

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ELETROFORETOGRAMA DAS PROTEÍNAS DO SORO
DE EQUINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES
PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO**

PEDRITA CARVALHO FERREIRA ASSUNÇÃO

Botucatu-SP

Julho 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ELETROFORETOGRAMA DAS PROTEÍNAS DO SORO
DE EQUINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES
PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO**

PEDRITA CARVALHO FERREIRA ASSUNÇÃO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof Ass Dra
Elizabeth Moreira dos Santos
Schmidt

Nome: Pedrita Carvalho Ferreira Assunção

Título: **Eletroforetograma das proteínas do soro de equinos submetidos a diferentes protocolos de exercício**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Médica Veterinária
FMVZ-Unesp- Botucatu

Prof Dr José Jurandir Fagliari
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP- Jaboticabal

Prof Dr Marcos Jun Watanabe
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia
FMVZ-Botucatu- SP

Data de defesa: 19 de julho de 2013.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Assunção, Pedrita Carvalho Ferreira.

Eletoforetograma das proteínas do soro de equinos submetidos a diferentes protocolos de exercício / Pedrita Carvalho Ferreira Assunção. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Coorientador: Aguemi Kohayagawa

Capes: 50503030

1. Equino - Doenças. 2. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos. 3. Células musculares. 4. Ferimentos e lesões.

Palavras-chave: Equinos; Exercícios; Proteína de fase aguda.

Dedico com todo o amor e carinho este trabalho a minha querida Vovó Eulália, que tanto me ensinou nessa vida e de quem tenho tanta saudade! À minha filha amada e aos meus pais, que são o motivo principal de todas as conquistas e alegrias da minha vida!

A minha orientadora e amiga Elizabeth Schmidt e co-orientadora Agumi Kohayagawa que tornaram o meu sonho possível.

Agradecimentos

Conquistar essa importante etapa em minha carreira envolveu pessoas e instituições e à estes expresso a minha eterna gratidão, por tornarem isso possível.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo fomento ao projeto **FAPESP 08/57366-9**

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FMVZ-Unesp), Câmpus Botucatu**, por disponibilizar toda a infra estrutura e qualidade para o desenvolvimento e pesquisa do trabalho

Ao **Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, da FMVZ-Unesp**, por permitir a minha formação acadêmica.

À minha estimada orientadora e amiga **Prof Dra Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt**, por toda a dedicação e auxílio, por se fazer sempre presente na minha vida, pela preocupação constante com o meu desempenho e aprendizado e fazer a diferença como orientadora nesta instituição, ensinando valores éticos, profissionais e humanos. Por fazer desta, uma caminhada mútua, sem a qual nada disso seria possível. Por todo o carinho em todos os momentos vividos em Botucatu, por ser essa pessoa tão querida e com este coração tão grandioso.

À querida co-orientadora **Prof Dra Agnemi Kohayagawa**, por ser esse grande exemplo, por toda a oportunidade e confiança, pela preocupação e auxílio maternal, por todas as histórias e aprendizado. Por ter sido fundamental, no desenvolvimento do meu trabalho e na história desta Universidade. Tenho sempre mais a aprender com a senhora.

Ao **Prof Dr Marcos Jun Watanabe**, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa e ponderações sobre o meu trabalho.

A **Letícia Andreza Yonezawa e Tatiana de Souza Barbosa**, pelo auxílio com o material da pesquisa e por todo trabalho realizado, sem colaboração de vocês, este trabalho não seria possível.

Aos docentes do Laboratório Clínico Veterinário, **Prof Dra Regina K. Takahira, Prof Dr Raimundo de S. Lopes**, pelo auxílio durante o período de desenvolvimento deste trabalho e pelo conhecimento compartilhado.

Aos técnicos **Márcio J. Figueira e Adriana Figueira** por toda a disponibilidade e atenção e dosagens bioquímicas no Laboratório Clínico desta Universidade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós graduação desta Universidade, **José Roberto de Lalla Júnior, Maria Aparecida D. de A. Manuel e Carlos Pazini Junior**, pela prontidão e paciência em auxiliar em todas as situações.

Ao **Professor Dr José Jurandir Fagliari**, por toda atenção e auxílio durante a estadia em Jaboticabal e disponibilizar o Laboratório de Pesquisa da Pós graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho(FCAV-Unesp), Câmpus Jaboticabal, para processamento das amostras.

Ao **Paulo César da Silva**, do Laboratório de pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia da escola de Veterinária da FCAV-Unesp,sob responsabilidade do Prof Dr José Jurandir Fagliari, da FCAV-Unesp(Câmpus-Jaboticabal), pelo auxílio e disponibilidade na realização da Eletroforese SDS-PAGE e elaboração dos gráficos da mesma.

Ao docente do Instituto de Biociências desta Universidade, Departamento de Bioestatística, **Prof Dr Luciano Barbosa** pelo auxílio com a estatística do trabalho e toda disponibilidade prestada.

Aos docentes da Universidade Federal de Goiás, **Maria Clorinda Soares Fioravanti, Rosângela Alves de Oliveira e Paulo Henrique Jorge da Cunha**, por fazerem parte da minha história acadêmica me estruturado como profissional, incentivando sempre as minhas conquistas.

À toda equipe **Biota Projetos e Consultoria Ambiental**, em nome de **Cláudio Veloso Mendonça e Pablo Vinícius Mathias**, pela oportunidade nos trabalhos prestados, por toda atenção e confiança. Além da amizade e companheirismo reforçados, mesmo que distante, durante todo esse período, está é uma coquista partilhada à empresa com todo meu carinho.

À minha amada filha **Maitê Assunção**, por existir na minha vida e com toda a sua doçura e amor, ter tornado a distância um pouco mais fácil. Por me ensinar diariamente, a ser um ser humano melhor, por me fazer ter vontade de buscar o mundo e todas as estrelas do céu para oferecer, pela vida de alegrias e sorrisos que me proporciona. Por acreditar nos sonhos e me mostrar que a vida pode ser cada dia melhor, crendo que eu sou a melhor mãe do mundo e fazendo do eu te amo um curativo diário para todas as minhas aflições.

Aos meus pais **Ediná Carvalho Ferreira Assunção e Anézio Ferreira da Assunção**, por terem me ensinando todos os valores de uma vida, por seguirem ao meu lado mesmo que apenas em pensamento, pelas orações e noites mal dormidas, pensando na minha solidão e saudade. Pela maternidade e paternidade não só empenhadas a mim, mas também a minha preciosa filha. Por desejarem à minha vida sempre em primeiro do que a deles, pelas concessões e incentivos de coragem e dedicação, por ser o motivo do maior orgulho e conquista de toda minha vida. Todas as palavras seriam insignificantes para declamar o tamanho da minha gratidão e amor.

À minha irmã **Mariana Carvalho Ferreira Assunção**, por ter o coração doce e amável e dividir na minha ausência o papel materno e continuar fazendo por mim, a alegria da minha filha. Por torcer e vibrar pelas minhas conquistas e sempre se fazer presente nos momentos difíceis que enfrento, com palavras de amor e carinho. Pela coragem e bravura quando me ensina tanto sobre a vida.

Ao meu irmão **Rubens Aloísio Carvalho Assunção** e a sua bela família por terem sido tão atenciosos e saudosos em todo esse período.

Aos meus sobrinhos, **Bento e Leone**, por todo o amor gratuito e imensurável que compartilharam comigo, fazendo dos meus momentos de descanso em casa de infinitas alegrias. Ao sobrinho **Fernando**, por suportar meus desabafos psicológicos e por não me deixar esquecer o quão importante eu sou na vida dele. Aos sobrinhos **Bruna, Guilherme e Mateus**, por todo o carinho fraterno e amor dedicado.

À família de Mello em nome de **José Daniel Biasoli de Mello e Dinamar Fernandes Martins de Mello** pelo filho maravilhoso que criaram e que está ao meu lado em todos os momentos, por toda a atenção e carinho. E a este **Bruno Martins de Mello** por ter se tornado parte fundamental dessa conquista, por todo o apoio, pelo amor tão sublime, verdadeiro e em todos os momentos da minha aflição cuidar de mim, me proporcionando esse aprendizado mútuo. Por toda a paciência e dedicação a nossa futura família.

A toda família em nome de **Rosival Carvalho e Carmem Lúcia Mendonça Carvalho** e seu filho **Brenno Mendonça Carvalho**, por toda torcida, carinho e amor, fundamentais na minha vida e nesta conquista.

Aos **colegas médicos veterinários** que ficaram em Goiânia, mas sempre que possível, manifestavam seu apoio profissional e pessoal durante esta caminhada.

Aos amigos que deixei em Goiânia, **Elisa Roriz, Taene Bueno, Ilana Bueno, Marcos Timponi Rocha**, que fizeram tanta falta nas horas de cansaço e desabafo mental, e nestas se fazerem presentes com pequenos gestos de saudade. E aos amigos novos e conquistados durante toda essa etapa, amigos da Pós Graduação principalmente a **Ana Lopes** amiga portuguesa que deixou tanta saudade e carinho e **Raíssa Salgueiro**, com todo o seu carinho, fazendo com que estes últimos meses, se tornassem bem mais fáceis. À **Naiana Bianchini, Carla Ulian, Cláudia Zeferino, Thaís Trentin, Camila Thomazini, Gisele Junqueira, Denise Theodoro**, enfim à todos que colaboraram de alguma maneira direta ou indiretamente para essa conquista.

Em especial ao **Maurício Orlando Wilmsen** por ter se tornado um irmão na minha vida, por todas as conversas e ideais intermináveis. Abraços, lágrimas e sorrisos divididos, sinceridade, carinho, afeto e amor. Por permitir que nossos caminhos se cruzassem e compartilhássemos da nossa história, acreditando e desacreditando, sobrevivendo e vivendo tudo que essa jornada nos oferece. Como uma luz no meu caminho, sem você nada disso seria possível.

Aos cavalos, **Anabella, Ariel, Batur, Bugre, Lalau, Issa, Manu, Miss Regra, Oklana e Raph**, a maior gratidão e amor.

À **Deus** por me dar a oportunidade de conquistar mais essa meta, por me conceder força, lucidez, saúde e sabedoria nas horas de deslize e fraqueza. Por me dar uma família e uma filha que me apoiaram tanto durante essa etapa.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Medianas das frações de proteínas séricas (mg/dL), determinadas pela técnica de SDS-PAGE de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA).....	36
TABELA 2 - Médias ($\pm$ desvio padrão) e medianas das frações proteicas de 10 equinos submetidos ao teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).....	37
TABELA 3 - Medianas das frações proteicas de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) em comparação com o teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).....	38
TABELA 4 - Medianas da atividade sérica de creatina quinase, proteínas totais séricas e fibrinogênio de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA).....	39
TABELA 5 - Medianas da atividade sérica de creatina quinase, proteínas totais séricas e fibrinogênio de 10 equinos submetidos ao teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).....	39
TABELA 6 - Médias (desvio padrão) e medianas da atividade sérica de creatina quinase, proteínas séricas e fibrinogênio de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) em comparação com o teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).....	40
TABELA 7: Determinação do coeficiente de correlação de Pearson entre as proteínas séricas e a enzima creatina quinase, de 10 equinos submetidos ao teste de longa duração e baixa aceleração.....	41
TABELA 8: Determinação do coeficiente de correlação de Pearson entre as proteínas séricas e a enzima creatina quinase, de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração.....	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Correlação e gráfico de dispersão entre IgA e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA).....	43
FIGURA 2. Correlação e gráfico de dispersão entre IGG e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA).....	43
FIGURA 3. Correlação e gráfico de dispersão entre PT Total e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA).....	44
FIGURA 4. Correlação e gráfico de dispersão entre CP e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de baixa aceleração e longa duração (TLD).	44
FIGURA 5. Correlação e gráfico de dispersão entre TF e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos protocolo de exercício de baixa aceleração e longa duração (TLD).	45
FIGURA 6. Correlação e gráfico de dispersão entre HP e creatina quinase (CK) de 10 equinos no protocolo de exercício de baixa aceleração e longa duração (TLD).	45
FIGURA 7. Porcentagem das proteínas séricas de 10 equinos nos momentos T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 submetidos ao protocolo de rápida aceleração e curta duração(TRA).....	46
FIGURA 8. Porcentagem das proteínas séricas de 10 equinos nos momentos T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 submetidos ao protocolo de baixa aceleração e longa duração(TLD).	46

ABREVIATURAS

µg/L	Miligramas por litro
° C	Graus celcius
AAT	Alfa-1 antitripsina µg/L
AGP	Alfa-1glicoproteína ácida
Cp	Ceruloplasmina
Ck	Creatina quinase
CPR	Proteína c reativa
Fb	Fibrinogênio
Hp	Haptoglobina
IL-1	Interleucina 1
IL- 6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
Kg	Kilos
kDa	Kilo daltons
LAT	Aglutinação em látex
mmol/L	milimol por litro
mg/dl	Miligramas por decilitro
m/s	Metros por segundo
PFAs	Proteínas de fase aguda
SAA	Amilóide a sérico
SDS-PAGE	Eletroforese de proteínas o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TLD	Teste de longa duração e baixa aceleração
TPEP	Teste padrão de exercício progressivo
TRA	Teste de rápida aceleração e curta duração
UI/L	Unidade internacional por litro
VO₂	Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 O Exercício /Cavalo Atleta.....	15
2.2 Proteínas.....	17
2.2.1 Proteínas de fase aguda.....	18
2.2.1.1 Proteínas de fase aguda negativas.....	21
2.2.1.2 Proteínas de fase aguda positivas.....	22
2.2.2 Avaliações laboratoriais das proteínas de fase aguda.....	26
3 OBJETIVOS.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais e seu manejo.....	29
4.2 Protocolos de exercícios.....	29
4.3 Coleta das amostras.....	31
4.4 Avaliações laboratoriais.....	31
4.4.1 Determinação de fibrinogênio.....	31
4.4.2 Determinação da atividade sérica de creatina quinase (CK)....	32
4.4.3 Proteinograma sérico	32
4.5 Delineamento Experimental.....	33
5 RESULTADOS.....	34
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO.....	52
8. REFERÊNCIAS.....	53
9 ARTIGO CIENTÍFICO.....	60
10. Normas revista científica.....	80
Anexos.....	84

ASSUNÇÃO, P. C.F. **Eletroforetograma das proteínas do soro de equinos submetidos a diferentes protocolos de exercício**. Botucatu, 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O exercício de alta intensidade em animais está associado à lesão de células musculares e à indução da resposta de fase aguda (RFA). Uma das alterações provocada por esta RFA é o estímulo da síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e por órgãos extra-hepáticos. Esta RFA é rápida e não específica. Foram utilizados dez equinos das raças Puro sangue Árabe (n=5) e Crioula (n=5), submetidos a testes de exercício de rápida aceleração e curta duração predominantemente anaeróbico (TRA) e exercícios de baixa intensidade e longa duração (TLD) predominantemente aeróbico em esteira. Amostras de sangue venoso foram colhidas antes do início do exercício (T0) e em diferentes momentos após o exercício: imediatamente após (T1), 30 minutos (T2), 03h (T3), 12h (T4), 24h (T5) e 48h (T6) após o exercício. A avaliação dos protocolos de exercício baseou-se na avaliação da atividade sérica de creatina quinase (CK) e na dosagem de fibrinogênio e proteínas de fase aguda por SDS-PAGE. Observou-se diminuição nas concentrações de haptoglobina ($p<0,05$) no TRA, entre os momentos T1 e T2 e entre T1 e T4 após a prática do mesmo. As concentrações de albumina apresentaram aumento ($p<0,05$) no T2, no protocolo TLD. Os valores de α -1 glicoproteína ácida apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) quando comparados os protocolos TRA E TLD no T2.

Palavras chave: equinos, resposta de fase aguda, proteínas séricas, creatina quinase.

ASSUNÇÃO, P. C.F. **Electrophoretogram of serum proteins in horses subjected to different exercise protocols**. Botucatu, 2013. 84p. Botucatu, 2013. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The high intensity exercise in animals is associated with muscle cell lesions and an acute phase response (APR). One of the changes promoted by this APR is the stimulus to produce acute phase proteins by the liver and extra-hepatic organs. This APR is fast and non-specific. Ten horses were used: five Arabian breed and five Creole breed. These animals were submitted to rapid acceleration and short duration exercises (TRA) and low intensity and long duration exercises on treadmill. Blood samples were obtained before (T0) and in different moments after exercise: immediately after (T1), 30 minutes (T2), 3 hours (T3), 12 hours (T4), 24 hours (T4) and 48 hours (T5) after the exercises. To evaluate the different exercise protocols, the creatine kinase serum activity and fibrinogen concentration were determined. Serum electrophoresis was also performed by means of SDS-PAGE. Observed a decrease in the concentrations of haptoglobin ($p < 0.05$) in TRA, between T1 and T2 and between T1 and T4 after practice the same. Albumin concentrations showed an increase ($p < 0.05$) in T2, the protocol TLD. The values of α 1-acid glycoprotein showed a significant increase ($p < 0.05$) when compared protocols TRA AND TLD in T2.

Key words: horses, acute phase response, serum proteins, creatine kinase.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os animais de esporte, os equinos tem a habilidade única em aumentar sua demanda de oxigênio num fator de 60 vezes durante exercício intenso, além de apresentar um metabolismo energético elevado, tornando-os um excelente modelo para investigação de processos patológicos relacionados ao exercício (ART e LEKEUX, 2005).

A atividade física é uma forma conhecida de estresse e a exposição crônica a ela, chamada de treinamento físico é capaz de disparar alterações em a resposta a alterações causada por este estresse (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Embora a prática de exercícios físicos seja amplamente recomendada, a participação em eventos esportivos cada vez mais exaustivos exige a compreensão da resposta fisiológica para a segurança do animal atleta (WATANABE, 2007; YONEZAWA, 2010).

É complexa a relação entre a prática do exercício e o sistema imune e a susceptibilidade a desenvolver doenças. Mesmo com o grande número de variáveis relacionadas nesta área, aparentemente o estresse causado pelo exercício tem dois efeitos no sistema imune, aumento ou supressão do mesmo. Embora ainda não tenha sido bem documentado, o exercício pode induzir imunossupressão que contribui para o aumento da incidência e gravidade de algumas doenças observadas em cavalos de corrida e de alto *rendimento* (HAIN et al., 1996).

