (±1,32)	18,44 ^{Abc} (±3,28)	21,07 ^{Ab} (±0,57)	18,43 ^{Abc} (±3,47)	15,15 ^{Ac} (±5,96)	<0,01
	TLD	3,74 (±1,43)	3,58 ^B (±1,17)	4,26 ^B (±1,59)	4,28 ^B (±1,70)	4,04 ^B (±1,47)	0,809
	P	0,973	<0,001	<0,0001	<0,001	<0,001	
MDA	TRA	1,38 (±0,35)	1,47 (±0,40)	1,54 (±0,38)	1,41 (±0,27)	1,38 (±0,28)	0,811
	TLD	1,56 (±0,40)	1,52 (±0,33)	1,61 (±0,39)	1,55 (±0,35)	1,50 (±0,28)	0,848
	P	0,296	0,742	0,661	0,344	0,351	

M0: antes do exercício, DE: durante o exercício, PE: imediatamente após o exercício, AMI: albumina modificada pela isquemia, ALB: albumina, LAC: lactato, MDA: malondialdeído.

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística entre momentos.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística entre provas.

DISCUSSÃO

Muitos trabalhos relatam a diminuição da AMI após atividade física em humanos, tanto em exercício submáximo^{7,15,17} como em provas de

maratona^{13,23}. De acordo, os dados do presente trabalho indicaram uma leve tendência à redução dos valores de AMI séricos induzida pelo exercício, embora sem significância.

Sbarouni et al.¹⁶ observaram que o nível de AMI diminuiu significativamente no pico do exercício submáximo em esteira, comparado ao de repouso e retornou ao normal após 60 min. Sugeriram, então, que a AMI parece não refletir a isquemia miocárdica, propondo que a hemoconcentração que ocorre durante o exercício deve aumentar a concentração de albumina e subsequentemente diminuir a porção não ligada de cobalto, podendo causar um falso negativo. Corroborando com essas informações, um estudo em pacientes com suspeita de doença coronariana verificou menores níveis de AMI após exercício submáximo, obtendo-se uma correlação negativa entre as concentrações de AMI e albumina ($r=-0,484$; $P=0,002$)¹⁵.

Lee et al.¹⁷, que também verificaram a diminuição da AMI pós-exercício submáximo em esteira, não encontraram correlação entre AMI e albumina, sugerindo uma possível interferência do lactato sobre a determinação de AMI, uma vez que concentrações *in vitro* de 3 a 11 mmol/L de lactato reduziram os valores de AMI de 7 a 25%²². De fato, Kim et al.⁷ verificaram correlação entre a AMI e o lactato após exercício submáximo em esteira ($r=-0,61$; $P<0,01$). No presente estudo, no teste de alta intensidade, os menores valores de AMI se devem à influência da hemoconcentração, pois houve boa correlação do marcador de isquemia com a albumina sérica, mas não houve interferência do lactato.

Apple et al.¹³ e Middleton et al.²² relataram que a concentração de AMI diminuiu imediatamente após o exercício comparado ao pré-exercício em maratonistas. Ambos os estudos não estabeleceram correlação entre AMI e albumina, e ainda questionaram a eficácia da AMI em determinar isquemia cardíaca produzida por exercício. Com base nos resultados apresentados no teste de baixa intensidade e longa duração, houve uma possível interferência da albumina e do lactato sobre os valores diminuídos de AMI devido às baixas, porém significativas correlações entre as variáveis. Middleton et al.²² ainda sugerem que, uma vez que a albumina facilita o transporte e metabolismo dos ácidos graxos livres, é possível que a redução da relação AMI:albumina total

seja em função da maior utilização desses ácidos graxos durante o exercício prolongado.

Como não houve correlação entre os valores de AMI e de MDA, este estudo não recomenda a determinação da AMI como marcador de estresse oxidativo, como reportado por Piva et al.¹², em exercícios de alta e baixa intensidades. Entretanto, sugere-se que a AMI possa ser associada ao MDA em outras situações, como nas enfermidades miocárdicas isquêmicas, uma vez que está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio.