O exercício de alta intensidade, portanto, pode estar associado à presença de lesão muscular e por consequência a resposta de fase aguda pelo organismo e produção das proteínas de fase aguda. A produção destas proteínas pode ser entendida como uma resposta ao estresse, que apesar das alterações nas concentrações das mesmas sejam decorrência de uma resposta transitória, essas tem importância devido à diminuição de algumas funções da resposta imune frente a exercícios de alta intensidade (ROSA et al., 2002).

Esta resposta de fase aguda está relacionada a processos inflamatórios (ou não) em estágios iniciais, não específicos. No sítio inflamatório, ocorrem alterações que promovem a liberação de citocinas, resultando em respostas sistêmicas, como febre, leucocitose e síntese e liberação de proteínas de fase aguda (ECKERSALL, 2008).

Equinos submetidos a exercícios de ultramaratona apresentaram alterações na resposta de fase aguda, como consequência ao exercício, similares a condições clínicas ou cirúrgicas (FAZIO et al., 2013). Além destes, Fallon et al (2011), afirmaram que a resposta de fase aguda provocada pelo exercício está relacionada com a lesão muscular e consequente inflamação, confirmada pelo aumento da atividade sérica de creatina quinase (CK).

Durante o processo inflamatório ocorrem alterações nas concentrações das proteínas séricas, que refletem a resposta de fase aguda. Em humanos e animais domésticos, a avaliação das concentrações de proteína C reativa (CPR), haptoglobina (Hp) e amiloide A sérico (SAA) são descritos e utilizados para avaliar a higidez, incluindo a detecção de inflamações subclínicas, avaliação da gravidade do processo e período de convalescência (CYWINSKA et al., 2010). Essas alterações podem ser encontradas relacionadas ao exercício já que o mesmo promove alterações reversíveis que podem ser determinadas e quantificadas laboratorialmente (GONDIM et al., 2013).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar as concentrações de proteínas de fase aguda (PFAs) antes e após a prática de diferentes protocolos de exercícios, bem como relacionar estas avaliações com presença de lesão muscular (estresse) causada também pelo exercício.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O EXERCÍCIO / CAVALO ATLETA

Considerando-se o bem-estar dos equinos, podem ser observados alguns fatores que estão relacionados ao comportamento nas pistas, como as relações homem–animal, animal–ambiente (temperatura ambiente, umidade relativa do ar, altitude, radiação solar, poluição sonora), além dos sistemas de manejo, estado físico e outros. Todos esses agentes podem interferir no desempenho de um cavalo atleta. Por serem muitas vezes agentes agressores, podem promover, no organismo, reações não específicas de adaptação, e conseqüentemente, alteração da secreção hormonal e das características fisiológicas, requerendo, portanto, cuidados especiais (HODGSON, 1994).

O exercício causa um estresse físico, que pode ter como resultado alterações químicas e celulares. Essas alterações dependem de um número de fatores como clima, condições corporais, nutrição e o tipo de duração do exercício. O exercício prolongado pode alterar a homeostasia do organismo, como já demonstrado em atletas humanos (FALLON et al., 2001). Em cavalos atletas o exercício induz alterações nos constituintes bioquímicos do plasma (FAZIO et al., 2010).

A resposta ao exercício poder ser dividida em dois componentes: resposta aguda e adaptação crônica, sendo que a aguda é a resposta transitória ao estresse, e a crônica uma resposta que permite o organismo a tolerar de maneira adequada o estresse. As alterações da resposta imune temporárias, causadas por uma sessão de exercício, são conhecidas como resposta aguda ao exercício (ROSA et al., 2002).

Os treinamentos com animais, para melhorar capacidade de desempenho e participação em provas de corridas ou enduros equestres, têm se tornado cada vez mais comuns, mas a busca por estes objetivos deve respeitar limites fisiológicos. A prática extenuante de exercício sem cuidados acarreta em uma síndrome de excesso de treinamento (*overtraining*). Essa síndrome é caracterizada como um distúrbio neuroendócrino provocado pela falta de compatibilidade entre a prática esportiva e os momentos de descanso, levando a problemas metabólicos (BARBANTIL, 1997; ROGERO et al., 2005). Um dos mecanismos metabólicos que pode explicar essa síndrome é que

microtraumas teciduais adaptativos ocorrem normalmente durante a execução de exercícios e a recuperação depende apenas de um programa de treinamento adequado, caracterizado por períodos de repouso suficientes. Estes microtraumas resultam em uma resposta inflamatória moderada, que tem como finalidade um processo de cicatrização com consequente adaptação muscular, óssea e articular. Essas respostas inflamatórias locais resultam em processos de recuperação do trauma. No entanto, acredita-se que essa recuperação não pode ser alcançada por atletas que estejam realizando treinamentos de alta intensidade e a inflamação aguda e local pode evoluir para um quadro de inflamação crônica e acarretar em uma possível inflamação sistêmica, sendo que parte desta envolve a ativação de monócitos circulantes, que sintetizam citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (SMITH, 2000; SMITH, 2004; ROGERO et al., 2005).

As citocinas pró-inflamatórias exercem sua ação por meio da regulação da função hepática, promovendo a manutenção da glicemia e favorecendo a síntese de proteínas de fase aguda (PFAs) relacionadas ao processo de inflamação, concomitante ao estado hipercatabólico (SMITH, 2004; ROGERO 2005).

A resposta de fase aguda foi investigada por Fallon (2001) em humanos submetidos a exercícios prolongados (ultramaratona) associando as proteínas de fase aguda à lesão muscular, que foi comprovada pelo aumento da atividade sérica da creatina quinase. Neste estudo, ocorreu uma reação de fase aguda análoga a que ocorre em processos inflamatórios, devido ao aumento significativo na concentração sérica de CPR durante os dias do treinamento e pós-treinamento e da concentração sérica de haptoglobina. Não houve diferença significativa nas concentrações de albumina e alfa-1 antitripsina (AAT). Porém, poucos estudos foram realizados para avaliar a concentração das proteínas de fase aguda (PFAs) durante o treinamento físico em animais, até mesmo em humanos.

Fazio et al. (2010) avaliaram alterações nas concentrações das PFAs em equinos durante um programa de treinamento semanal prolongado. Houve diferença significativa nas concentrações de fibrinogênio após 60 dias e um aumento gradual da concentração de haptoglobina durante todo o treinamento.

De acordo com Snow (1983) e Hain et al. (1996), o aumento da liberação da adrenalina provocada pela prática do exercício pode resultar em uma contração esplênica que irá promover não só a liberação de eritrócitos na circulação periférica, mas também de leucócitos. A variação na contagem total de leucócitos é a resposta mais comum à inflamação (WEISER, 2004). O exercício normalmente induz uma resposta similar à resposta imune, que tem como resultado um aumento do número total de leucócitos. Assim, o exercício induz a leucocitose e geralmente é comparado como uma resposta a uma inflamação e induz a resposta de fase aguda pelo organismo (FAZIO et al., 2010). A leucocitose decorrente de exercícios de alta intensidade é promovida pela secreção de epinefrina e cortisol (TIZARD, 2009; HINCHCLIFF, et al., 2004).

Segundo Rosa et al. (2002), a resposta dos neutrófilos polimorfonucleares a uma sessão única de exercício depende da sua intensidade. A neutrofilia observada logo após o exercício pode ser decorrente de alterações hemodinâmicas associadas à ação de catecolaminas. Várias horas após o exercício pode ocorrer um pico de neutrofilia decorrente da mobilização de células do *pool* marginal para o *pool* circulante em resposta a elevação das concentrações plasmáticas de cortisol. Estes mesmos autores relatam que tanto a resposta funcional ao exercício quanto o trabalho moderado, associam-se ao aumento da função do neutrófilo, aumento das funções quimiotáticas e fagocíticas, bem como da atividade antimicrobiana e que o estresse causado pelo exercício parece ter efeito estimulante na maioria das células da série monócito e macrófago, provocando monocitose transitória, decorrente da ação das catecolaminas. Com relação à função, são descritas alterações como: quimiotaxia, fagocitose e atividade citotóxica, possivelmente associada às secreções aumentadas de cortisol, prolactina e tiroxina.

2. 2 PROTEÍNAS

As proteínas são cadeias polipeptídicas de aminoácidos. A estrutura primária de uma proteína é a sequência de aminoácidos que constitui uma composição única da mesma. Com 20 aminoácidos diferentes que ocorrem em proteínas e com a possibilidade de mais de uma centena de aminoácidos que

constituem a estrutura primária de cada uma das proteínas, há um número quase infinito de potenciais proteínas que podem estar presentes em células e tecidos (ECKERSALL, 2008; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Proteínas são compostos indispensáveis à vida e compõem a base das estruturas de células, órgãos e tecidos. Agem como catalisadores em reações bioquímicas, tampão ácido-base, nutrientes, manutenção da pressão osmótica e como hormônios na regulação endócrina. Portanto, a avaliação das concentrações séricas de proteínas totais e suas frações são importantes no auxílio do diagnóstico clínico (ECKERSALL, 2008).

2.2.1 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFAs)

Qualquer processo inflamatório que acompanha lesão tecidual induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas, além do óxido nítrico e glicocorticoides, ativam e modulam a resposta de fase aguda e a liberação de proteínas de fase aguda, principalmente pelo fígado (GRUYS et al., 2005).

As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela indução de febre e catabolismo muscular. Promovendo a ativação de precursores de leucócitos na medula óssea. São responsáveis pelo amplo efeito de sinergismo e antagonismo que influenciam a resposta imune específica contra antígenos e invasão de microrganismos (GRUYS et al., 2005; TIZARD, 2009).

A resposta de fase aguda é uma reação promovida pela produção e liberação de citocinas, incluindo interleucinas IL-1, IL-6 e TNF- α . Essas reações promovem alterações essenciais para a defesa e adaptação do organismo, como alterações hormonais e produção de proteínas de fase aguda (CYWINSKA et al., 2010; ECKERSALL, 2008; PETERSEN et al., 2004). A IL-6 é o principal mediador para a secreção dessas proteínas pelos hepatócitos. Posteriormente, o TNF- α promove um catabolismo muscular que também é mediado por glicocorticoides, além da hiperglicemia causada pela liberação de glucagon e captação de aminoácidos pelo fígado. A IL-1 estimula o aumento do fluxo sanguíneo de aminoácidos e ativação do sistema pituitária-adrenal (ECKERSALL, 2008; GRUYS et al., 2005).

As respostas das PFAs não são específicas e ocorrem alterações nas suas concentrações na presença de infecções, inflamações, trauma cirúrgico

ou estresse (PETERSEN et al., 2004; GRUYS et al., 2005; CRISMAN et al., 2008; ECKERSALL e BELL, 2010; KJELGAARD-HANSEN e JACOBSEN, 2013). Essas proteínas são consideradas como parte da resposta imune inata não específica, envolvendo a recuperação da homeostase e restrição do crescimento microbiano antes dos animais desenvolverem imunidade adquirida a um determinado desafio (MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2008).

Após o estímulo pró-inflamatório, a IL-6 promove a diminuição de IL-1 e TNF- α promovendo uma cascata de reações. A diminuição da resposta de fase aguda ocorre pela rápida remoção de citocinas no fígado, realizada pela IL-10, promovendo a supressão local de produção de IL-6, e por efeitos que inibem a produção de PFAs. Parte da resposta de fase aguda é suprimida pelas IL-1 e IL-4 e algumas PFAS que modulam a produção destas citocinas (GRUYS, 2005).

A concentração de PFAs circulantes varia de acordo com a gravidade do processo e extensão de lesão tecidual. A determinação dessa concentração é útil para o auxílio no diagnóstico e prognóstico de distúrbios inflamatórios, além de possibilitar o monitoramento de uma determinada terapia e para avaliar o estado de saúde (BELL et al., 2008; ECKERSALL, 2008).

As PFAs podem ser classificadas em positivas ou negativas. Nas positivas enquadram-se, dentre outras, a alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), a haptoglobina (Hp), proteína C reativa (CPR), amiloide A sérico (SAA). No segundo grupo, destacam-se a albumina e a transferrina e suas concentrações séricas tendem a diminuir na presença de condições inflamatórias (KANEKO, 2008; CRISMAN et al., 2008).

Segundo Eckersall e Bell (2010), em todas as espécies animais as PFAs são classificadas de acordo com a resposta que apresentam, como: maior, moderada e menor resposta. Sendo que as “major”, ou seja, de resposta maior, estão presentes em baixa concentração no soro ($< 1\mu\text{g/L}$) de animais saudáveis e podem ter suas concentrações elevadas em 100-1000 vezes quando existe um estímulo inflamatório, tendo seu pico em 24-48 horas e um declínio rápido na fase de recuperação. As proteínas consideradas de resposta moderada elevam as suas concentrações em cinco-10 vezes quando ativadas, apresentando um pico depois de dois a três dias e com declínio mais lento que

da maior. As menores ou “minor” têm o um aumento gradual das suas concentrações basais em 50 a 100%.

Os componentes da resposta de fase aguda aumentam em conjunto, embora nem todos estes tenham suas concentrações elevadas de maneira uniforme, mesmo que nas mesmas condições (CRISMAN et al., 2008; PRINCE, 2002).

Para a espécie equina, consideram-se como as mais importantes PFAs a ceruloplasmina, a haptoglobina e amiloide A sérico (ECKERSALL, 2008). Nos equinos a única proteína de fase aguda considerada como “major” é o amiloide A sérico (SAA) (ECKERSALL, 2008). As proteínas consideradas de resposta moderada estão sempre presentes em pequenas quantidades no plasma de cavalos sadios e o aumento das suas concentrações é geralmente lento, de dias a semanas. Exemplos de proteínas de fase aguda moderada incluem: haptoglobina (Hp), fibrinogênio (Fb), α_1 -glicoproteína ácida (AGP) e ceruloplasmina (Cp) (CRISMAN et al., 2008).

As PFAs podem ser usadas como alternativa no monitoramento da saúde animal. Estas são consideradas uma ferramenta útil devido a sua resposta sistêmica ao estímulo inicial. No entanto, não são utilizadas para estabelecer um diagnóstico específico e também não podem prever a extensão do curso de uma lesão individual no animal. Para avaliação de rebanho, as PFAs podem ser úteis para determinar se existe a propagação e prevalência clínica e subclínica de algum processo inflamatório indicado pelo aumento da concentração de determinada proteína (PETERSEN et al., 2004).

Segundo Jacobsen et al. (2005), o a SAA pode ser um marcador inflamatório mais eficiente em doenças ativas em equinos do que o tradicional marcador fibrinogênio e contagem total de leucócitos, pois trata-se de uma proteína “major”, ou seja, de resposta maior. Porém, para esta avaliação faz-se necessária a obtenção de amostras sequenciadas, identificando e avaliando o aumento ou diminuição dessa proteína durante o processo inflamatório, nos momentos adequados.

2.2.1.1 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NEGATIVAS

São aquelas que têm sua concentração diminuída durante a resposta de fase aguda que ocorre durante o processo inflamatório. Esta resposta pode ser rápida e significativa, depois de 24 horas, ou pode ser mais gradual depois de dias (ECKERSALL, 2008).

ALBUMINA

É a proteína mais abundante no plasma, sendo que esta corresponde a de 35 a 50% da concentração total de proteína e tem um peso molecular de 66,4 kDa. É uma proteína sintetizada no citoplasma dos hepatócitos. A taxa da síntese de albumina é controlada pela pressão coloidosmótica, embora possa ser influenciada por hormônios como insulina, tirosina e cortisol. Apenas parte desta proteína está presente no sangue, o restante se encontra no espaço intersticial. O catabolismo da albumina ocorre em diferentes tecidos como, músculo, fígado, rim (ECKERSALL, 2008; PRINSEN e VELDEN, 2004).

A albumina, portanto, auxilia na manutenção da pressão coloidosmótica e do volume sanguíneo. Outra função é o transporte de diversos metabólitos que circulam no sangue. Substâncias como ácidos graxos, cálcio, colesterol, bilirrubina, circulam ligados à albumina. Além destes, diversos agentes farmacológicos também podem ser ligados a esta proteína. (ECKERSALL, 2008).

TRANSFERRINA

É uma proteína responsável pelo transporte de ferro no sangue e também é considerada como uma proteína de fase aguda negativa nos mamíferos, mas a sua maior aplicabilidade diagnóstica está relacionada em mamíferos com doenças ligadas ao metabolismo do ferro (ECKERSALL, 2008).

A transferrina está relacionada à imunidade inata por se ligar aos íons ferro prevenindo a proliferação de patógenos e parasitas que utilizam este nutriente. Concentrações diminuídas de transferrina pode ser consequência da produção inadequada desta proteína por danos nos hepatócitos, doença renal, leucemias, inflamação aguda e crônica (MURATA et al., 2004).

2.2.1.2. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA POSITIVAS

FIBRINOGENIO (Fb)

Fibrinogênio é uma proteína de fase aguda, produzida pelos hepatócitos com peso molecular de 340 kDa (ECKERSALL, 2008; STOCKHAM e SCOTT, 2011). O fibrinogênio é produzido somente pelo fígado é um precursor de fibrina, está presente livre no plasma e nos grânulos plaquetários (KANEKO et al., 2008).

Segundo Stockham e Scott (2011), como o fibrinogênio é uma PFA positiva, espera-se que a concentração plasmática desta proteína aumente durante um processo inflamatório. Entretanto, quando ocorre inflamação simultaneamente com um processo de coagulação e fibrinólise o aumento no consumo desta proteína pode mascarar a elevação na produção de fibrinogênio.

Segundo Eckersall (2008) e Hulten et al. (2002) o fibrinogênio é considerado uma PFA de resposta moderada de acordo com estudos relacionados em artrites em equinos, mas as concentrações de haptoglobina e do amiloide A sérico apresentaram aumentos nas suas concentrações séricas anteriores a elevação do fibrinogênio.

Crisman et al. (2008) sugeriram que a alteração na concentração de fibrinogênio não é necessariamente o melhor método para detecção e avaliação de uma inflamação, devido a sua resposta de fase aguda moderada, comparada com outras proteínas de fase aguda, dificultando assim a sua utilidade clínica, apesar da técnica (precipitação térmica) para sua determinação ser de fácil aplicação e utilizada há bastante tempo (ECKERSALL, 2008).

HAPTOGLOBINA (Hp)

A haptoglobina é uma glicoproteína composta de subunidades α e β com a alfa apresentando um peso molecular de 16 a 23 kDa e a unidade beta de 35 a 40 kDa. Estas subunidades são combinadas e formam a cadeia β - α - α - β . A função primária da haptoglobina é se ligar a hemoglobina livre no sangue, para prevenir lesões teciduais oxidativas. Essa cadeia haptoglobina hemoglobina (Hp-Hb), reduz a disponibilidade para utilização bacteriana, do resíduo heme e

seu íon ferro. Sendo assim, a Hp tem uma atividade antibacteriana indireta (ECKERSALL, 2008).

A cadeia Hp-Hb também é reconhecida pela via CD163, um receptor de membrana específico em macrófagos, e está relacionada à fagocitose, entre outras atividades imunomodulatórias, como quimiotaxia de granulócitos, inibição da proliferação de mastócitos e inibição da proliferação de células T (MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2008). Está relacionada à cicatrização de feridas, pela estimulação da angiogênese. O aumento das concentrações séricas de haptoglobina podem ser um indicador sensível de hemólise intra ou extravascular e de infecção ou inflamação em equinos (CRISMAN et al., 2008). As suas concentrações séricas podem ser influenciadas por outros fatores não relacionados à resposta de fase aguda, como doenças renais e icterícia obstrutiva, que podem causar hiperhaptoglobulinemia (PETERSEN, et al., 2004).

O perfil da resposta de fase aguda da haptoglobina difere entre as espécies. Em ruminantes, a Hp é considerada uma proteína “major” devido a sua rápida resposta de fase aguda em processos inflamatórios. Além disso, em bovinos esta proteína é um marcador efetivo da presença, gravidade e recuperação, em casos de mastite, enterite, pneumonia, endocardite e endometrite (ECKERSALL, 2008; MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004). Em equinos, observou-se aumento na concentração desta proteína nos casos de resposta inflamatória sistêmica, laminites e após castração com complicações pós-operatórias. Porém, não foram encontradas alterações desta proteína em cavalos com cólica (ECKERSALL, 2008; FAGLIARI et al., 2008).

AMILOIDE A SÉRICO (SAA)

O peso molecular desta proteína em sua forma natural é de aproximadamente 180 kDa, pois geralmente forma um complexo com lipoproteínas. Após a desnaturação, o peso estimado de suas subunidades é de 9 a 14 kDa (PETERSEN et al., 2004).

Em humanos, quatro isoformas foram identificadas e separadas geneticamente. São elas: SAA 1, SAA 2, SAA 3 e SAA 4. As isoformas SAA 1 e 2 são produzidas no fígado e têm suas concentrações elevadas em resposta a uma reação de fase aguda. Em contrapartida, a isoforma SAA4 é produzida normalmente em baixas concentrações no fígado e não é influenciada pela

resposta de fase aguda. A isoforma SAA3 tem suas concentrações aumentadas na resposta de fase aguda, é produzida pelo tecido adiposo e pulmão, ovário e glândula mamária. Além disso, também pode ser encontrada no colostro dos bovinos. O SAA sérico é precursor do amiloide A, portanto, está relacionado também com a patogenia da amiloidose (HULTEN et al., 1997; ECKERSALL, 2008). Três isoformas do SAA (SAA1, SAA2, SAA3) foram descritas em equinos. A secreção de SAA3 foi demonstrada na glândula mamária (colostro) e articulação (líquido sinovial) de equinos (CRISMAN et al., 2008).

As funções do SAA incluem a ativação ou a inibição das funções dos leucócitos, a migração de células inflamatórias para o local da infecção, a inibição da proliferação das células endoteliais e linfócitos, a inibição da agregação de plaquetas e a fagocitose. O SAA pode também estar ligado à liberação de mieloperoxidase e migração direta de fagócitos, além de modular e remodelar a degradação de tecido conjuntivo (GRUYS et al., 2005; CRISMAN et al., 2008).

Em equinos, alterações das concentrações do SAA estão relacionadas à diversas doenças como inflamações e infecções, em pós-operatórios, artrite, sepse, enterite, pneumonia, diarreia e trauma cirúrgico. A avaliação das concentrações de SAA deve ser realizada em equinos com cólica, principalmente quando esta é estimulada por um processo inflamatório (ECKERSALL, 2008). Infecção experimental com herpes vírus equino e com o vírus da influenza equina demonstraram aumento na concentração de SAA (HULTEN et al., 1999; ECKERSALL, 2008).

De maneira geral, a sensibilidade e o perfil cinético do SAA, quando comparado com outras PFAs moderadas como o fibrinogênio, fazem desta proteína o marcador ideal de inflamação e lesão tecidual em equinos (CRISMAN et al., 2008).

CERULOPLASMINA (Cp)

A ceruloplasmina é uma proteína com peso molecular de 151 kDa. Está relacionada com o transporte de cobre e oxidação do ferro. No entanto, o mecanismo de incorporação do cobre pela ceruloplasmina ainda não está bem definido. O aumento nas suas concentrações revela uma resposta de fase

aguda durante a inflamação, infecção e trauma como resultado do aumento da expressão gênica desta proteína em tecido hepático e extra-hepático, como baço, pulmão, testículo e cérebro (ECKERSALL, 2008; HELLMAN e GITLIN, 2002).

Segundo Jacobsen (2007), a ceruloplasmina apresenta concentrações diminuídas ao nascimento, desnutrição, nefrose e distúrbios hepáticos associados à intoxicação por cobre. A deficiência por cobre tem como resultado uma diminuição na circulação de ceruloplasmina e um acúmulo de ferro no fígado e outros tecidos.

Segundo um estudo realizado por Gondim et al. (2013), o aumento da ceruloplasmina em intervalos de seis e doze horas após o exercício também pode ser indicativo de processo inflamatório ou também proteção tecidual contra subprodutos do metabolismo oxidativo, pois durante o exercício físico intenso, há liberação de espécies reativas de oxigênio (RÁDAK, 2000) e estímulo ao processo inflamatório por meio da liberação de citocinas (FOX et al., 1995). Desta forma, é possível que o aumento de ceruloplasmina em resposta às interleucinas no exercício físico esteja também associado ao seu papel como antioxidante (MEYER et al., 2001).

ALFA-1 ANTITRIPSINA (AAT)

A alfa-1 antitripsina (AAT) é uma glicoproteína da família das inibidoras de proteases séricas sintetizadas, principalmente, pelo fígado e, em menor quantidade, pelos monócitos, macrófagos broncoalveolares e glândula mamária. A sua principal função é inibir a protease elastase dos neutrófilos, que, ao ser liberada nos locais de inflamação, promove destruição tecidual. A AAT é a proteína responsável pela maior parte da proteção antiproteásica do sistema respiratório e sua síntese é estimulada durante a resposta inflamatória aguda (ECKERSALL, 2008; DiFILLIPO et al., 2011).

Humanos podem apresentar uma deficiência desta proteína, sendo um distúrbio hereditário e muitas vezes letal. Nestes casos, os indivíduos desenvolvem doenças respiratórias graves (enfisema pulmonar), hepatite e cirrose. No entanto, não há relatos disponíveis na literatura sobre esta condição em animais (CRYSTAL, 1990).

Gondim et al. (2013), encontraram aumento significativo nas concentrações de AAT, albumina, ceruloplasmina e haptoglobina em equinos de polo. As elevações nas concentrações dessas proteínas foram observadas cinco minutos após o exercício (partidas de polo), mas não foram observadas alterações significativas nas concentrações dessas proteínas após seis e doze horas de exercício. Pôneis submetidos à laminite experimental apresentaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de AAT (FAGLIARI et al., 1998).

ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (AGP)

É uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 43kDa, composta por ligações covalentes de carboidratos. Embora o papel preciso desta proteína ainda não seja muito esclarecido, está ligada a vários metabólitos endógenos como a heparina, histamina, serotonina, esteroides e catecolaminas (ECKERSALL, 2008). AGP é secretada principalmente pelos hepatócitos e contribui para a homeostase reduzindo a lesão tecidual associada com o processo inflamatório em células extra-hepáticas, endoteliais e epiteliais. Esta proteína é um agente anti-inflamatório natural, pois inibe a ativação de neutrófilos e aumenta a secreção de IL-1 e atua na depuração de lipopolissacarídeos neutralizando sua toxicidade. É responsável pela inibição da indução da mitose e proliferação de linfócitos (MURATA et al., 2004).

Na maioria das espécies, a AGP é considerada uma proteína de fase aguda de resposta moderada, que tem suas concentrações elevadas mais lentamente (ECKERSALL, 2008). As concentrações plasmáticas de AGP apresentaram elevações significativas em potros com laminite (FAGLIARI et al., 1998).

2.2.2 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

Os métodos laboratoriais de determinação das proteínas têm por finalidade identificar e avaliar quantitativamente as mesmas. A eletroforese é um método inespecífico no qual as proteínas se movem por meio de um campo elétrico formando picos que permitem a identificação e quantificação relativa

das mesmas e sua principal utilização é identificar os picos de variações proteicas (ECKERSALL, 2008).

Atualmente, utiliza-se para eletroforese de proteínas o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Durante a polimerização da acrilamida para formar o gel de uso, a proporção de ligações cruzadas entre as cadeias de polímeros pode ser controlada, e o gel forma uma “peneira” molecular, que controla a migração das proteínas de acordo com o seu tamanho. Uma vez no gel, a separação é baseada pela massa e pela carga. Neste método faz-se um pré-tratamento das proteínas com o aquecimento em solução detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e o agente de redução é o β mercaptoetanol. Este sistema, SDS-PAGE, foi introduzido por Laemmli (1970) e a separação das proteínas por esta técnica aumenta a complexidade de interpretação do eletroforetograma (ECKERSALL, 2008).

Estudos estão sendo desenvolvidos para aplicação de outras técnicas para avaliação de proteínas de fase aguda de resposta maior em cães, felinos e equinos, melhorando assim aspectos práticos e para fins de diagnóstico de rotina (KJELGAARD e JACOBSEN, 2013).

Christensen et al. (2012) realizaram investigações para avaliar a aplicação de um teste de imunoensaio automatizado de turbidimetria por aglutinação em látex (LAT) baseado em anticorpos monoclonais de amiloide A sérico de humanos, para avaliação desta proteína (SAA) em cães, gatos e equinos. Foi também realizada uma comparação entre os métodos utilizados para determinação de SAA em equinos e felinos e uma avaliação da *performance* de SAA em cães. O teste LAT apresentou uma *performance* analítica aceitável por se tratar de um método rápido e de fácil aplicação, tornando sua utilização facilitada na rotina laboratorial. Técnicas para determinar a concentração de Hp em equinos incluem imunodifusão radial, eletroforese e imunoturbidimetria (CRISMAN et al., 2008).

3. OBJETIVOS

Testar a hipótese de que a prática de exercícios em esteira de alta velocidade, tanto de rápida aceleração e curta duração, como de baixa intensidade e longa duração, promovem alterações nas concentrações das proteínas séricas, causado pela resposta estimulada pela prática de exercício (estresse) em equinos das raças Árabe e Crioula em diferentes momentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e seu manejo

Os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com o Protocolo nº 62/2012-CEUA da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Unesp, câmpus Botucatu (ANEXO).

Foram utilizados 10 equinos, cinco da raça Puro Sangue Árabe e cinco da raça Crioula, adultos, machos e fêmeas, clinicamente sadios. Os animais foram mantidos em piquetes do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Botucatu, sob as mesmas condições de manejo alimentar e sanitário. Os animais sem treinamento físico por mais de um ano, com idade variando entre oito a dez anos, sendo quatro machos e seis fêmeas e peso médio de $372,1 \pm 32,9$ Kg, foram considerados hígidos mediante exames hematológicos e bioquímicos séricos. O manejo nutricional constituiu de alimentação à base de feno de capim “coast-cross” (*Cynodon dactylon*), ração comercial para equinos (Ração Proequi 13® - Guabi, Mogiana Alimentos S/A, Campinas, Brasil), suplemento mineral (Sal mineral Guabiphos Centauro 80® - Guabi, Mogiana Alimentos S/S, Campinas, Brasil.), conforme recomendações de Lewis (2000) e água *ad libitum*.

4.2 Protocolos de exercício

Os equinos foram submetidos a três protocolos de exercício, sendo que o primeiro foi à realização do teste padrão de exercício progressivo (TPEP), após sete dias a realização do teste de exercício de rápida aceleração e curta duração, (TRA) e realização do teste de exercício de baixa intensidade e longa duração (TLD).

O teste TPEP, foi realizado com a esteira (Mustang 2200 AG - Kagra, Suíça) inclinada a +6%, com a velocidade elevada gradualmente, com o protocolo de exercício que consistiu da velocidade inicial de 1,8 m/s (passo) por cinco minutos, de 4,0 m/s (trote) por três minutos, de 6,0 m/s (cânter) por dois

minutos e em seguida um minuto no galope de 8,0 m/s, 9,0 m/s, 10,0 m/s e 11,0 m/s ou até quando o animal não conseguiu manter-se em exercício, mesmo sendo estimulado (WATANABE, 2006). Foi utilizada uma máscara de análise de trocas gasosas e dados ventilatórios (Metavet – CORTEX Biophysik GmbH, Alemanha), provendo informações pela técnica “respiração por respiração”, e os dados foram registrados por meio de programa de computador específico (Metasoft Vet 1.1. – Metabolic Stress Test Software, Alemanha), segundo Watanabe (2007).

Esse teste foi realizado para se extrair a carga de trabalho para cada equino. Para isto, o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) de cada animal foi definido como o valor do consumo de oxigênio (VO_2), no qual se observou a manutenção dos valores mesmo com o aumento da velocidade de exercício durante o teste de exercício progressivo. Foi então elaborada a equação de regressão do VO_2 *versus* a velocidade de exercício para cada equino, utilizando os valores em que foi observada uma relação linear entre a velocidade e o VO_2 . Destas equações individuais, foram calculadas as velocidades individuais correspondentes às porcentagens do VO_{2max} conforme técnica descrita por Rose et al. (1990) para os outros testes.

Após sete dias do TPEP, os equinos foram submetidos ao TRA. O TRA é um teste considerado de exercício predominantemente anaeróbico, (concentração de lactato maior que 4mmol/L). Consistiu da inclinação da esteira a +6%, um período de aquecimento de cinco minutos para a carga de trabalho de 50% do VO_{2max} , (velocidade média de $3,7 \pm 0,9$ m/s) seguido por mais cinco minutos 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_{2max} , (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 cinco minutos à velocidade de 3,0 m/s com a esteira na posição horizontal adaptado de PRINCE et al. (2002)

Após sete dias do TRA, os equinos foram submetidos ao TLD. O TLD é teste, considerado de exercício predominantemente aeróbico (concentração de lactato inferior a 4mmol/L). Este foi realizado com a esteira inclinada a +6%, à

velocidade de 35% do VO_{2max} de cada animal pelo período de 60 minutos, correspondendo a uma velocidade média de $2,3 \pm 0,5m/s$, adaptado de PRINCE et al. (2002).

4.3 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras sanguíneas em momentos distintos: antes do exercício (T0), imediatamente após o exercício (teste) (T1), trinta minutos após o termino do exercício (teste) (T2), três horas após o termino do exercício (teste) (T3), doze horas após o termino do exercício (teste) (T4), vinte e quatro horas após o termino do exercício (teste) (T5), quarenta e oito horas após o termino do exercício (T6) no TRA e no TLD.

No dia dos testes, cada equino foi preparado para o exercício que constituiu da cateterização da veia jugular com utilização de cateter 14G (Angiocath® 14G – BD Brasil, São Paulo, Brasil) conectado a um extensor, para proceder a colheita de sangue mediante o auxílio de uma agulha de calibre 25 x 8 acoplada a tubos com sistema a vácuo (Vacuum II® – Labnew Ind. e Com. Ltda., Campinas, SP, Brasil), contendo ácido etileno diamino tetracético (EDTA) potássico para a determinação do fibrinogênio plasmático.

O sangue venoso para obtenção do soro foi colhido em tubos com sistema a vácuo (Vacuum II® – Labnew Ind. e Com. Ltda., Campinas, SP, Brasil), contendo gel coagulante. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1.000 g em uma macrocentrífuga e o soro foi separado em alíquotas e armazenado em *freezer* à temperatura de $-80^{\circ}C$ para as análises laboratoriais da proteína total e suas frações por eletroforese.

4.4 Avaliações laboratoriais

4.4.1 Determinação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio

O fibrinogênio plasmático foi determinado pelo método indireto de precipitação pelo calor ($56^{\circ}C$) e a leitura realizada por refratometria, conforme Jain (1986).

4.4.2 Determinações da atividade sérica de creatina quinase (CK)

A atividade sérica de creatina quinase foi determinada pelo método cinético, utilizando kit bioquímico comercial (Katal ®, São Paulo, SP, Brasil) por leitura em espectrofotômetro automático (Cobas Mira – Roche ®) em até vinte e quatro horas após a coleta.