Como os mecanismos de alteração da AMI durante o exercício não foram estabelecidos, possivelmente, fatores interferentes como a albumina ou lactato devem ser considerados, além de outros tecidos predispostos à isquemia além do miocárdio²³. Embora os dados da literatura sugiram que o exercício não promove qualquer ou alguma isquemia miocárdica, acredita-se que há isquemia cardíaca induzida pelo exercício, todavia a AMI não seria um bom marcador para essa determinação. Novos estudos devem ser realizados a fim de averiguar essas informações e estabelecer se a AMI é sensível para a determinação da condição isquêmica no equino em situações além do exercício físico.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que os exercícios de alta e baixa intensidades não promoveram alterações significativas na albumina modificada pela isquemia, sugerindo que esse marcador não foi sensível para esse tipo de avaliação na espécie equina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo subsídio financeiro, e à equipe do Prof. Dr. Roberto Carlos Burini pelas determinações de malondialdeído, e à equipe da Prof^a Dr^a Regina Kiomi Takahira pelas dosagens de lactato e albumina.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Projeto aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 188/2007-CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

REFERÊNCIAS

1. 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 American Veterinary Medical Association* **216**: 554-558.
2. Yonezawa LA, Machado LP, Silveira VF, Watanabe MJ, Saito ME, Kitamura SS, Agumi K (2009). Exame eletrocardiográfico em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade e à suplementação com vitamina E. *Archives of Veterinary Science* **14**: 134-142.
3. 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.
4. Durando MM, Reef VB, Kline K, Birks EK (2007). Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* **3**: 217-223.
5. Yonezawa LA, Machado LP, Silveira VF, Watanabe MJ, Saito ME, Kitamura SS, Kohayagawa A (2010). Malondialdeído e troponina I cardíaca em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E. *Ciência Rural* **40**: 1321-1326.
6. Yonezawa LA, Silveira VF, Machado LP, Kohayagawa A (2010). Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Ciência Rural* **40**: 222-230.
7. Kim JH, Choi JH, Lee HK, Bae WH, Chun KJ, Kim YS, Lee SK, Kim HH, Hong TJ, Shin YW (2008). Ischemia-modified albumin (IMA) is not useful for detecting myocardial ischemia during symptom-limited exercise stress tests. *Korean Journal of Internal Medicine* **23**: 121-126.

8. Sbarouni E, Georgiadou P, Kremastinos DM, Voudris V (2008). Ischemia modified albumin: is this marker of ischemia ready for prime time use? *Hellenic Journal of Cardiology* **49**: 260-266.
9. Lee YW, Kim HJ, Cho YH, Shin HB, Choi TY, Lee YK (2007). Application of albumin-adjusted ischemia modified albumin index as an early screening marker for acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta* **384**: 24-27.
10. Christenson RH, Duh SW, Sanhai WR, Wu AHB, Holtman V, Painter P, Branham E, Apple FS, Murakami M, Morris SL (2001). Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clinical Chemistry* **47**: 464-470.
11. Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V (2011). Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **49**: 177-184.
12. Piva SJ, Duarte MMMF, Da Cruz IBM, Coelho AC, Moreira APL, Tonello R, Garcia SC, Moresco RN (2011). Ischemia-modified albumin as a oxidative stress biomarker in obesity. *Clinical Chemistry* **44**: 345-347.
13. Apple FS, Quist HE, Otto AP, Mathews WE, Murakami MM (2002). Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. *Clinical Chemistry* **48**: 1097-1100.
14. Roy D, Quiles J, Sharma R, Sinha M, Avanzas P, Gaze D, Kaski JC (2004). Ischemia-modified albumin concentrations in patients with peripheral vascular disease and exercise-induced skeletal muscle ischemia. *Clinical Chemistry* **50**: 1656-1660.
15. van der Zee PM, Verberne HJ, van Straalen JP, Sanders GTB, Van Eck-Smit BLF, Winter RJ, Fischer JC (2005). Ischemia-modified albumin measurements in symptom-limited exercise myocardial perfusion scintigraphy reflect serum albumin concentrations but not myocardial ischemia. *Clinical Chemistry* **51**: 1744-1746.
16. Sbarouni E, Georgiadou P, Theodorakis GN, Kremastinos DT (2006). Ischemia-modified albumin in relation to exercise stress testing. *Journal of American College of Cardiology* **48**: 2482-2484.