4.4.3 Proteinograma sérico

A concentração das proteínas totais foi determinada pelo método do biureto (GORNALL et al., 1949) utilizando-se kit bioquímico comercial (Katal ®, São Paulo, SP, Brasil) e leitura em espectrofotômetro automático (Cobas Mira-Roche ®). O fracionamento das proteínas foi realizado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com técnica descrita por LAEMMLI (1970), em um sistema de eletroforese unidimensional em géis de acrilamida com 4% e 10% de gradiente. As amostras de 10µl soro foram diluídas em 30 µl de tampão fosfato (PBS) e 20 µl de gel mix (10% de água, 2 % SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10Mm de ácido etilenodiaminotetracético, 20Mm fostato-tris de Ph 7,4, 5% glicerol e 0,001% azul de bromofenol com corante). A corrente elétrica foi programada em 35 e 50A, enquanto as amostras estavam no gel de separação e de empilhamento, respectivamente. Após o fracionamento, o gel foi corado em solução de azul de coomassie brilhante 0,2% por 2 horas. Posteriormente, o gel foi descorado em uma solução metanol, ácido acético e água até o aparecimento das frações proteicas. As concentrações dessas frações foram determinadas de acordo com método descrito por a FAGLIARI et al. (1998) utilizando-se videodensitômetro (9301PC Shimadzu®, Tokyo, Japan). As proteínas foram identificadas utilizando-se marcadores, (Sigma Chemical Co.® St Louis, MO, USA) com pesos moleculares de 200.000; 116.000; 66.000; 55.000; 45.000; 36.000; 29.000; 24.000 e 20.000 daltons. Adicionalmente, também foram utilizadas proteínas purificadas (Sigma Chemical Co®, St Louis, MO, USA) albumina, haptoglobina, ceruloplasmina e transferrina.

4.5 Delineamento experimental

Na análise dos dados foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para avaliar os resultados entre os sete momentos no mesmo grupo de animais utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas, e quando pressupostos necessários à análise de variância paramétrica não foi alcançada, utilizou-se o teste não paramétrico de Friedman.

Para comparar os resultados entre os dois grupos de animais foram utilizados o teste t de Student, em que são utilizados a média e o desvio padrão, e como o teste substituto de t de Student utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW), pois os pressupostos para aplicabilidade do teste t Student são mais exigentes, ou seja, as populações de onde as amostras provêm têm distribuição normal. Entretanto, para o teste de WMW as duas amostras são aleatórias e as observações, independentes.

Para as análises de correlação e gráfico de dispersão foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson (SigmaPlot®).

Todas as análises foram consideradas significativas com 5% de significância ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Foi observada diminuição ($p < 0,05$) nas concentrações séricas de haptoglobina no exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA) entre os momentos imediatamente após o exercício (T1) e 30 minutos após o exercício (T2) entre (T1) e (T4) após o exercício, como observado na Tabela 1.

Notou-se aumento ($p < 0,05$) entre as concentrações séricas de albumina ($p < 0,05$) no exercício de longa duração e baixa aceleração (TLD) entre os momentos 30 minutos e 3 horas após a prática do mesmo e diminuição entre 30 minutos e 48 horas, como observado na Tabela 2.

Foi observado aumento para as concentrações séricas de α_1 glicoproteína ácida ($p < 0,05$), no T2 após o exercício quando comparados os protocolos TRA e TLD, como observado na Tabela 3.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para atividade sérica de CK e para as concentrações plasmáticas do fibrinogênio, quando comparados os momentos em cada protocolo (TRA e TLD) como observado na Tabela 4 e 5, e nem quando comparados ambos os protocolos de exercício, como observado na Tabela 6.

Observou-se uma correlação positiva fraca e significativa ($p < 0,05$) quando correlacionadas a atividade sérica de CK e a proteína total sérica, IgG e IgA no protocolo TRA, como observado na tabela 8 e demonstrado nas figuras 1,2 e 3.

Observou-se uma correlação positiva fraca e negativa moderada com diferença significativa ($p < 0,05$) quando correlacionadas a CK e a concentração sérica das proteínas Hp, Tf, no protocolo TLD e uma quando correlacionadas a atividade sérica de CK e a concentração sérica de Cp, respectivamente como observado na tabela 7 e demonstrado nas figuras 4,5 e 6.

A Cp, AAT e AGP apresentaram variação ampla em suas concentrações séricas no protocolo TRA de modo que, geralmente, se faz uso apenas das médias e desvio padrão para explicar sua importância e significado biológico, apesar das diferenças não serem apontadas na análise estatística. Neste estudo, estatisticamente, não houve diferença significativa nas concentrações séricas de Cp, na Tabela 1 nota-se aumento de 8,60 mg/dL do repouso (T0)

para 10,95 mg/dL (T1) , 14,53 mg/dL (T5) e 12,23 mg/dL (T6) o que corresponde a uma porcentagem de aumento de 27%, 68% e 42%, respectivamente. Para AAT nota-se o aumento da concentração de 448,54 mg/dL (T0) para 508,61 mg/dL e (T5) 510,42 mg/dL (T6), correspondendo a uma porcentagem de aumento 13% para os dois momentos, também observado na Figura 7. Para a AGP nota-se um aumento de 3,63 mg/dL (T0) para 4,14 mg/dL (T5), correspondendo a uma porcentagem aumento de 14%. As alterações e as variações de aumento por porcentagem destas proteínas podem ser observadas na Figura 7.

A Cp, Tf, Hp, AGP, 23kDa apresentaram variação ampla em suas concentrações séricas no protocolo TLD. Neste estudo, estatisticamente, não houve diferença significativa nas concentrações séricas de Cp, porém por meio da Tabela 2 nota-se aumento de 13,56 mg/dL do repouso (T0) para 14,6 mg/dL (T1) o que corresponde a uma porcentagem de aumento de 8%. Para Tf nota-se o aumento da concentração de 436,39 mg/dL (T0) para 478,79 mg/dL (T3), correspondendo a uma porcentagem de aumento 9%, e uma diminuição da concentração de 436,39 mg/dL (T0) para 381,05 mg/dL (T6) correspondendo a uma porcentagem de diminuição de 13%. Para Hp nota-se um aumento na concentração sérica de 21,19 mg/dL (T0) para 22,91 mg/dL (T1), 23,76 mg/dL (T5) e 24,77 mg/dL (T6) correspondendo a um aumento de 8%, 12% e 16%, respectivamente. Para AGP nota-se um aumento na concentração de 4,59 mg/dL (T0) para 5,45 mg/dL (T2), 5,07 mg/dL (T4) correspondendo a uma porcentagem aumento de 18% e 10%, respectivamente. Para a proteína denominada 23kDa observou-se aumento de 232,01 mg/dL (T0) para 263,51mg/dL (T3), correspondendo a uma porcentagem de aumento de 13%. As alterações e as variações de aumento por porcentagem destas proteínas podem ser observadas na Figura 8.

As concentrações séricas de proteína total também não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) nos diferentes protocolos de exercício e nos momentos avaliados, como observado nas Tabelas 4, 5 e 6.

As frações proteicas IgA, IgG, Cp, Tf, AAT e de uma proteína não identificada nominalmente de 23 kDa, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os momentos e entre os protocolos de exercício avaliados, como observado nas Tabelas 1, 2 e 3.

TABELA 1 - Medianas das frações de proteínas séricas determinadas pela técnica de SDS-PAGE de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA).

Momentos	Frações Proteicas								
	IgA (mg/dL)	IgG (mg/dL)	Cp (mg/dL)	Tf (mg/dL)	Alb (g/dL)	AAT (mg/dL)	Hp (mg/dL)	AGP (mg/dL)	23KDa * (mg/dL)
T0	199,51	1550,68	8,60	422,29	4,81	448,54	19,88 ^{ab}	3,63	236,64
T1	168,44	1488,84	10,95	468,55	4,69	331,49	19,65 ^a	3,43	234,22
T2	174,05	1684,46	9,29	424,99	4,47	280,16	16,85 ^b	3,43	234,44
T3	193,25	1544,72	6,56	424,38	4,89	322,56	18,39 ^{ab}	3,63	233,91
T4	171,48	1609,50	9,22	425,60	4,40	440,83	15,75 ^b	3,25	228,26
T5	196,58	1801,93	14,53	439,51	4,60	508,61	17,41 ^{ab}	4,14	235,75
T6	181,80	1552,32	12,23	443,47	4,63	510,42	18,24 ^{ab}	3,67	234,43
	p=0,070	p=0,310	p=0,373	p=0,438	p=0,085	p=0,423	p=0,022	p=0,725	p=0,999

T0: momento zero; **T1:** imediatamente após o exercício; **T2:** 30 minutos; **T3:** 3 horas; **T4:** 12 horas; **T5:** 24 horas; **T6:** 48 horas;

Cp: Ceruloplasmina; **Tf:** Transferrina; **Alb:** Albumina; **Hp:** Haptoglobina; **AGP:** α-1 Glicoproteína Ácida. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os momentos (p<0,05). *Proteína não identificada nominalmente de peso molecular 23.000Daltons

TABELA 2 - Média ($\pm$ desvio padrão) e mediana de proteínas séricas determinadas pela técnica de SDS-PAGE de 10 equinos submetidos ao teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).

Momentos		Frações Proteicas						
	IgA (mg/dL)	IgG (mg/dL)	Cp (mg/dL)	Tf (mg/dL)	Alb (g/dL)	Hp (mg/dL)	AGP (mg/dL)	23KDa * (mg/dL)
T0	169,28	1700,50 ± 411,89	13,56	436,39	4,86 ^{xy}	21,19 ± 8,63	4,59	232,01
T1	169,56	1788,92 ± 491,66	14,66	412,70	4,83 ^{xy}	22,91 ± 10,93	4,34	231,65
T2	183,47	1840,26 ± 478,32	13,39	412,59	4,68 ^y	21,50 ± 10,26	5,45	218,55
T3	165,60	1798,06 ± 481,93	10,48	478,79	5,53 ^x	22,24 ± 7,32	4,57	263,51
T4	180,85 _{6%}	1711,831 ± 361,67	10,71	430,47	4,80 ^{xy}	20,56 ± 8,70	5,07	238,82
T5	184,318%	1821,17 ± 642,71	13,33	399,28	4,64 ^y	23,76 ± 10,17	4,65	212,90
T6	175,79 _{3%}	1639,21 ± 469,36	13,71	381,05	4,56 ^{xy}	24,77 ± 11,73	4,24	239,64
	p=0,638	p=0,250	p=0,382	p=0,063	p=0,033	p=0,233	p= 0,448	p=0,504

T0: momento zero; **T1:** imediatamente após o exercício; **T2:** 30 minutos; **T3:** 3 horas; **T4:** 12 horas; **T5:** 24 horas; **T6:** 48 horas;
Cp: Ceruloplasmina; **Tf:** Transferrina; **Alb:** Albumina; **Hp:** Haptoglobina; **AGP:** α 1 Glicoproteína Ácida. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos. *Proteína não identificada nominalmente de peso molecular 23.000Daltons

TABELA 3 - Medianas das concentrações séricas das frações proteicas de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA) em comparação com o teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).

Exercício		Momentos					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
IgA (mg/dL)	TRA	198,93 ± 77,21	151,58 ± 58,727	194,19 ± 69,22	193,25	187,02 ± 66,63	196,58
	TLD	200,97 ± 77,07	199,09 ± 95,964	211,36 ± 81,35	165,6	192,5 ± 62,55	184,3
IgG (mg/dL)	TRA	1627,87 ± 260,10	1488,84	1752,38 ± 443,96	1544,78	1591,37 ± 270,67	1724,88 ± 418,44
	TLD	1700,52 ± 411,89	1700,29	1840,26 ± 478,32	1670,25	1711,83 ± 361,67	1821,17 ± 642,71
Cp (mg/dL)	TRA	8,59	11,65 ± 7,594	9,28	6,55	9,21	17,23 ± 12,19
	TLD	9,01	14,66 ± 12,790	9,19	6,1	5,99	13,33 ± 7,93
Tf (mg/dL)	TRA	409,61 ± 123,24	433,21 ± 121,93	397,74 ± 114,69	424,37	396,46 ± 129,62	439,5
	TLD	409,61 ± 154,98	409,62 ± 128,77	395,65 ± 135,19	478,78	410,38 ± 98,48	399,28
Alb (g/dL)	TRA	4,85 ± 0,63	4,72 ± 0,51	4,47	4,89	4,48 ± 0,57	4,82 ± 1,04
	TLD	5,01 ± 0,83	5,15 ± 0,76	4,68	5,53	4,87 ± 0,70	4,55 ± 0,61
AAT (mg/dL)	TRA	693,89 ± 508,20	0	317,00 ± 111,73	322,56	440,82	460,02 ± 85,98
	TLD	390,26 ± 23,45		438,66 ± 33,66	520,49	578,75	530,98 ± 122,14
Hp (mg/dL)	TRA	23,36 ± 11,96	24,52 ± 14,67	21,34 ± 11,82	20,68 ± 8,46	20,43 ± 14,11	17,41
	TLD	21,19 ± 8,63	22,91 ± 10,93	21,50 ± 10,26	22,24 ± 7,32	20,56 ± 8,70	23,89
AGP (mg/dL)	TRA	3,90 ± 1,03	3,43	3,55 ^x	3,63	3,87 ± 2,01	4,22 ± 1,70
	TLD	4,80 ± 1,99	4,34	5,28 ^y	4,57	5,03 ± 1,65	5,09 ± 2,67
P=0,002							
23 Kda (mg/dL)	TRA	236,63 ± 67,69	234,21 ± 51,65	234,43 ± 79,27	233,90 ± 62,19	228,25 ± 45,34	235,75 ± 56,14
	TLD	231,25 ± 72,31	241,09 ± 69,64	233,51 ± 75,81	285,70 ± 114,17	237,88 ± 51,10	263,90 ± 138,10
							234,43 ± 68,19
							257,18 ± 83,01

T0: momento zero; **T1:** imediatamente após o exercício; **T2:** 30 minutos; **T3:** 3 horas; **T4:** 12 horas; **T5:** 24 horas; **T6:** 48 horas;

Cp: Ceruloplasmina; **Tf:** Transferrina; **Alb:** Albumina; **Hp:** Haptoglobina; **AGP:** α1 Glicoproteína Ácida. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) entre os momentos. *Proteína não identificada nominalmente de peso molecular 23.000Daltons

TABELA 4 - Medianas da atividade sérica de creatina quinase, proteínas totais séricas e fibrinogênio de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA).

Resultados por momento (TRA)			
	Proteína Total (g/dL)	CK (UI/L)	Fb (mg/dL)
T0	7,20	250,50	200
T1	7,40	278,57	300
T2	7,20	251,12	200
T3	7,40	294,18	300
T4	7,10	264,36	200
T5	7,25	300,06	200
T6	7,25	283,26	200

T0: momento zero; **T1:** imediatamente após o exercício; **T2:** 30 minutos; **T3:** 3 horas; **T4:** 12 horas; **T5:** 24 horas; **T6:** 48 horas **CK:** creatina quinase; **Fb:** fibrinogênio

TABELA 5 - Medianas da atividade sérica de creatina quinase, proteínas totais séricas e fibrinogênio de 10 equinos submetidos ao teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).

Resultados por momento (TLD)			
	Proteína Total (g/dL)	CK (UI/L)	Fb (mg/dL)
T0	7,75	279,38	200
T1	7,60	334,76	200
T2	7,05	238,16	200
T3	8,20	298,11	300
T4	7,70	303,17	200
T5	6,95	264,61	200
T6	7,10	259,97	200

T0: momento zero; **T1:** imediatamente após o exercício; **T2:** 30 minutos; **T3:** 3 horas; **T4:** 12 horas; **T5:** 24 horas; **T6:** 48 horas **CK:** creatina quinase; **Fb:** fibrinogênio.

TABELA 6 - Médias (desvio padrão) e medianas da atividade sérica de creatina quinase, proteínas séricas e fibrinogênio de 10 equinos submetidos ao de rápida aceleração e curta duração (TRA) em comparação com o teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).

		Momentos						
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Exercício								
ProteínaTotal (g/dL)	TRA	7,50 ± 0,89	7,40	7,38 ± 0,75	7,40	7,25 ± 0,66	7,25	7,25
	TLD	7,91 ± 1,02	7,60	7,89 ± 1,43	8,10	7,69 ± 0,89	6,95	7,10
CK (UI/L)	TRA	250,50	278,57	305,43 ± 207,10	294,18	264,36	300,05	266,54 ± 64,06
	TLD	279,38	334,76	271,05 ± 100,12	298,11	303,17	264,61	295,52 ± 24,64
Fb (mg/dL)	TRA	200	300	200	200	200	200	200
	TLD	200	200	200	300	200	200	200

T0: momento zero; **T1:** imediatamente após o exercício; **T2:** 30 minutos; **T3:** 3 horas; **T4:** 12 horas; **T5:** 24 horas; **T6:** 48 horas **CK:** creatina quinase; **Fb:** fibrinogênio.

TABELA 7 - Determinação do coeficiente de correlação de Pearson entre as frações de proteínas séricas e a enzima creatina quinase, de 10 equinos submetidos ao teste de longa duração e baixa aceleração (TLD).

CK		
PROTEÍNAS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)	P
IgA	-0,211	0,080
IgG	-0,222	0,064
CP	-0,407	0,000
Tf	0,311	0,009
Alb	-0,093	0,444
Hp	0,299	0,012
AGP	-0,161	0,183
23 kDa	-0,144	0,233
Fb	0,09	0,458
Proteínas totais	-0,173	0,152

CK: Creatina quinase; **Cp:** Ceruloplasmina; **Tf:** Transferrina; **Alb:** Albumina; **Hp:** Haptoglobina; **AGP:** α_1 glicoproteína ácida; **Fb:** fibrinogênio; *Proteína não identificada nominalmente de peso molecular 23.000Daltons. Foram consideradas correlações positivas $0 < \text{Pearson } (r) < 1$; $0,2 < r < 0,4$ = correlação fraca positiva; $0,4 < r < 0,7$ = correlação moderada; $0,7 < r < 0,9$ = correlação forte. Foram consideradas correlações negativas $0 < \text{Pearson } (r) < -1$; $-0,2 < r < -0,4$ = correlação fraca negativa; $-0,4 < r < -0,7$ = correlação moderada negativa; $-0,7 < r < -0,9$ = correlação forte negativa.

Tabela 8 - Determinação do coeficiente de correlação de Pearson entre as proteínas séricas e a enzima creatina quinase, de 10 equinos submetidos ao teste de rápida aceleração e curta duração (TRA).

CK		
PROTEÍNAS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)	P
IgA	0,568	0,000
IgG	0,255	0,033
CP	0,040	0,739
Tf	0,105	0,386
Alb	0,144	0,235
Hp	0,234	0,051
AGP	-0,070	0,564
23 kDa	0,204	0,091
Fb	0,145	0,230
PROTEÍNAS TOTAIS	0,298	0,012

CK: Creatina quinase; **Cp:** Ceruloplasmina; **Tf:** Transferrina; **Alb:** Albumina; **Hp:** Haptoglobina; **AGP:** α -₁ glicoproteína ácida; **Fb:** fibrinogênio; *Proteína não identificada nominalmente de peso molecular 23.000Daltons. Foram consideradas correlações positivas $0 < \text{Pearson } (r) < 1$; $0,2 < r < 0,4$ = correlação fraca positiva; $0,4 < r < 0,7$ = correlação moderada; $0,7 < r < 0,9$ = correlação forte. Foram consideradas correlações negativas $0 < \text{Pearson } (r) < -1$; $-0,2 < r < -0,4$ = correlação fraca negativa; $-0,4 < r < -0,7$ = correlação moderada negativa; $-0,7 < r < -0,9$ = correlação forte negativa

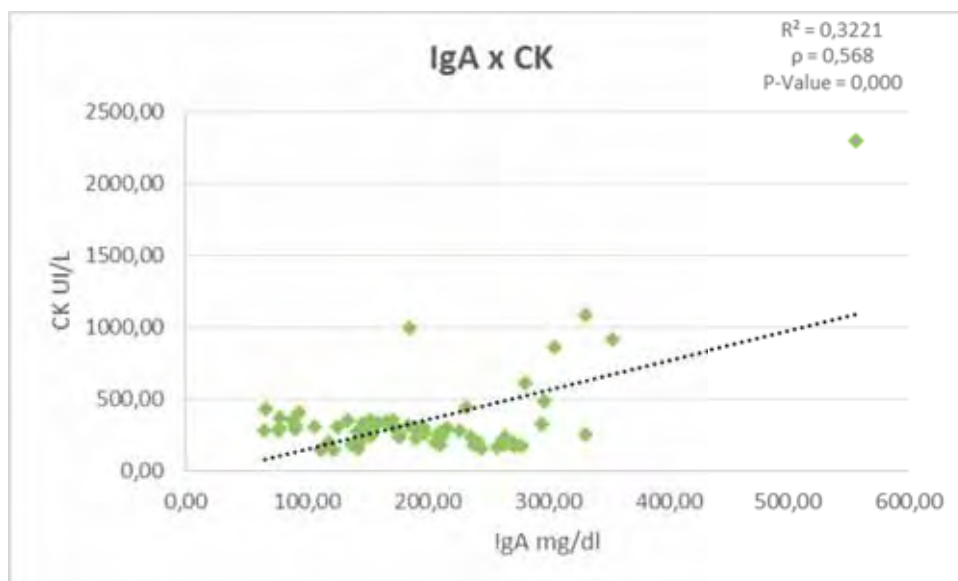


Figura 1. Correlação e gráfico de dispersão entre IgA e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA).

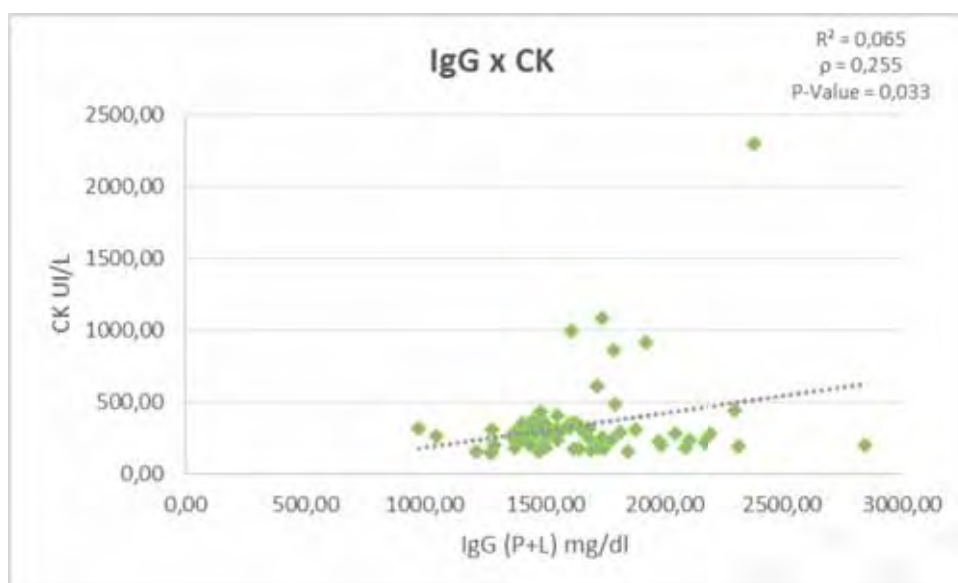


Figura 2. Correlação e gráfico de dispersão entre IgG e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA).

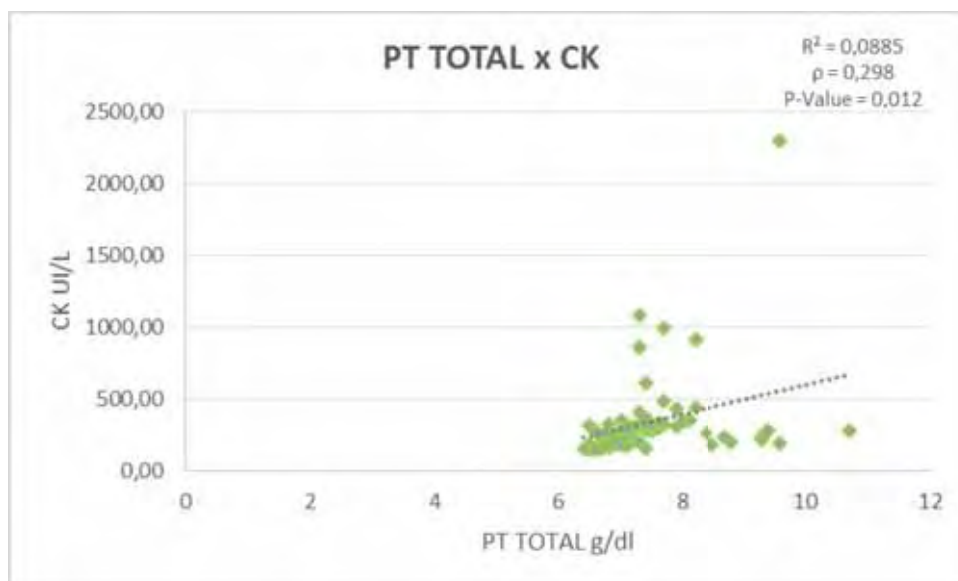


Figura 3. Correlação e gráfico de dispersão entre PT sérica e creatina quinase (CK) de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA).

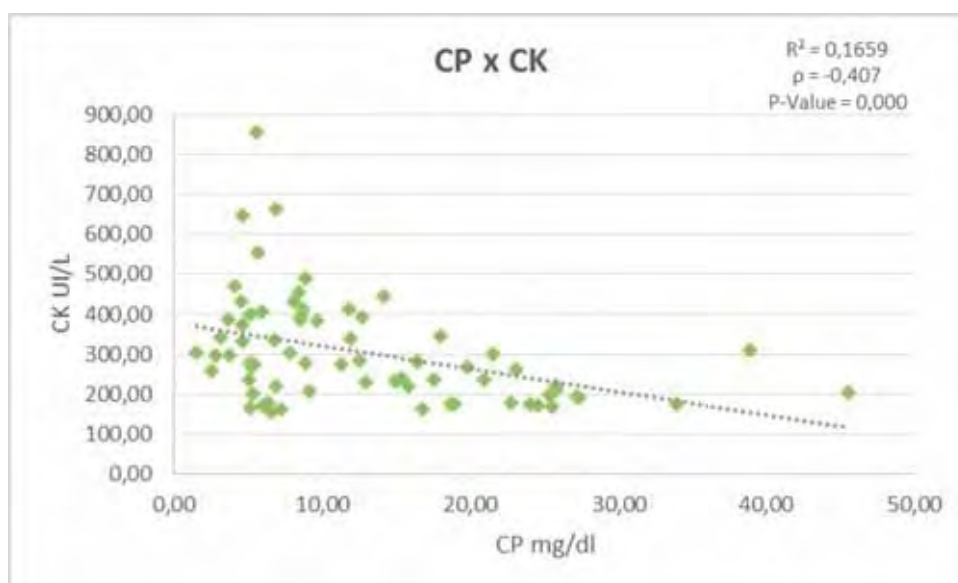


Figura 4. Correlação e gráfico de dispersão entre Ceruloplasmina e creatina quinase (CK), de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de baixa aceleração e longa duração (TLD).

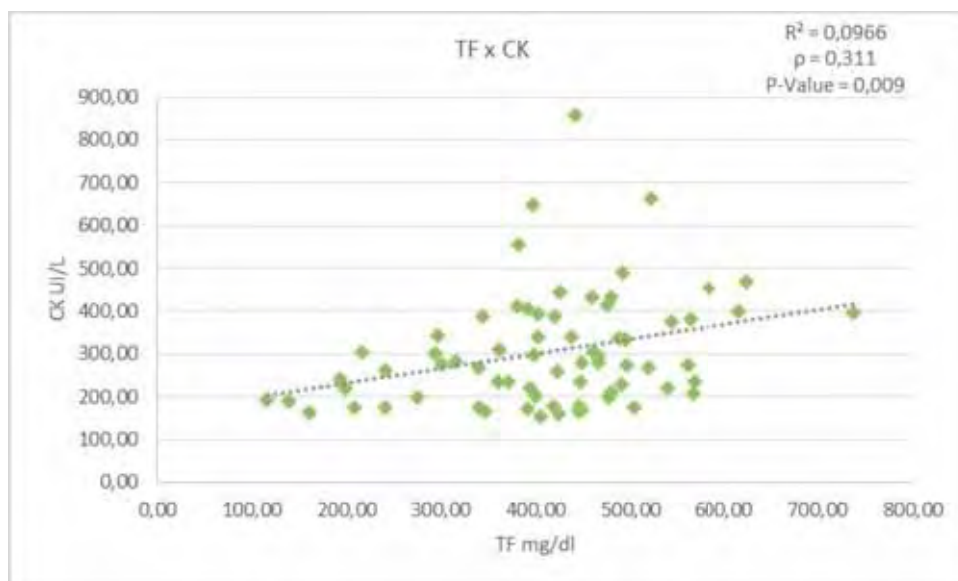


Figura 5. Correlação e gráfico de dispersão entre Transferrina e creatina quinase (CK), de 10 equinos submetidos ao protocolo de exercício de baixa aceleração e longa duração (TLD).

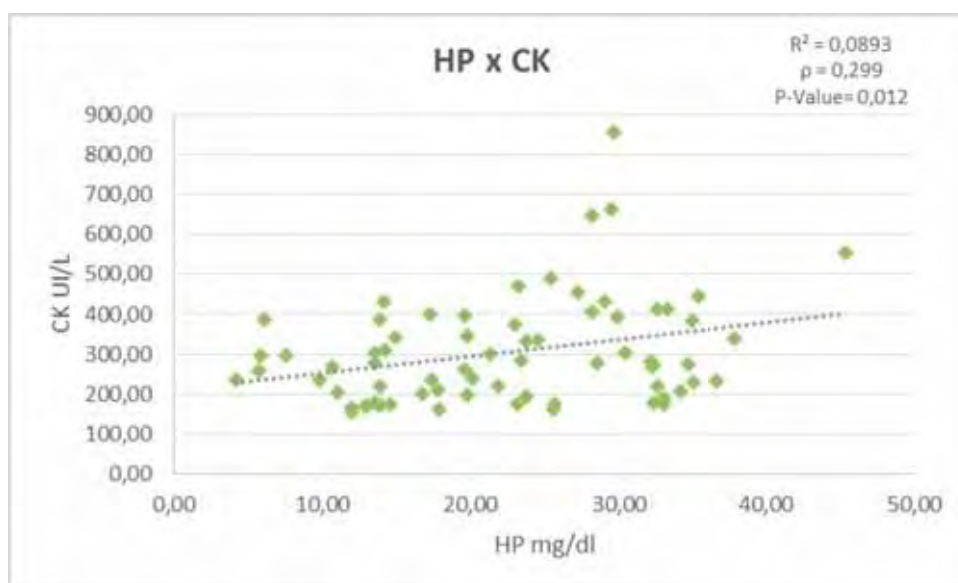


Figura 6. Correlação e gráfico de dispersão entre haptoglobina e creatina quinase (CK), submetidos ao protocolo de exercício de baixa aceleração e longa duração (TLD).

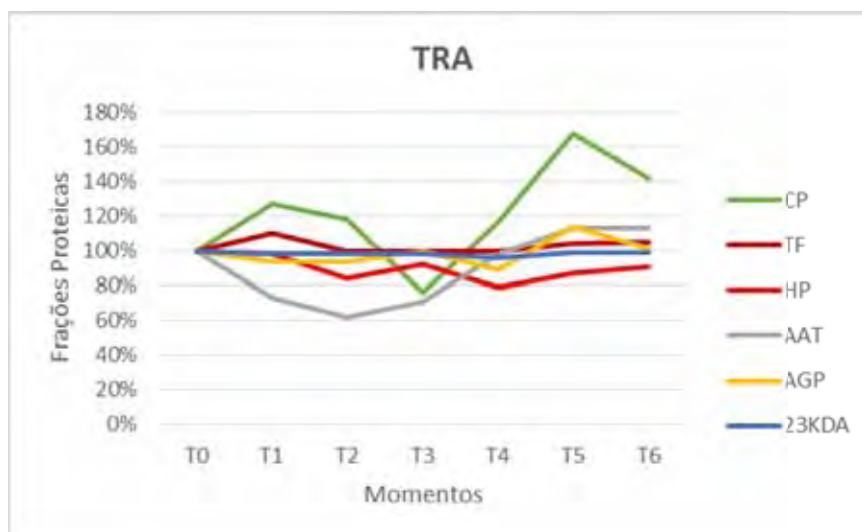


Figura 7. Porcentagem das frações das proteínas séricas de 10 equinos nos momentos T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6 submetidos ao protocolo de rápida aceleração e curta duração (TRA).

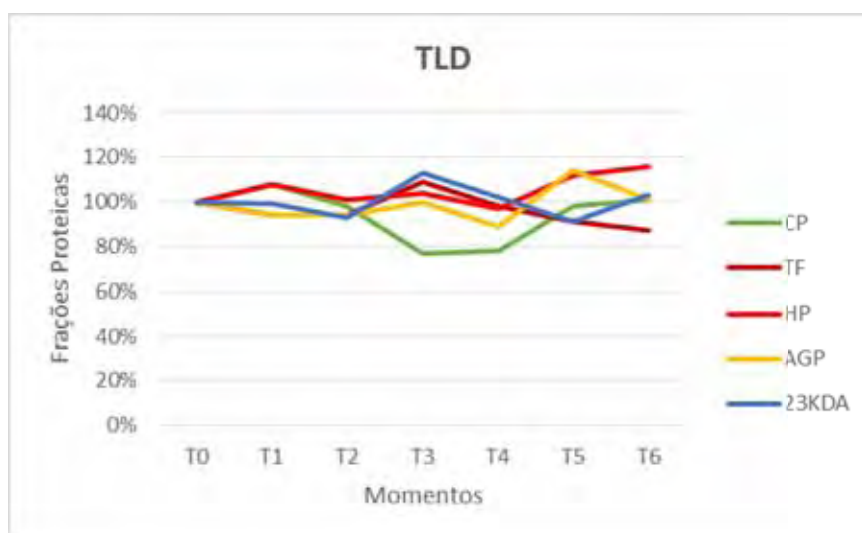


Figura 8. Porcentagem das frações proteínas séricas de 10 equinos nos momentos T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6 submetidos ao protocolo de baixa aceleração e longa duração (TLD).

6. DISCUSSÃO

A crescente utilização do equino em atividades de esporte tem levado a diversificação dos exercícios em que participam e a maior exigência de sua *performance* (DA CÃS et al., 2000). Estudos têm demonstrado que o exercício físico induz alterações nos marcadores sanguíneos de equinos atletas, no que diz respeito à prática executada, seja em competições a campo, exercícios padronizados em esteira ou mesmo exercícios padronizados por raça (DE MOFFARTS et al., 2005; YONEZAWA, 2010).

Nos equinos submetidos ao protocolo de exercício de rápida aceleração e curta duração (TRA) foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nas concentrações séricas da fração proteica de haptoglobina entre o momento T1, quando comparado com os momentos T2 e T4 após a prática do mesmo (Tabela 1). A haptoglobina nos equinos é considerada uma proteína de resposta moderada e quando presente livre no sangue previne lesões teciduais oxidativas (ECKERSALL, 2008). No caso do exercício, com a contração esplênica, há liberação de hemoglobina livre estimulando a síntese de haptoglobina pelo fígado (HANZAWA, 2002; FAZIO et al., 2010; GONDIM et al., 2013).

No entanto, os resultados das concentrações de hp no presente estudo diferem dos autores supracitados, pois aparentemente, não houve dano oxidativo. Desta forma, o protocolo utilizado nesta pesquisa não promoveu uma resposta de fase aguda, uma vez que as concentrações desta proteína diminuíram. Gondim et al. (2013) em um estudo com cavalos de polo, caracterizaram esta proteína como um possível biomarcador de hemólise causada pelo exercício, indicando que o aumento das concentrações desta proteína demonstra uma fragilidade eritrocitária promovida por este. No referido estudo, 23% dos animais avaliados apresentaram aumento nas concentrações de Hp cinco minutos após o exercício.

Por outro lado, o presente estudo concorda com os achados de Couto et al. (2009), ao avaliarem cães da raça *Greyhound* após corrida. Houve diminuição das concentrações de Hp na comparação de cães da raça *Greyhound* com cães de outras raças. Os autores sugerem que no eletroforetograma a fração desta proteína migra com as frações de α globulinas e que são encontradas em menor concentração na raça *Greyhound*.