17. Lee DH, Jeon HK, Park HJ, Shin WS, Lee SW, Youn HJ, Kim CM, Lee HK (2010). Change in ischemia-modified albumin and its clinical significance during exercise stress testing. *Circulation Journal* **74**:484-489.
18. Watanabe MJ, Silveira VF, Machado LP, Yonezawa LA, Kohayagawa A, Thomassian A (2009). Aplicação da espirometria durante teste padrão de exercício progressivo em esteira para avaliação da troca gasosa respiratória de equinos da raça Árabe. *Archives of Veterinary Science* **14**: 17-24.
19. Prince A, Geor R, Harris P, Hoekstra K, Gardner S, Hudson C, Pagan J (2002). Comparison of the metabolic responses of trained Arabians and Thoroughbreds during high- and low-intensity exercise. *Equine Veterinary Journal. Supplement* **34**: 95-99.
20. Bar-Or D, Lau E, Winfler JV (2000). A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report. *Journal of Emergency Medicine* **19**: 311-315.
21. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry* **43**: 1209-1214.
22. Middleton N, Shave R, George K, Whyte G, Forster J, Oxborough D, Gaze D, Collinson P (2006). Novel application of flow propagation velocity and ischaemia-modified albumin in analysis of postexercise cardiac function in man. *Experimental Physiology* **91**: 511-519.
23. Scharhag J, George K, Shave R, Urhausen A, Kindermann W (2008). Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **40**: 1408-1415.

Capítulo V



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores de peroxidação lipídica e a vitamina E são os mais extensivamente estudados com relação à formação e redução do estresse oxidativo, respectivamente, induzido pelo exercício físico. Entretanto, há uma ampla variação de resultados e não foram estabelecidos ainda os benefícios reais da utilização desse antioxidante.

Com base nos resultados do presente estudo, observou-se que os exercícios de rápida aceleração e curta duração, considerado de alta intensidade, e de baixa intensidade e longa duração promoveram um estresse miocárdico em equinos evidenciado pelo aumento de CK-MB, mas não foi considerado grave. Houve ainda o efeito benéfico da suplementação da vitamina E pela diminuição da concentração de MDA plasmático em ambos os tipos de exercício, e de TCI sérica no teste de rápida aceleração e curta duração. Contudo, para uma melhor compreensão dos mecanismos de liberação dos marcadores cardíacos induzidos pelo exercício, são necessários novos estudos, principalmente que considerem os diferentes tipos de analisadores na espécie equina.

A albumina modificada pela isquemia não se mostrou eficaz na detecção de isquemia miocárdica nos equinos avaliados, uma vez que os exercícios de alta e baixa intensidades não promoveram alterações significativas. Sugeriu-se que esse marcador não foi sensível para esse tipo de avaliação na espécie equina. Há necessidade ainda de averiguar se ocorre isquemia cardíaca induzida pelo exercício, além de se estabelecer em quais outras condições que a AMI se mostra sensível em cavalos.

BIBLIOGRAFIA

1. AL-QUDAH, K.M.; AL-MAJALI, A.M. Higher lipid peroxidation indices in horses eliminated from endurance race because of synchronous diaphragmatic flutter (thumps). *Journal of Equine Veterinary Science*, v.28, n.10, p.573-578, 2008.
2. APPLE, F.S.; MURAKAMI, M.M.; LER, R.; WALKER, D.; YORK, M. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T

- immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clinical Chemistry*, v.54, n.12, p.1982-1989, 2008.
3. APPLE, F.S.; QUIST, H.E.; OTTO, A.P.; MATHEWS, W.E.; MURAKAMI, M.M. Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. *Clinical Chemistry*, v.48, n.7, p.1097-1100, 2002.
 4. ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J.; OLIVEIRA, J.; DUARTE, J.A. Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, v.22, n.5, p. 651-678, 2003.
 5. ATALAY, M.; SEN, C.K. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Annals of New York Academy of Sciences* **874**: 169-177. (1999).
 6. AVELLINI, L.; CHIARADIA, E.; GAITI, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.123, n.2, p.147-154, 1999.
 7. AVELLINI, L.; SILVESTRELLI, M.; GAITI, A. Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. *Veterinary Research Communications*, v.19, n.3, p.179-184, 1995.
 8. BAR-OR, D.; LAU, E.; WINFLER, J.V. (2000). A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report. *Journal of Emergency Medicine*, v.19, n.4, p.311-315, 2000.
 9. BENDERITTER, M.; HADJ-SAAD, F.; LHUISSIER, M.; MAUPOIL, V.; GUILLAND, J.C.; ROCHETTE, L. Effects of exhaustive exercise and vitamin B6 deficiency on free radical oxidative process in male trained rats. *Free Radicals Biology Medicine*, v.21, n.4, p.541-549, 1996.
 10. BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.52, p.302-310, 1978.
 11. CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v.30, n.2, p.441-449, 2007.
 12. CHIARADIA, E.; AVELLINI, L.; RUECA, F.; SPATERNA, A.; PORCIELLO, F.; ANTONIONI, M.T.; GAITI, A. Physical exercise, oxidative stress and

- muscle damage in racehorses. *Comparative and Biochemistry and Physiology. Part B*, v.119, n.4, p.833-836, 1998.
13. CHRISTENSON, R.H.; DUH, S.W.; SANHAI, W.R.; WU, A.H.B.; HOLTMAN, V.; PAINTER, P.; BRANHAM, E.; APPLE, F.S.; MURAKAMI, M.; MORRIS, S.L. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clinical Chemistry*, v.47, n.3, p.464-470, 2001.
14. COLLINSON, P.O.; GAZE, D.C. Biomarkers of cardiovascular damage. *Medical Principles and Practice*, v.16, n.4, p.247-261, 2007.
15. DEATON, C.M.; MARLIN, D.J. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.2, n.3, p.278-291, 2003.
16. DE MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; VAN ERCK, E.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Assessment of the oxidant-antioxidant blood balance in a field exercise test in Standardbred and eventing horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, v.2, n.4, p.253-261, 2005.
17. DIVERS, T.J.; KRAUS, M.S.; RADCLIFFE, R.M.; JESTY, S.A.; GELZER, A.; SODERHOLM, L.V.; MITCHELL, L.M.; DUCHARME, N.G. (2010). Measurement and clinical use of cardiac troponin I (cTnI) in horses. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 56, 2010, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore, 2010. Disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2010/z9100110000277.pdf>. Acesso em 07 de jan 2011.
18. DUBERSTEIN, K.J.; JOHNSON, S.E.; MCDOWELL, L.R.; OTT, E.A. Effects of vitamin E supplementation and training on oxidative stress parameters measured in exercising horses. *Comparative Exercise Physiology*, v.6, n.1, p.17-25, 2009.
19. DURANDO, M.M.; REEF, V.B.; KLINE, K.; BIRKS, E.K. Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, v.3, n.4, p.217-223, 2007.
20. GODOY, M.F.; BRAILE, D.M.; PURINI NETO, J. Troponina como marcador de injúria celular miocárdica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.71, n.4, p.629-633, 1998.

21. HOLMGREN, N.; VALBERG, S. Measurement of serum myoglobin concentrations in horses by immunodiffusion. *American Journal of Veterinary Research*, v.53, n.6, p.957-960, 1992.
22. KANE, E.D. Vitamin E: an essential nutrient for horses? *Advances in Equine Nutrition*, v.4, p.73-85, 2009.
23. KIM, J.H.; CHOI, J.H.; LEE, H.K.; BAE, W.H.; CHUN, K.J.; KIM, Y.S.; LEE, S.K.; KIM, H.H.; HONG, T.J.; SHIN, Y.W. Ischemia-modified albumin (IMA) is not useful for detecting myocardial ischemia during symptom-limited exercise stress tests. *Korean Journal of Internal Medicine*, v.23, n.3, p.121-126, 2008.
24. KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; FARNIR, F.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breeds. *Equine Veterinary Journal. Suplemento*, v.36, p.239-244, 2006.
25. KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Veterinary Journal*, v.177, n.2, p.178-191, 2007.
26. KORFF, S.; KATUS, H.A.; GIANNITSIS, E. Differential diagnosis of elevated troponins. *Heart*, v.92, n.7, p.987-993, 2006.
27. KOSTAROPOULOS, I.A.; NIKOLAIDIS, M.G.; JAMURTAS, A.Z.; IKONOMOU, G.V.; MAKRYGIANNIS, V.; PAPADOPOULOS, G.; KOURETAS, D. Comparison of the blood redox status between long-distance and short-distance runners. *Physiological Research*, v.55, n.6, p.611-616, 2006.
28. KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*, v.16, n.4, p.433-441, 2003.
29. LEE, D.H.; JEON, H.K.; PARK, H.J.; SHIN, W.S.; LEE, S.W.; YOUN, H.J.; KIM, C.M.; LEE, H.K. Change in ischemia-modified albumin and its clinical significance during exercise stress testing. *Circulation Journal*, v.74, n.3, p.484-489, 2010.
30. LEE, Y.W.; KIM, H.J.; CHO, Y.H.; SHIN, H.B.; CHOI, T.Y.; LEE, Y.K. Application of albumin-adjusted ischemia modified albumin index as an early screening marker for acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta*, v.384, n.1-2, p.24-27, 2007.

31. LEEUWENBURGH, C.; HOLLANDER, J.; LEICHTWEIS, S.; GRIFFIHS, M.; GORE, M.; JI, L.L. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *American Journal of Physiology*, v.272, n.1, pt.2, p.R363-R369, 1997.
32. LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal*, v.173, n.3, p.502-511, 2007.
33. MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH, N.; DEATON, C.D.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; DUNSTER, C.; KELLY, F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *Journal of Nutrition*, v.132, n.6, suppl.2, p.1622S-1627S, 2002.
34. 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). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.216, n.4, p.554-558, 2000.
35. MARTINS, C.S. Troponina. Estrutura, fisiopatologia e importância clínica para além da isquemia miocárdica. *Arquivos de Medicina*, v.23, n.6, p.221-240, 2009.
36. MCMENIMAN, N.P.; HINTZ, H.F. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. *Equine Veterinary Journal*, v.24, n.6, p.482-484, 1992.
37. MICHIMA, L.E.S.; MIRANDOLA, R.M.S.; FERNANDES, W.R. Estudo da isoenzima creatina quinase CKMB sérica em equinos de enduro após exercício físico prolongado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.47, n.1, p.23-30, 2010.
38. MICHIMA, L.E.S.; MIYASHIRO, P.; BONOMO, C.M.C.; FERNANDES, W.R. Influência do exercício físico prolongado nos valores séricos de troponina I cardíaca em cavalos de enduro. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 8, 2007, São Paulo. *Anais Eletrônicos...* São Paulo, 2007. Disponível em: http://www.abraveq.com.br/artigos_viiiconferencia2007/arquivo58.pdf. Acesso em 07 jan. 2011.
39. MIDDLETON, N.; SHAVE, R.; GEORGE, K.; WHYTE, G.; FORSTER, J.; OXBOROUGH, D.; GAZE, D.; COLLINSON, P. Novel application of flow propagation velocity and ischaemia-modified albumin in analysis of