As concentrações aumentadas de Hp estão normalmente relacionadas a patologias inflamatórias ou infecciosas (FAGLIARI, 2008; CRISMAN et al., 2008; ECKERSALL, 2010; MURATA et al., 2004; PETERSEN, et al., 2004). Como o presente estudo não está relacionado diretamente a um processo inflamatório sistêmico e as concentrações desta proteína não aumentaram durante a prática dos protocolos de exercício, mesmo sendo notado o aumento ao se avaliar o protocolo TLD com variações nas concentrações de Hp (Figuras 7 e 8).. Assim, sugere-se que o tempo de treinamento estabelecido e a intensidade dos mesmos possam ser considerados bons protocolos de pré-condicionamento físico para os animais avaliados neste estudo. Tal afirmação deve-se ao fato de que o exercício, aparentemente, não caracterizou estresse fisiológico ao ponto de promover lesões teciduais nestes animais. Wellman e Blomer (2009) demonstraram uma relação do estresse oxidativo com exercícios de longa duração, com tempo superior a duas horas, e sem pré-condicionamento físico em humanos submetidos a provas de ultramaratona, maratona e *triátlon*, diferente dos resultados encontrados no presente trabalho relacionados a exercício em esteira com velocidade e consumo de oxigênio controlado.

Foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de albumina durante o exercício de baixa intensidade e longa duração (TLD) quando comparados os momentos T2 e T3 horas. Quando comparados o momentos T2 e T5 observou-se uma diminuição significativa nas concentrações desta proteína. A elevação da proteína total pode ser explicada pela redistribuição de fluidos do compartimento vascular para o espaço extracelular dos tecidos (KINGSTON, 2008). Gondim et al. (2013) sugerem que a transpiração causada pelo exercício promove parcialmente uma desidratação que leva a uma hemoconcentração ocasionando uma redução do volume plasmático, aumentando as concentrações de albumina.

Os autores supracitados relacionaram a desidratação com aumento nas concentrações de proteínas totais em equinos submetidos a treinamento de polo. Os autores observaram essas alterações nas concentrações de proteínas totais heterogeneamente nos momentos cinco minutos e seis horas após a prática do exercício, sem alterações significativas nas concentrações de albumina. Por outro lado, no presente estudo, foram observadas alterações significativas nas concentrações de albumina, que se restabeleceram sem o animal ser hidratado, De acordo com a Tabela 4, no momento T3, a concentração das proteínas totais foi

superior ao valor de referência para espécie equina (5,2 g/dL a 7,9), mas depois se restabeleceu dentro dos parâmetros normais (KANEKO et al., 2008). Portanto, não pode-se atribuir a variação nas concentrações de albumina e para proteínas totais séricas mesmo quando não significativas somente à desidratação (hemoconcentração transitória).

Ao se comparar os dois protocolos de exercício utilizados TRA e TLD, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração da fração proteica α -1 glicoproteína ácida (AGP), do TRA para o TLD (Tabela 3) 30 minutos após o exercício (T2). Esta proteína não tem o seu papel totalmente conhecido, mas está ligada a metabólitos endógenos, como catecolaminas e é secretada para restabelecer a homeostase reduzindo possíveis quadros de lesão tecidual (MURATA et al., 2004). Neste estudo, o exercício de baixa intensidade e longa duração (TLD) é considerado predominantemente aeróbico e o consumo de oxigênio com a probabilidade da formação de espécies reativas de oxigênio é maior, podendo causar lesões oxidativas.

Assim, a síntese de AGP poderia ser estimulada pelo processo de lesão tecidual e estresse oxidativo. Ademais, como a AGP liga-se às catecolaminas pode-se inferir que o aumento observado no protocolo TLD ocorreu em função de maior liberação de adrenalina 30 minutos (T2) após o exercício. Portanto, ao se comparar os protocolos utilizados e a resposta da AGP como marcador de estresse causado pelo exercício, o TRA se configurou como um protocolo mais adequado que o TLD.. Quando comparadas as variações nas concentrações das proteínas durante os protocolos, como observado na figura 7 e 8, nota-se também um aumento na concentração desta proteína em ambos os protocolos.

As atividades séricas de creatina quinase (CK), não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparados os momentos nos protocolos utilizados (TRA e TLD) e nem quando comparados os protocolos entres si. Porém, em todos os momentos (T0 até T6) os equinos apresentaram concentrações elevadas, acima dos valores de referência para a espécie (2,3 até 23,4 UI/L) (KANEKO et al., 2008), de acordo com as Tabelas 4, 5 e 6. Harris et al. (1990) observaram que equinos podem apresentar elevada atividade sérica desta enzima em condições fisiológicas. E, ainda, sugerem que a CK poderia ser removida mais lentamente da circulação ou, que, alguns animais apresentam maior sensibilidade quanto à permeabilidade na membrana da célula muscular quando estimulada.

Além disso, segundo Stockham e Scott (2011), o manuseio inadequado da amostra pode causar aumento na atividade sérica da CK, pois a venopunção incorreta causa lesão das fibras musculares circundantes, levando a contaminação da amostra. A hemólise *in vitro* e a demora na separação do coágulo também podem produzir uma falsa elevação nas atividades desta enzima, pois os eritrócitos contêm adenilatoquinase e glicose-6-fosfato que interferem com a atividade sérica da CK.

A literatura relata dados que corroboram com as informações supracitadas, pois Rose e Hodgson (1994) encontraram atividade sérica da CK variando entre 100 a 300 UI/L, em equinos não submetidos a exercícios. Fernandes (1994) também observou atividade sérica da CK elevada em cavalos não submetidos a exercício (84,29 UI/L) Thomazzian et al (2007), sugerem que há diferenças nas atividades séricas de CK de acordo com a raça, idade e sexo do animal. Da Cãs et al. (2001) também relataram que a atividade desta enzima é constante somente do nascimento até um ano de idade.

Segundo Brancaccio et al. (2008) humanos portadores de macromoléculas das isoenzimas de CK na circulação apresentaram atividade sérica cronicamente elevadas de CK, sem uma causa específica. Desta forma, nestas ocasiões outros parâmetros devem ser avaliados em conjunto para detecção de lesão tecidual, como por exemplo, a atividade sérica de lactato desidrogenase (LDH).

A partir dos estudos realizados por Yonezawa (2010) e Barbosa (2012), para o protocolo de baixa intensidade e longa duração, devem ser utilizadas terapias antioxidantes para prevenir possíveis lesões teciduais, pois a concentrações elevadas de AGP sugeriram a formação de espécies reativas de oxigênio durante o exercício.

Observou-se uma correlação positiva fraca e significativa entre IgA, IgG e Proteína total com a CK no TRA. Klentrou et al. (2002) sugeriram que o aumento das concentrações de imunoglobulinas podem estar relacionado ao exercício, devido ao quadro de imunossupressão transitória provocado por ele. Sendo que a IgA é uma imunoglobulina com predominância as secreções da mucosa do trato superior respiratório, estimulado no exercício e considerada a primeira barreira à colonização de micro-organismos patógenos, esta poderia ser estimulada pelo exercício, assim como a enzima CK. A correlação positiva da proteína com o aumento das concentrações séricas de CK, durante o exercício pode ser explicada pela

redistribuição de fluidos do compartimento vascular para o espaço extracelular dos tecidos, como sugere Gondim et al. (2013).

Mesmo não apresentando diferença estatística algumas proteínas, como a Cp e a Tf, apresentaram variações nas suas concentrações, de importância biológica. Crisman et al. (2008) sugeriram que o incremento do ferro plasmático evitando a formação de radicais livres poderia explicar o aumento das concentrações séricas de transferrina, o que foi observado no protocolo TLD logo após o exercício (T2). Pode ocorrer influxo do ferro nas células e estocagem na forma de ferritina e hemossiderina, com altas concentrações no fígado, no baço e na medula óssea. A redução de transferrina neste estudo no momento (T6), após o esforço pode ser devido ao seu esgotamento pela ligação ao ferro livre como também cita Fallon et al. (2001).

O aumento nas concentrações das frações proteicas de Cp mesmo que não significativo no protocolo TRA, (Figura 7), pode indicar prevenção tecidual contra subprodutos do metabolismo oxidativo como sugerido pelos autores supracitados e também é possível que o aumento de ceruloplasmina em resposta às interleucinas no exercício físico esteja também associado ao seu papel como antioxidante (MEYER et al., 2001). Porém, a relação entre a Cp e lesão muscular quando correlacionada com a atividade sérica da CK, não corrobora com estas observações, pois neste estudo a Cp apresentou uma correlação negativa moderada significativa ($p < 0,05$) com o aumento da CK.

Uma proteína não identificada nominalmente, de 23 kDa foi observada nos traçados eletroforéticos em todos os animais, independentemente do grupo. Apesar de não ter apresentado diferença significativa para os animais avaliados e devido à ausência de informação sobre a sequência gênica desta proteína, Murata et al. (2004) descreveram esta proteína como um monômero da cadeia alfa de haptoglobina em bovinos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a função desta proteína em equinos, uma vez que não há dados disponíveis na literatura sobre o exato papel desta fração proteica.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo de exercício de curta duração e rápida aceleração (TRA), promoveu uma diminuição nas concentrações de haptoglobina, sendo que neste caso, não houve uma resposta de fase aguda e não foi possível detectar presença de lesão oxidativa. Portanto, este exercício configurou-se como um melhor protocolo de condicionamento para os animais avaliados.

Conclui-se que a albumina teve suas concentrações aumentadas em três horas após o protocolo de exercício de baixa intensidade e longa duração (TLD), configurando uma resposta transitória a um quadro de desidratação.

Uma proteína de 23 kDa, não identificada nominalmente, foi observada no traçado eletroforético de todos os animais, mantendo-se constante nos animais avaliados.

A α -1 glicoproteína ácida apresentou aumento significativo nas suas concentrações, no protocolo de baixa intensidade e longa duração (TLD), possivelmente relacionado ao tipo de exercício realizado, que favorece a ocorrências de lesões oxidativas e o aumento da liberação de catecolaminas.

Conclui-se uma correlação positiva fraca entre a CK e IgA, IgG e Pt, para o protocolo TRA e entre CK e Tf e Hp, para o protocolo TLD, indicando que a linha de tendência para estas variáveis foi positiva. E quando correlacionadas a CK e a Cp a linha de tendência foi negativa, porque demonstrou-se uma correlação moderada negativa. Um valor do coeficiente de correlação, embora estatisticamente significativo, não implica necessariamente numa relação de causa e efeito, mas, simplesmente indica a tendência que aquelas variáveis apresentam quanto à sua variação conjunta.

Quando comparadas as variações das concentrações das frações proteicas mesmo sem diferença significativa, observou-se uma alteração na dinâmica das proteínas no TLD e TRA, inferindo a importância biológica da avaliação destas proteínas e concomitante aos protocolos utilizados, demonstrando a importância de se observar os limites fisiológicos durante o treinamento visando o bem estar animal.

8. REFERÊNCIAS

ART, T.; LEKEUX, P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful condition in sports horses. *Livest. Produce Science*, Amsterdam, v 92, n .2, p.101-111, 2005.

BARBANTIL V. *Teoria e prática do treinamento desportivo*. São Paulo: Edgard Blucher, 1997.

BELL, R.; ECKERSALL.D. TORRANCE, A. Laboratory updates: Acute phase protein tests for diagnosis and monitoring of disease in small animals. *Uk Veterinary*, v 13, n9, p1-4, 2008.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; BUONAURO, R. Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med.*, v 27, p 1-18, 2008.

CRISMAN, V.M; SCARRATT, K.W; ZIMMERMAN, L.K; Blood proteins and inflammation in the horse. *Veterinary Clinics Equine Practice.*, v24, p285-29, 2008.

CHRISTENSEN,M.; JACOBSEN,S.; ICHIYANAGI.T;KJELGAARD-HANSEN.M; Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline and equine SAA. *The Veterinary Journal*, v 194, p.332-337, 2012. D

CRYSTAL, R.G. α 1-Antitrypsin deficiency, emphysema and liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v 85, p 1343-1352. 1990.

CYWINSKA.A;GORECKA.R;SZARSKA.E;WITKOWSKI.L;DZIEKAN,P;SCHOLLENBERGER.A; Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. *Equine Veterinary Journal*, v42 , nº38,p23-27,2010.

DiFILLIPO, P.A; NOGUEIRA, A.F.S; SANTANA, A.E; Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, alfa 1-glicoproteína ácida, transferrina e alfa-1-antitripsina, em equinos com cólica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.12, p.2108-2113, 2011.

DE CÃS, E.L; ROUSAURO, A.C; SILVA, C.A.M.; BRASS, K.E. Concentração sérica das enzimas creatinoquinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica em equinos da raça crioula. *Ciência Rural*, v.30, n.4, p 625-629,2000.

De MOFFARTS, B. et al. 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.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. *Veterinary laboratory medicine – clinical pathology*. 3 ed. Iowa: Iowa State University, p 1-300, 1994.

ECKERSALL, P.D; Proteins, proteomics and the dysproteinemias;In KANEKO,J.J.; HARVEY, J. W.;BRUSS M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6 th ed. Burlington: Academic Press, p 117 -155, 2008.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. v185.p 23-27.2010.

FAGLIARI, JJ; S.L. SILVA; SILVA, P.C; PEREIRA, G.T. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo submetido à laparotomia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v 60.n 2,2008.

FAZIO, F. ASSENZA, A; TOSTO,F; CASANELLA,S. ; PICCIONE,G.; CAOLA, G .Modifications of some acute phase proteins and the White blood cell count in thoroughbreds during training. *Veterinary Record*, v167 p 370-372, 2010.

FALLON, K.E. The acute phase response and exercise: the ultra marathon as prototype exercise. *Clinical Journal of Sport Medicine*. v11, p38-43, 2001.

FALLON, K.E.; FALLON, S.K.; BOSTON, T. The acute phase response and exercise, court and field sports. . *Clinical Journal of Sport Medicine*. v35 p 170-173. 2001.

FERNANDES, W. R. *Alterações dos Parâmetros do Eletrocardiograma e da Crase Sanguínea em Equinos das Raças Árabe e Mangalarga, bem como Mestiços*,

submetidos à Prova de Enduro. 1994. 73 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GONDIM, M.R.; FOZ, N.S.B.; PEREIRA, M.C.; FAGLIARI, J.J.; OROZCO, C.A.G.; DÁNGELIS .F.H.F.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G.C. Acute phase response of diferents positions of high-goal(elite) polo ponies. *Journal of Equine Veterinary Science*. Disponível em: <[http://www.j-evs.com/article/S0737-0806\(13\)00089-0/fulltext](http://www.j-evs.com/article/S0737-0806(13)00089-0/fulltext)>. Acesso 18 jun 2013. doi:10.1016/j.jevs.2013.02.005

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*., v6b (11), p 1045-1056, 2005.

HAIR, M.T.SCHOTT II, H.C.; BAYLY, W.M.; LEROUX, A.J. Exercises and Immunity: A review with emphasis on the horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*., v 10, n 5, p280-289, 1996.

HANZAWA, K., HIRAGA, A., YOSHIDA, Y., HARA, H., KAI, M., KUBO, K. & WATANABE, S. Effects of exercise on plasma haptoglobin composition in control and splenectomized thoroughbred horses. *Journal of Equine Science*., v13, p 59-92, 2002.

HARRIS, P. A. et al. Some factors influencing plasma AST/CK activities in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*, v9, p. 66-71, 1990.

HELLMAN, N.E; GITLIN, J.D. Ceruloplasmin metabolism and fuction. *Annual Review of Nutrition*, v 22, p 439-458, 2002.

HODGSON, D.R, ROSE, R.J. *The Athletic Horse*. 1 ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994.

HINCHCLIFF, K.W; KANEPS, A.J; GEOR, R.J. *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders Company, 2004

HULTEN, C.SANDGREN, B.; SKIOLDEBRAND, E.; The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Veterinária*, v40, p323-333, 1999.

HULTEN, C.; SLETTEN, K.; FOYN BRUUN, C. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) in the horse: isolation and characterization of three isoforms. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v57, p 215-217, 1997.

JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. In: SCHALM, O.W. *Veterinary Hematology*. 3ed Philadelphia, Lea e Febinger, 1993.

JACOBSEN, S. KJELGAARD-HANSEN, M; HAGBARD PETERSEN, H.; JENSEN, A.L; Evaluation of commercially available human serum amyloid A(SAA) turbidometric immunoassay for determination ofn equine SAA concentration. *The Veterinary Journal*. , v 172, p 315-319, 2005.

JACOBSEN. S. Review of equine acute-phase proteins. In: *ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS*, 53, 2007, Orlando, EUA, *Proceeding*. University of Florida, 2007. v.53, p.230-235.

KANEKO, J.J; HARVEY, J.H; BRUSS; *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*; 6 ed, 2008.

KINGSTON, J. D. Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training In: *HINCHCLIFF, GEOR, KANEPS (eds.). Equine Exercise Physiology – The science of exercise in the athletic horse 1º ed*. London: Saunders, p.397-409, 2008.

KLENTROU P, CIESLAK T, MACNEIL M, VINTINNER A, PLYLEY M. Effects of moderate exercise on salivary immunoglobulin A and infection risk in humans. *European Journal of Applied Physiology* v 87(2), p 153-158,2002.

KJELGAARD-HANSEN, M.; JACOBSEN, S. Assay Validation and Diagnostic Applications of Major Acute-phase Protein Testing in Companion Animals. *Clinics Laboratory Medicine*. v31, p51-70,2011.

MACHADO, L.P. *Eritrograma, glutationa reduzida e superóxido dismutase eritrocitários em metahemoglobina em equinos da raça Árabe submetidos a exercício em esteira. Efeito da suplementação com vitamina E (dl-alfa-tocoferol)*. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M.; Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal.*, v.168.p28-40. 2004.

NUNOKAWA,Y;FUJINAGA,T.;TAIRA,T;OKUMURA,M;YAMASHITA,K.;TSUNOA,N.; HAGIO,M;.Evaluation of serum amyloid A protein an acute phase reactive protein in horses. *Journal Veterinary Medicine Science.*, v 55 p 1011-1016, 1993.

PATTERSON, S.D. et al. The equine major plasma serpin multigene family: partial characterization including sequence of the reactive-site regions. *Biochem Genetic*, v.29, p477-499, 1991.

PETERSEN, H.H, NIELSEN, J.P; HEEGAARD, P.M.H; Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, v. 35, p.163-187.2004.

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*. Supplement, v.34, p.95-99, 2002.

PRINSEN, B.H.C.M, VELDEN, S.V.M Albumin turnover: experimental approach an its application in health and renal diseases.*Clinical. Chimistry. Acta* v347, p 1-14, 2004.

RADAK, Z.; CHUNG, H.Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 44, p. 153-159, 1995.

ROGERO M.M; MENDES, R.R.; TIRAPEGUI J. Aspectos Neuroendócrinos e Nutricionais em Atletas com Overtraining. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica*. vol 49 nº 3 p 359-368; Junho 2005.

ROSA,L.F.P.B.C;VAINSBERG,M.W.Influência no exercício na resposta imune.*Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v8,n34,p197-172,2002.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. An overview of performance and sport medicine. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R. J. *The athletic horse*. Philadelphia: W. B.Saunders, p. 5-11, 1994.

SATOH,M., FUJINAGA,T., OKUMURA,M., HAGIO,M., Sandwichenzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of serum amyloid A protein in horses. *American Journal Veterinary Research*. v 56, p 1286-1290, 1995.

SMITH LL. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome?. *Journal Strength Cond Research* v 18. p 185-186; 2004.

SMITH LL Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress *Medicine Science Sports Exercises*; v32; p 317-331. 2000.

SNOW, D.H. Post-race, blood biochemistry in Thoroughbreds. **Equine Exercise Physiology**, p 389-399. 1983

STOCKHAM, S.L; SCOTT, M.A. *Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária*.Ed GuanabaraKoogan, Segunda Edição. 2011.

TIZARD, R.I. *Imunologia Veterinária*, Ed. Elsevier. 2009

THOMAZZIAN, A; CARVALHO, J.; WATANABE, M.J.; SILVEIRA, V.F; ALVES, A.L.G ; HUSSNI, C.A ; NICOLETTI, J.L.M . Atividades séricas da aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase de equinos submetidos ao teste padrão de exercício progressivo em esteira *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*, São Paulo, v. 44, n.3, p. 183-190, 2007.

WATANABE, M.J. *Avaliação espirométrica de cavalos da raça Puro Sangue Árabe durante Teste Padrão de Exercício Progressivo*. 2007. 98 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

WEISER, G. Interpretation of leucocyte responses in disease. In: THRALL, M.A; WEISER,G; ALLISON,R;. CAMPBELL, T.W. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. 2ed, p 135-148, 2004.

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)* 2010. 65 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

9. ARTIGO CIENTÍFICO

Considerações sobre o proteinograma sérico no exercício em equinos

Considerations of serum protein concentrations during exercise in horses.

Pedrita Carvalho Ferreira Assunção¹, Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt¹, Aguemí Kohayagawa¹

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO

Sabe-se que a prática de exercícios é cada dia sendo necessária, a criação de protocolos adequados, visando a adaptação e condicionamento do animal atleta, prevenindo lesões causada pelo estresse provocado por estes. Em cavalos atletas, o exercício de alta intensidade está associado à lesão de células musculares e o aparecimento da resposta de fase aguda (APR). Uma das alterações provocada por esta APR é o estímulo da síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e por órgãos extra-hepáticos. Esta APR é uma resposta rápida e não específica. No caso do exercício, a síntese dessas proteínas, tem como finalidade o restabelecimento da homeostase corporal, caracterizando o estresse causado pelo exercício semelhante a um quadro inflamatório. Essas proteínas podem auxiliar na avaliação do treinamento físico como marcadores de início de lesão ou adaptação muscular.

Palavras chave: proteínas de fase aguda, atletas, exercício, inflamação, estresse.

ABSTRACT

It is known that exercise is highly recommended, but with that it is necessary to develop appropriate protocols, aimed to adapt and conditionate the animal athlete, preventing injuries caused by the stress damage to. In athletes horses the high intensity exercise injury is

associated with muscle cells and the onset of the acute phase response (APR) is caused by changes on the stimulation of the synthesis of acute phase proteins in the liver organs and extra hepatic organs. This APR is a fast and non-specific, and the exercises remote to synthesis of these proteins, to restore the body homeostasis, characterizing the stress caused by the exercise as similar to an inflammatory injury. The APP determination could help to evaluate the physical training making than early markers of injury or muscle adaptation.

Key words: acute phase proteins, athletes, exercise, inflammation, stress.

INTRODUÇÃO

Dentre os animais de esporte, os equinos tem a habilidade única em aumentar sua demanda de oxigênio num fator de 60 vezes durante exercício intenso, além de apresentar um metabolismo energético elevado, tornando-os um excelente modelo para investigação de processos patológicos relacionados ao exercício (ART e LEKEUX, 2005).

A atividade física é uma conhecida forma de estresse e a exposição crônica a ela, chamada treinamento físico, é capaz de disparar alterações em a resposta a alterações causada por este estresse (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

É complexa a relação entre a prática do exercício e o sistema imune e a susceptibilidade a desenvolver doenças. Mesmo com o grande número de variáveis relacionados nesta área, aparentemente, o estresse causado pelo exercício tem dois efeitos no sistema imune promovendo estímulo ou supressão do mesmo, que pode contribuir para o aumento da incidência e gravidade de algumas doenças observadas em cavalos de corrida e de alta *performance* (HINES et al., 1996).

O exercício de alta intensidade, portanto, pode estar associado a presença de lesão muscular e, por consequência, a chamada resposta de fase aguda pelo organismo e produção das proteínas de fase aguda. A produção destas proteínas pode ser reconhecida como uma resposta ao estresse (ROSA et al., 2002).

A resposta de fase aguda está relacionada a processos inflamatórios (ou não) em estágios iniciais, não específicos. No sítio inflamatório, ocorrem alterações que promovem a liberação de citocinas, resultando em respostas sistêmicas, como febre, leucocitose e síntese e liberação de proteínas de fase aguda (ECKERSALL, 2008). Humanos submetidos a exercícios de ultramaratona apresentaram alterações na resposta de fase aguda, como consequência ao exercício, similares a condições clínicas ou cirúrgicas (GONDIM et al., 2013). Além destes, Fallon et al (2001), afirmaram que a resposta de fase aguda provocada pelo exercício está relacionada com a lesão muscular e consequente inflamação, confirmada pelo aumento da atividade sérica de creatina quinase (CK).

Em humanos e animais domésticos, a avaliação das concentrações de proteína C reativa (CPR), haptoglobina (Hp) e amiloide A sérico (SAA) são descritos e utilizados para avaliar a higidez, incluindo a detecção de inflamações subclínicas, avaliação da gravidade do processo e período de convalescência (CYWINSKA et al., 2010). Essas alterações podem ser encontradas relacionadas ao exercício, pois o mesmo promove alterações reversíveis que podem ser determinadas e quantificadas laboratorialmente (GONDIM et al., 2013).

REVISÃO DA LITERATURA

O EXERCÍCIO / CAVALO ATLETA

Considerando-se o bem-estar dos equinos, podem ser observados alguns fatores que estão relacionados ao comportamento nas pistas, como as relações homem-animal, animal-

ambiente (temperatura ambiente, umidade relativa do ar, altitude, radiação solar, poluição sonora), além dos sistemas de manejo, estado físico e outros. Todos esses agentes podem interferir no desempenho de um cavalo atleta. Por serem muitas vezes agentes agressores, podem promover, no organismo, reações não específicas de adaptação (HODGSON, 1994). O exercício causa um estresse físico, que pode ter como resultado alterações químicas e celulares. Essas alterações dependem de um número de fatores como clima, condições corporais, nutrição e o tipo de duração do exercício. O exercício prolongado pode alterar a homeostasia do organismo, como demonstrado em atletas humanos (Fallon et al., 2001). Em cavalos atletas o exercício induz alterações nos constituintes bioquímicos do plasma (FAZIO et al., 2010).

A resposta ao exercício poder ser dividida em dois componentes: resposta aguda e adaptação crônica, sendo que a aguda é a resposta transitória ao estresse, e a crônica uma resposta que permite o organismo a tolerar de maneira adequada o estresse (ROSA et al., 2002).

Os treinamentos com animais, para melhorar capacidade de desempenho, têm se tornado cada vez mais comuns, mas a busca por estes objetivos deve respeitar limites fisiológicos. A prática extenuante de exercício sem cuidados acarreta em uma síndrome de excesso de treinamento (*overtraining*). Essa síndrome é caracterizada como um distúrbio neuroendócrino provocado pela falta de compatibilidade entre a prática esportiva e os momentos de descanso, levando a problemas metabólicos (ROGERO et al., 2005). Um dos mecanismos metabólicos que pode explicar essa síndrome é que microtraumas teciduais adaptativos ocorrem normalmente durante a execução de exercícios e a recuperação depende apenas de um programa de treinamento adequado, caracterizado por períodos de repouso suficientes. Estes microtraumas resultam em uma resposta inflamatória moderada, que tem

como finalidade um processo de cicatrização com consequente adaptação muscular, óssea e articular. Essas respostas inflamatórias locais resultam em processos de recuperação do trauma. No entanto, acredita-se que essa recuperação não pode ser alcançada por atletas que estejam realizando treinamentos de alta intensidade e a inflamação aguda e local pode evoluir para um quadro de inflamação crônica e acarretar em uma possível inflamação sistêmica, sendo que parte desta envolve a ativação de monócitos circulantes, que sintetizam citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (SMITH, 2000; SMITH, 2004; ROGERO et al., 2005).

As citocinas pró-inflamatórias exercem sua ação por meio da regulação da função hepática, promovendo a manutenção da glicemia e favorecendo a síntese de proteínas de fase aguda (PFAs) relacionadas ao processo de inflamação, concomitante ao estado hipercatabólico (SMITH 2004; ROGERO 2005).

De acordo com Fallon (2001), há uma reação de fase aguda análoga a que ocorre em processos inflamatórios, devido ao aumento significativo na concentração sérica de ceruloplasmina(Cp) durante os dias do treinamento e pós-treinamento e da concentração sérica de haptoglobina(Hp). Não houve diferença significativa nas concentrações de albumina e alfa-1 antitripsina (AAT). Porém, poucos estudos foram realizados para avaliar a concentração das proteínas de fase aguda (PFAs) durante o treinamento físico em animais até mesmo em humanos.

Fazio et al. (2010) avaliaram alterações nas concentrações das PFAs em equinos durante um programa de treinamento semanal prolongado. Houve diferença significativa nas concentrações de fibrinogênio após 60 dias e um aumento gradual da concentração de haptoglobina durante todo o treinamento.

De acordo com Snow (1983) e Hain et al. (1996), o aumento da liberação da adrenalina provocada pela prática do exercício pode resultar em uma contração esplênica que irá promover não só a liberação de eritrócitos na circulação periférica, mas também de leucócitos. A variação na contagem total de leucócitos é a resposta mais comum à inflamação (WEISER, 2004). Assim, o exercício induz a leucocitose e geralmente é comparado como uma resposta à uma inflamação e induz a resposta de fase aguda pelo organismo (FAZIO et al., 2010).

PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFAs)

Proteínas são compostos indispensáveis à vida e compõem a base das estruturas de células, órgãos e tecidos. Agem como catalisadores em reações bioquímicas, tampão ácido-base, nutrientes, manutenção da pressão osmótica e como hormônios na regulação endócrina. Portanto, a avaliação das concentrações séricas de proteínas totais e suas frações são importantes no auxílio do diagnóstico clínico (ECKERSALL, 2008). Qualquer lesão tecidual durante um processo inflamatório promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas, além do óxido nítrico e glicocorticoides, ativam e modulam a resposta de fase aguda e a liberação de proteínas de fase aguda, principalmente pelo fígado (GRUYS et al., 2005).

A resposta de fase aguda é uma reação promovida pela produção e liberação de citocinas, incluindo interleucinas IL-1, IL-6 e TNF- α . Essas reações promovem alterações essenciais para a defesa e adaptação do organismo, como alterações hormonais e produção de proteínas de fase aguda (CYWINSKA et al., 2010; ECKERSALL, 2008; PETERSEN et al., 2004).

As respostas das PFAs não são específicas e ocorrem alterações nas suas concentrações na presença de infecções, inflamações, trauma cirúrgico ou estresse (PETERSEN et al., 2004; GRUYS et al., 2005; CRISMAN et al., 2008; ECKERSALL & BELL, 2010; KJELGAARD-HANSEN, 2011). Essas proteínas são consideradas como parte da resposta imune inata não específica, envolvendo a recuperação da homeostase e restrição do crescimento microbiano antes dos animais desenvolverem imunidade adquirida a um determinado desafio (MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2008).

Após o estímulo pró-inflamatório, a Il-6 promove a diminuição de Il-1 e TNF- α promovendo uma cascata de reações. A diminuição da resposta de fase aguda ocorre pela rápida remoção de citocinas no fígado, realizada pela Il-10, promovendo a supressão local de produção de Il-6, e por efeitos que inibem a produção de PFAs. Parte da resposta de fase aguda é suprimida pelas Il-1 e Il-4 e algumas PFAS que modulam a produção destas citocinas (GRUYS, 2005).

A concentração de PFAs circulantes varia de acordo com a gravidade do processo e extensão de lesão tecidual. A determinação dessa concentração é útil para o auxílio no diagnóstico e prognóstico de distúrbios inflamatórios, além de possibilitar o monitoramento de uma determinada terapia e para avaliar o estado de saúde (BELL et al., 2008; ECKERSALL, 2008).

As PFAs podem ser classificadas em positivas ou negativas. Nas positivas enquadram-se, dentre outras, a alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) e a haptoglobina (Hp), proteína C reativa (CPR), amiloide A sérico (SAA). No segundo grupo, destacam-se a albumina e a transferrina e suas concentrações séricas tendem a diminuir na presença de condições inflamatórias (KANEKO, 2008; CRISMAN et al., 2008).

Segundo Eckersall e Bell (2010), em todas as espécies animais as PFAs são classificadas de acordo com a resposta que apresentam, como: maior, moderada e menor resposta. Sendo que as “maior”, ou seja, de resposta maior, estão presentes em baixa concentração no soro ($< 1\mu\text{g/L}$) de animais saudáveis e podem ter suas concentrações elevadas em 100-1000 vezes quando existe um estímulo inflamatório, tendo seu pico em 24-48 horas e um declínio rápido na fase de recuperação. As proteínas consideradas de resposta moderada elevam as suas concentrações em 5-10 vezes quando ativadas, apresentando um pico depois de dois a três dias e com declínio mais lento que da maior. As menores ou “menor” têm o um aumento gradual das suas concentrações basais em 50 a 100%. As proteínas de fase aguda negativas diminuem sua concentração durante o processo inflamatório.

Para a espécie equina, consideram-se como as mais importantes PFAs a ceruloplasmina, a haptoglobina e amiloide A sérico. Nos equinos a única proteína de fase aguda considerada como “maior” é o amiloide A sérico (SAA) (ECKERSALL, 2008). As proteínas consideradas de resposta moderada estão sempre presentes em pequenas quantidades no plasma de cavalos sadios e o aumento das suas concentrações é geralmente lento, de dias à semanas. Exemplos de proteínas de fase aguda moderada incluem: haptoglobina (Hp), fibrinogênio (Fb), $\alpha 1$ glicoproteína ácida (AGP) e ceruloplasmina (Cp) (CRISMAN et al., 2008).

As PFAs podem ser usadas como alternativa no monitoramento da saúde animal. Estas são consideradas um método válido devido a sua resposta sistêmica ao estímulo inicial. No entanto, não são utilizadas para estabelecer um diagnóstico específico e também não podem prever a extensão do curso de uma lesão individual no animal. Para avaliação de rebanho, as PFAs podem ser úteis para determinar se existe a propagação e prevalência clínica e

subclínica de algum processo inflamatório indicado pelo aumento da concentração de determinada proteína (PETERSEN et al., 2004).

As proteínas de fase aguda negativas, são aquelas que têm sua concentração diminuída durante a resposta de fase aguda que ocorre durante o processo inflamatório. Esta resposta pode ser rápida e significativa, depois de 24 horas, ou pode ser mais gradual depois de dias (ECKERSALL, 2008).

A albumina, proteína mais abundante no plasma, corresponde a de 35 a 50% da concentração total de proteína e tem um peso molecular de 66,4kD. É uma proteína sintetizada no citoplasma dos hepatócitos. A taxa da síntese de albumina é controlada pela pressão coloidosmótica, embora possa ser influenciada por hormônios como insulina, tirosina e cortisol. Apenas 30 a 40 % desta proteína está presente no sangue, o restante se encontra no espaço intersticial. O catabolismo da albumina ocorre em diferentes tecidos como, músculo, fígado, rim e contribui com a utilização de 40 a 60 % da albumina total (ECKERSALL, 2008; PRINSEN & VELDEN, 2004). A albumina, portanto, auxilia na manutenção da pressão coloidosmótica e do volume sanguíneo. Outra função é o transporte de diversos metabólitos que circulam no sangue. Substâncias como ácidos graxos, cálcio, colesterol, bilirrubina, circulam ligados à albumina, além destes, diversos agentes farmacológicos também podem ser ligados a esta proteína. A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa e a sua concentração sérica diminui gradualmente em processos inflamatórios e infecções (ECKERSALL, 2008).

A transferrina, proteína responsável pelo transporte de ferro no sangue e também é considerada como uma proteína de fase aguda negativa nos mamíferos, mas a sua maior aplicabilidade diagnóstica está relacionada em mamíferos com doenças ligadas ao metabolismo do ferro (ECKERSALL, 2008). A transferrina está relacionada à imunidade

inata por se ligar aos íons ferro prevenindo a proliferação de patógenos e parasitas que utilizam este nutriente (MURATA et al., 2004). Concentrações diminuídas de transferrina pode ser consequência da produção inadequada desta proteína por danos nos hepatócitos, doença renal, leucemias, inflamação aguda e crônica (JAIN,1993).