- postexercise cardiac function in man. *Experimental Physiology*, v.91, n.3, p.511-519, 2006.
40. MILLS, P.C.; SMITH, N.C.; CASAS, I.; HARRIS, P.; HARRIS, R.C.; MARLIN, D.J. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, v.74, n.1-2, p.60-66, 1996.
41. NIELSEN, F.; MIKKELSEN, B.B.; NIELSEN, J.B.; ANDERSEN, H.R.; GRANDJEAN, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, v.43, n.7, p.1209-1214, 1997.
42. NUTRIENT REQUIREMENTS OF HORSES. Sixth edition, 2007. Disponível em: <http://nrc88.nas.edu/nrh/>. Acesso em: 07 jan. 2008.
43. NOSTELL, K.; HÄGGSTRÖM, J. Resting concentrations of cardiac troponin I in fit horses and effect of racing. *Journal of Veterinary Cardiology*, v.10, n.2, p.105-109, 2008.
44. PANTEGHINI, M.; PAGANI, F.; YEO, K.T.J.; APPLE, F.S.; CHRISTENSON, R.H.; DATI, F.; MAIR, J.; RAVKILDE, J.; WU, A.H.B. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clinical Chemistry*, v.50, n.2, p.327-332, 2004.
45. PHILLIPS, W.; GIGUÈRE, S.; FRANKLIN, R.P.; HERNANDEZ, J.; ADIN, D.; PELOSO, J.G. Cardiac troponin I in pastured and race-training Thoroughbred horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.17, n.4, p.597-599. (2003).
46. PIVA, S.J.; DUARTE, M.M.M.F.; DA CRUZ, I.B.M.; COELHO, A.C.; MOREIRA, A.P.L.; TONELLO, R.; GARCIA, S.C.; MORESCO, R.N. Ischemia-modified albumin as na oxidative stress biomarker in obesity. *Clinical Chemistry*, v.44, n.4, p.345-347, 2011.
47. POWERS, S.K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; MARTIN, D.; LIEU, F.K.; JI, L.L.; HERB, R.A. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *American Journal of Physiology*, v. 265, n.6, p.H2094-H2098, 1993.
48. PRINCE, A.; GEOR, R.; HARRIS, P.; HOEKSTRA, K.; GARDNER, S.; HUDSON, C.; PAGAN, J. Comparison of the metabolic responses of trained

- Arabians and Thoroughbreds during high- and low-intensity exercise. *Equine Veterinary Journal. Suplemento*, v.34, p.95-99, 2002.
49. REIMER, J.M.; REEF, V.B.; SWEENEY, R.W. Ventricular arrhythmias in horses: 21 cases (1984-1989). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.201, n.8, p.1237-1243, 1992.
50. ROY, D.; QUILES, J.; SHARMA, R.; SINHA, M.; AVANZAS, P.; GAZE, D.; KASKI, J.C. Ischemia-modified albumin concentrations in patients with peripheral vascular disease and exercise-induced skeletal muscle ischemia. *Clinical Chemistry*, v.50, n.9, p.1656-1660, 2004.
51. SBAROUNI, E.; GEORGIADOU, P.; KREMASTINOS, D.M.; VOUDRIS, V. Ischemia modified albumin: is this marker of ischemia ready for prime time use? *Hellenic Journal of Cardiology*, v.49, n.4, p.260-266, 2008.
52. SBAROUNI, E.; GEORGIADOU, P.; THEODORAKIS, G.N.; KREMASTINOS, D.T. Ischemia-modified albumin in relation to exercise stress testing. *Journal of American College of Cardiology*, v.48, n.12, p.2482-2484, 2006.
53. SBAROUNI, E.; GEORGIADOU, P.; VOUDRIS, V. Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v.49, n.2, p.177-184, 2011.
54. SCHARHAG, J.; GEORGE, K.; SHAVE, R.; URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.40, n.8, p.1408-1415, 2008.
55. SERRA, M.; PAPAKONSTANTINO, S.; ADAMCOVA, M.; O'BRIEN, P.J. Veterinary and toxicological applications for the detection of cardiac injury using cardiac troponin. *Veterinary Journal*, v.185, n.1, p.50-57, 2010.
56. SHAVE, R.; BAGGISH, A.; GEORGE, K.; WOOD, M.; SCHARHAG, J.; WHYTE, G.; GAZE, D.; THOMPSON, P.D. Exercise-induced cardiac troponin elevation. *Journal of the American College of Cardiology*, v.56, n.3, p.169-176, 2010.
57. SHAVE, R.; DAWSON, E.; WHYTE, G.; GEORGE, K.; GAZE, D.; COLLINSON, P. Altered cardiac function and minimal cardiac damage during prolonged exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.36, n.7, p.1098-1103, 2004.

58. SOFFLER, C. Oxidative Stress. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, v.23, n.1, p.135-157, 2007.
59. SOUZA JR, T.P.; OLIVEIRA, P.R.; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.11, n.1, p.91-96, 2005.
60. TIIDUS, P.M.; HOUSTON, M.E. Antioxidant and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.26, n.3, p.354-359, 1994.
61. VALBERG, S.J. Skeletal muscle function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 2008. Cap.15, p.459-484.
62. VAN DER ZEE, P.M.; VERBERNE, H.J.; VAN STRAALLEN, J.P.; SANDERS, G.T.B.; VAN ECK-SMIT, B.L.F.; WINTER, R.J.; FISCHER, J.C. Ischemia-modified albumin measurements in symptom-limited exercise myocardial perfusion scintigraphy reflect serum albumin concentrations but not myocardial ischemia. *Clinical Chemistry*, v.51, n.9, p.1744-1746, 2005.
63. VAN ERCK, E.; LOIGEROT, C.; LEKEUX, P.; KIRSCHVINK, N. Oxidative stress and clinical status in working Standardbred horses. In: BRITISH EQUINE VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 47, 2008, Liverpool. *Proceedings...* Liverpool, 2008. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/beva/2008/part4.pdf#nameddest=8>. Acesso em 07 jan 2011.
64. VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.331, n.1, p.63-68, 1996.
65. WATANABE, M.J.; SILVEIRA, V.F.; MACHADO, L.P.; YONEZAWA, L.A.; KOHAYAGAWA, A.; THOMASSIAN, A. Aplicação da espirometria durante teste padrão de exercício progressivo em esteira para avaliação da troca gasosa respiratória de equinos da raça Árabe. *Archives of Veterinary Science*, v.14, n.1, p.17-24, 2009.
66. 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. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.32, n.6, p.1067-1072, 2000.
67. WILLIAMS, C.A. Antioxidant supplementation to the exercising horse. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.145-150, 2010.
68. WILLIAMS, C.A. Oxidative stress or oxidant/antioxidant dis-equilibrium in horses? A hot topic. *Veterinary Journal*, v.177, n.2, p.157-178, 2008
69. WILLIAMS, C.A.; CARLUCCI, S.A. Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin E and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Veterinary Journal. Suplemento*, v.36, p.617-621, 2006.
70. WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M.; SAKER, K.E.; CRANDELL, K.M.; HOFFMAN, R.M.; HARRIS, P.A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *Journal of Animal Science*, v.82, n.2, p.588-594, 2004.
71. WILLIAMS, C.A.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M.; SAKER, K.E.; WALDRON, J.E.; HARRIS, P.A. Vitamin E intake and systemic antioxidant status in competitive endurance horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, v.2, n.3, p.149-152, 2005.
72. YONEZAWA, L.A.; MACHADO, L.P.; SILVEIRA, V.F.; WATANABE, M.J.; SAITO, M.E.; KITAMURA, S.S.; AGUEMI, K. Exame eletrocardiográfico em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade e à suplementação com vitamina E. *Archives of Veterinary Science*, v.14, n.3, p.134-142, 2009.
73. YONEZAWA, L.A.; MACHADO, L.P.; SILVEIRA, V.F.; WATANABE, M.J.; SAITO, M.E.; KITAMURA, S.S.; KOHAYAGAWA, A. Malondialdeído e troponina I cardíaca em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E. *Ciência Rural*, v.40, n.6, p.1321-1326, 2010a.
74. YONEZAWA, L.A.; SILVEIRA, V.F.; MACHADO, L.P.; KOHAYAGAWA, A. Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Ciência Rural*, v.40, n.1, p.222-230, 2010b.
75. YOUNG, L.E. Equine athletes, the equine athlete's heart and racing success. *Experimental Physiology*, v.88, n.5, p.659-663, 2003.