Fibrinogênio é considerado uma proteína de fase aguda positiva, produzida pelos hepatócitos com peso molecular de 340 kD (ECKERSALL, 2008; STOCKHAM e SCOTT, 2011). O fibrinogênio é produzido somente pelo fígado é um precursor de fibrina, está presente livre no plasma e nos grânulos plaquetários (KANEKO et al., 2008). Segundo Stockham e Scott (2011), como o fibrinogênio é uma PFA positiva, espera-se que a concentração plasmática desta proteína aumente durante um processo inflamatório. Entretanto, quando ocorre inflamação simultaneamente com um processo de coagulação e fibrinólise o aumento no consumo desta proteína pode mascarar elevação na produção de fibrinogênio.

Segundo Eckersall (2008) e Hulten et al., (2002) o fibrinogênio é considerado uma PFA de resposta moderada de acordo com estudos relacionados em artrites em equinos. Por outro lado, a haptoglobina e o amiloide A sérico apresentaram aumentos nas concentrações séricas anteriores ao aumento do fibrinogênio, neste mesmo estudo. Crisman et al. (2008) sugerem que a alteração na concentração de fibrinogênio não é necessariamente o melhor método para detecção e avaliação de uma inflamação, devido a sua resposta de fase aguda moderada, comparada com outras proteínas de fase aguda, dificultando assim a sua utilidade clínica, apesar da técnica (precipitação térmica) para sua determinação ser de fácil aplicação e utilizada a bastante tempo (ECKERSALL, 2008).

A haptoglobina é uma glicoproteína composta de subunidades α e β com a alfa apresentando um peso molecular de 16 a 23 kDa e a unidade beta de 35 a 40 kDa. Estas

subunidades são combinadas e formam a cadeia β - α - α - β . A função primária da haptoglobina é se ligar a hemoglobina livre no sangue, para prevenir lesões teciduais oxidativas. Essa cadeia haptoglobina hemoglobina (Hp-Hb), reduz a disponibilidade, para utilização bacteriana, do resíduo heme e seu íon ferro. Sendo assim, a Hp tem uma atividade antibacteriana indireta (ECKERSALL, 2008).

A cadeia Hp-Hb também é reconhecida pela via CD163, um receptor de membrana específico em macrófagos, e está relacionada à fagocitose, entre outras atividades imunomodulatórias, como quimiotaxia de granulócitos, inibição da proliferação de mastócitos e inibição da proliferação de células T (MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2008). Está relacionada à cicatrização de feridas, pela estimulação da angiogênese. O aumento das concentrações séricas de haptoglobina podem ser um indicador sensível de hemólise intra ou extravascular e de infecção ou inflamação em equinos (CRISMAN et al., 2008). As suas concentrações séricas podem ser influenciadas por outros fatores não relacionados à resposta de fase aguda, como doenças renais e icterícia obstrutiva, que podem causar hiperhaptoglobulinemia (PETERSEN et al., 2004).

O amilóide A sérico (SAA) tem peso molecular, em sua forma natural de aproximadamente 180 kD, pois geralmente forma um complexo com lipoproteínas. Após a desnaturação, o peso estimado de suas subunidades é de 9 a 14 kD (PETERSEN et al., 2004).

Em humanos, quatro isoformas foram identificadas e separadas geneticamente. São elas: SAA 1, SAA 2, SAA 3 e SAA 4. As isoformas SAA 1 e 2 são produzidas no fígado e têm suas concentrações elevadas em resposta a uma reação de fase aguda. Em contrapartida, a isoforma SAA4 é produzida normalmente em baixas concentrações no fígado e não é influenciada pela resposta de fase aguda. A isoforma SAA3 tem suas concentrações aumentadas na resposta de fase aguda, é produzida pelo tecido adiposo e pulmão, ovário e

glândula mamária. Além disso, também pode ser encontrada no colostro dos bovinos. O SAA sérico é precursor do amiloide A, portanto, está relacionado também com a patogenia da amiloidose (HULTEN et al., 1997; ECKERSALL, 2008). Três isoformas do SAA (SAA1, SAA2, SAA3) foram descritas em equinos. A secreção de SAA3 foi demonstrada na glândula mamária (colostro) e articulação (líquido sinovial) de equinos (CRISMAN et al., 2008).

As funções do SAA incluem a ativação ou a inibição das funções dos leucócitos, a migração de células inflamatórias para o local da infecção, a inibição da proliferação das células endoteliais e linfócitos, a inibição da agregação de plaquetas e a fagocitose. O SAA pode também estar ligado à liberação de mieloperoxidase e migração direta de fagócitos, além de modular e remodelar a degradação de tecido conjuntivo (GRUYS et al., 2005; CRISMAN et al., 2008).

Em equinos, alterações das concentrações do SAA estão relacionadas à diversas doenças como inflamações e infecções, em pós-operatórios, artrite, sepsse, enterite, pneumonia, diarreia e trauma cirúrgico. A avaliação das concentrações de SAA deve ser realizada em equinos com cólica, principalmente quando esta é estimulada por um processo inflamatório (ECKERSALL, 2008). De maneira geral, a sensibilidade e o perfil cinético do SAA, quando comparado com outras PFAs moderadas como o fibrinogênio, fazem desta proteína o marcador ideal de inflamação e lesão tecidual em equinos (CRISMAN et al., 2008).

A ceruloplasmina é uma proteína com peso molecular de 151 kDa. Esta é relacionada com o transporte de cobre e oxidação do ferro. No entanto, o mecanismo de incorporação do cobre pela ceruloplasmina ainda não está bem definido. O aumento nas suas concentrações é resultado do aumento da expressão gênica desta proteína em tecido hepático e extra-hepático, como baço, pulmão, testículo e cérebro (ECKERSALL, 2008; HELLMAN & GITLIN, 2002).

Segundo um estudo realizado por Gondim et al. (2013), o aumento da ceruloplasmina em intervalos de seis e doze horas após o exercício também pode ser indicativo de processo inflamatório ou também proteção tecidual contra subprodutos do metabolismo oxidativo, desta forma, é possível que o aumento de ceruloplasmina em resposta às interleucinas no exercício físico esteja também associado ao seu papel como antioxidante. Pois durante o exercício físico intenso, há liberação de espécies reativas de oxigênio e estímulo ao processo inflamatório por meio da liberação de citocinas. (RÁDAK, 2000).

A alfa-1 antitripsina (AAT) é uma glicoproteína da família das inibidoras de proteases séricas sintetizadas, principalmente, pelo fígado e, em menor quantidade, pelos monócitos, macrófagos bronco alveolares e glândula mamária. A sua principal função é inibir a protease elastase dos neutrófilos, que, ao ser liberada nos locais de inflamação, promove destruição tecidual. (ECKERSALL, 2008; DiFILLIPO et al., 2011).

Gondim et al. (2013), encontraram aumento significativo nas concentrações de AAT, albumina, ceruloplasmina e haptoglobina em equinos de polo. As elevações nas concentrações dessas proteínas foram observadas cinco minutos após o exercício (partidas de polo), mas não foram observadas alterações significativas nas concentrações dessas proteínas após seis e doze horas neste exercício. Pôneis submetidos à laminite experimental apresentaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de ATT (FAGLIARI et al., 2008).

Alfa 1 glicoproteína ácida (AGP) é uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 43kDa, composta por ligações covalentes de carboidratos. Embora o papel preciso desta proteína ainda não esteja muito esclarecida, está ligada a vários metabólitos endógenos como a heparina, histamina, serotonina, esteroides e catecolaminas (ECKERSALL, 2008). AGP é secretada principalmente pelos hepatócitos e contribui para a

homeostase reduzindo a lesão tecidual associada com o processo inflamatório em células extra-hepáticas, endoteliais e epiteliais. Esta proteína é um agente anti-inflamatório natural, pois inibe a ativação de neutrófilos e aumenta a secreção de Il-1 e atua na depuração de lipopolissacarídeos neutralizando sua toxicidade. É responsável pela inibição da indução da mitose e proliferação de linfócitos (MURATA et al., 2004). Na maioria das espécies, a AGP é considerada uma proteína de fase aguda de resposta moderada, que tem suas concentrações elevadas mais lentamente. (ECKERSALL, 2008).

Os métodos laboratoriais de determinação das proteínas têm por finalidade identificar e avaliar quantitativamente as mesmas. A eletroforese é um método inespecífico no qual as proteínas se movem por meio de um campo elétrico formando picos que permitem a identificação e quantificação relativa das mesmas e sua principal utilização é identificar os picos de variações proteicas (KANEKO, 2008).

Atualmente, utiliza-se para eletroforese de proteínas o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Durante a polimerização da acrilamida para formar o gel de uso, a proporção de ligações cruzadas entre as cadeias de polímeros pode ser controlada, e o gel forma uma “peneira” molecular, que controla a migração das proteínas de acordo com o seu tamanho. Uma vez no gel, a separação é baseada pela massa e pela carga. Neste método faz-se um pré tratamento das proteínas com o aquecimento em solução detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e o agente de redução é o β mercaptoetanol. Este sistema, SDS-PAGE, foi introduzido por Laemmli (1970) e a separação das proteínas por esta técnica aumenta a complexidade de interpretação do eletroforetograma (ECKERSALL, 2008).

Christensen et al. (2012) realizaram investigações para avaliar a aplicação de um teste de imunoensaio automatizado de turbidimetria por aglutinação em látex (LAT) baseado em anticorpos monoclonais de amiloide A sérico de humanos, para avaliação desta proteína

(SAA) em cães, gatos e equinos. Foi também realizada uma comparação entre os métodos utilizados para determinação de SAA em equinos e felinos e uma avaliação da *performance* de SAA em cães. O teste LAT apresentou uma *performance* analítica aceitável por se tratar de um método rápido e de fácil aplicação, tornando sua utilização facilitada na rotina laboratorial.

CONCLUSÃO

A prática do exercício promove alterações fisiológicas no organismo. Uma das alterações provocadas por ele é o estresse oxidativo que promove um desequilíbrio sistêmico e nos casos de treinamento intensivo, lesões musculares e articulares, prejudicando assim o desempenho em equinos de alto rendimento. Portanto, a determinação das proteínas de fase aguda, como marcadores da presença de uma possível lesão e desempenho destes animais frente ao exercício pode funcionar como uma ferramenta integrada para avaliar a prática de treinamentos físicos adaptativos para estes animais. Desta forma, estudos que relacionem essas proteínas e o exercício devem ser realizados, para que seja possível obter informações sobre o potencial dessas proteínas como biomarcadores do estado de saúde e de avaliação do restabelecimento da homeostasia dos animais após serem submetidos à prática esportiva.

REFERÊNCIAS

ART, T.; LEKEUX, P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful condition in sports horses. *Livest. Produce Science Amsterdam*, v 92, n .2, p.101-111, fev.2005. Disponível em: <<http://hydrozen.org/wp-content/uploads/2012/05/Exercise-induced-physiological-adjustments-to-stressful-conditions-in-sports-horses.pdf>>. Acesso 08 abr.2013. doi:10.1016/j.livprodsci.2004.11.013.

BELL, R.; ECKERSALL; TORRANCE, A. Laboratory updates: Acute phase protein tests for diagnosis and monitoring of disease in small animals. **Uk Veterinary** v 13 n9 p1-4.

Novembro 2008. Disponível em < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2044-3862.2008.tb00544.x/pdf>>. Acesso 08 jun.2013. DOI: 10.1111/j.2044-3862.2008.tb00544.x.

CRISMAN, V.M. et al. Blood proteins and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics Equine Practice.** V24 p285-297.2008. Disponível em< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652956>>. Acesso 10 abr 2013.

CHRISTENSEN, M et al. Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline and equine SAA. **The Veterinary Journal**, v 194, p.332-337, 2012. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704135>>. Acesso 18 jun.2013. PMID: 22704135

CYWINSKA. A. et al. Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses; **Equine Veterinary Journal**; V.42 n°38, p23-27; 2010 Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21058978>>. Acesso 18 jun.2013. PMID:21058978.

DiFILLIPO, P.A et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, alfa 1-glicoproteína ácida, transferrina e alfa-1-antitripsina, em equinos com cólica. **Ciência Rural**: Santa Maria, v.41, n.12, p.2108-2113, 2011. Disponível em<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782011001200012&nr=m=iso&tlng=pt>. Acesso 18 jun 2013. ISSN 0103-8478.

ECKERSALL, P.D; Proteins, proteomics and the dysproteinemias; In KANEKO,J.J.; HARVEY, J. W.;BRUSS M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 th ed. Burlington: Academic Press, p 117 -155, 2008.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**. v185.p 23-27.2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621712>>. Acesso em:18 jun.2013. PMID:20621712.

FAGLIARI, JJ. et al. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo submetido à laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v 60.n 2.Abril 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000200007>>. Acesso 18 jun.2013. ISSN 0102-0935.

FAZIO, F.et al. Modifications of some acute phase proteins and the White blood cell count in thoroughbreds during training. **Veterinary Record** 2010; 167:370-372. Disponível em: < <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/167/10/370.full.pdf+html>> Acesso em 29/05/2013 as 15:47 doi:10.1136/vr.c3761.

FALLON, K.E. The acute phase response and exercise: the ultra marathon as prototype exercise. **Clinical Journal of Sport Medicine**. V11 p38-43. 2001. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176144>>. Acesso em 18 jun.2013. PMID: 11176144.

FALLON, K.E.; FALLON, S.K.; BOSTON, T. The acute phase response and exercise, court and field sports. . **Clinical Journal of Sport Medicine**. V 35 p 170-173. 2001.Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1724337/>>. Acesso 18.jun.2013. doi: 10.1136/bjism.35.3.170.

GONDIM, M.R. et al. Acute phase response of diferents positions of high-goal(elite) polo ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**. Disponível em: <<http://www.j->

[evs.com/article/S0737-0806\(13\)00089-0/fulltext](http://evs.com/article/S0737-0806(13)00089-0/fulltext)>. Acesso 18 jun 2013.
doi:10.1016/j.jevs.2013.02.005.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science.** V 6b (11) p 1045-1056. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1390650/>>. Acesso em: 18 jun. 2013.
doi:10.1631/jzus.2005.B1045.

HAIN, M.T. et al. Exercises and Immunity: A review with emphasis on the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v 10, n 5, p280-289, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884712>>. Acesso 18 jun. 2013. PMID: 8884712

HELLMAN, N.E; GITLIN, J.D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual Review of Nutrition**, v 22, p 439-458, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055353>>. Acesso 18 jun. 2013.

HODGSON, D.R, ROSE, R.J. **The Athletic Horse**. 1 ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994.

JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. In: SCHALM, O.W. et al. **Veterinary Hematology**. 3ed Philadelphia, Lea e Febinger, 1993.

KJELGAARD-HANSEN, M.; JACOBSEN, S. Assay Validation and Diagnostic Applications of Major Acute-phase Protein Testing in Companion Animals. **Clinics Laboratory Medicine**. v31, p51-70, 2011. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295722>>. Acesso em: 18. jun. 2013: 21295722.

KANEKO, J.J et al. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**; 6 ed, 2008.

MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**. v168. p28-40. 2004. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158206>>. Acesso 18.jun.2013. PMID: 15158206.

PETERSEN, H.H. et al. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry; **Veterinary Research**; v35, p.163-187.2004.Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099494>>. Acesso 18 jun.2013. PMID: 15099494

PRINSEN, B.H.C.M, VELDEN, S.V.M Albumin turnover: experimental approach an its application in health and renal diseases.**Clinical. Chemistry. Acta** v347, p 1-14, 2004. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313137>>. Acesso 18jun.2013. PMID: 15313137.

RADAK, Z. et al. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 153-159, 1995. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191751>>. Acesso em 18 jun.2013. PMID:18191751.

ROGERO M.M. et al. Aspectos Neuroendócrinos e Nutricionais em Atletas com Overtraining. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica** vol 49 nº 3 p 359-368; Junho 2005.Disponívelem:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s000427302005000300006&script=sci_arttext>. Acesso em 05 jun.2013. ISSN 0004-2730.

ROSA, L.F.P.B.C; VAINSBERG, M.W. Influência no exercício na resposta imune.**Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v8, n34, p197-172, 2002.Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v8n4/v8n4a06.pdf>>. Acesso 25 abr.2013.

SCHENEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira da Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, 2004. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>>. Acesso em 19 jun.2013. ISSN 1517-8692.

SMITH LL. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **Journal Strength Cond Research** v18. p185-186; 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14971991>>, Acesso 10 jun.2013. PMID: 14971991

SMITH LL Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress **Medicine Science Sports Exercises**; v32; p 317-331. 2000. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694113>>. Acesso 18 jun.2013. PMID:10694113

SNOW, D.H. Post-race, blood biochemistry in Thoroughbreds. **Equine Exercise Physiology**, p 389-399. 1983.

STOCKHAM, S.L; SCOTT, M.A. **Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária**.Ed GuanabaraKoogan, Segunda Edição. 2011.

WEISER,G. Interpretation of leucocyte responses in disease. In: THRALL, M.A; WEISER, G; ALLISON, R;. CAMPBELL, T.W. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2ed, p 135-148, 2004.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, (Unesp-Botucatu) Departamento de Clínica Veterinária.

10. Normas de envio do trabalho para revista científica



Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e

Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York: John Wiley, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:
O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:
COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:
Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:
MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.avis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes: Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

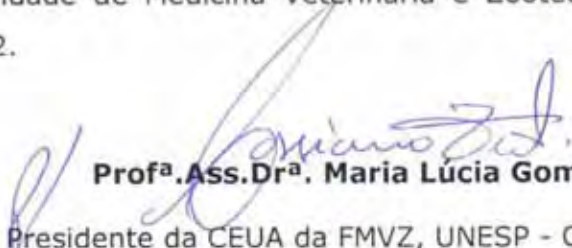
15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto **"Avaliação das proteínas de fase aguda haptoglobina e amiloide sérico-A em equinos das raças árabes e crioula submetidos a exercícios aneróbico e aeróbico em esteira e suplementados com vitamina E (DL-Alfa-Tocoferol)"** Protocolo nº 62/2012-CEUA, de **Pedrita Carvalho Ferreira Assunção**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 13 de abril de 2012.



Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu