

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

**PERFIL DE CITOCINAS SÉRICAS E TERMOGRAFIA EM
EQUINOS QUARTO DE MILHA SUBMETIDOS À PROVA
DE LAÇO EM DUPLA**

Bianca Gerardi
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2016

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

**PERFIL DE CITOCINAS SÉRICAS E TERMOGRAFIA EM
EQUINOS QUARTO DE MILHA SUBMETIDOS À PROVA
DE LAÇO EM DUPLA**

Bianca Gerardi

Orientador: Prof. Adjunto Luiz Claudio Nogueira Mendes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

Araçatuba-SP
2016

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Gerardi, Bianca

G358p

Perfil de citocinas séricas e termografia em equinos quarto de milha submetidos à prova de laço em dupla / Bianca Gerardi.

Araçatuba: [s.n], 2016.

72f. il.; CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016.

Orientador: Prof. Adj. Luiz Cláudio Nogueira Mendes

1. Cavalos 2 .Citocinas 3. Inflamação 4. Citometria de fluxo.
5. Exercício 6. Termometria. I. T.

CDD 636.1926



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Perfil de citocinas séricas e termografia em equinos Quarto de Milha submetidos à prova de laço em dupla

AUTORA: **BIANCA GERARDI**ORIENTADOR: **LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES**

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



Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES

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



Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

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



Dra. LINA MARIA WEHRLE GOMIDE

Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP



Profa. Dra. FERNANDA BOVINO

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



Prof. Dr. JOÃO PESSOA ARAÚJO JUNIOR

Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Bociências de Botucatu - UNESP

Araçatuba, 25 de julho de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BIANCA GERARDI – Nascida em quinze de maio de 1984 na cidade de São Paulo-SP, é Médica Veterinária graduada pela Universidade Federal de Lavras-MG em 2007. Ingressou no Programa de Aprimoramento de Médico Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP, em São José do Rio Preto-SP, na área de Clínica Médica, Cirúrgica e Anestésica de Grandes Animais em fevereiro de 2008, com conclusão em janeiro de 2010. Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, sob a orientação do Prof. Adjunto Luiz Claudio Nogueira Mendes, concluído em junho de 2012. Desde então tem participado de pesquisas na área de Medicina Esportiva Equina, em conjunto com a equipe do Laboratório de Endotoxemia e Enfermidades de Grandes Animais (LEEGA), com auxílio financeiro da Fapesp. Atualmente é professora da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral - FAEF, de Garça-SP.

“É preciso saber que ensinar não é transferir conhecimentos, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção”.

(Paulo Freire)

*A todos os animais que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional:
Serena, Pandora, Tamborete, Mulata, Brisa, Sasha, Apollo, Charlie, Bella, Ritinha,
Natália, Tet e tantos outros. Espero poder retribuir a vocês todo o amor, carinho e
paciência que um dia a mim dedicaram.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, eu agradeço por tudo que Ele, na Sua sabedoria, me proporcionou até hoje.

Aos meus pais, Raquel e Wanderley, pelo apoio incondicional. Por acreditarem em mim sempre. Por estarem comigo e me amarem mesmo quando a distância nos impossibilitava. Pelo incentivo e força. Agradeço também aos meus irmãos Ana Paula, Vinícius e Adriano. Obrigada pelo apoio e companheirismo. Aos meus sobrinhos João Victor, Beatriz, Pedro e a mais nova e esperada integrante, Manuela, na inocência e na pureza de vocês muitas vezes me segurei nos momentos difíceis. Às minhas cunhadas Claudia e Ana Carolina, obrigada pelo apoio. Com todos vocês aprendi o real sentido do que é fazer parte de uma família.

Ao Leumas, meu grande companheiro nessa jornada. Obrigada por estar ao meu lado, por acompanhar meus passos, por me ajudar em tantos sentidos, por viajar quilômetros na mesma noite para que eu pudesse cumprir meus prazos. Obrigada por acreditar em mim, às vezes muito mais do que eu mesma. Obrigada por enxergar meu lado bom nos momentos mais turbulentos. Tenha certeza de que você tornou tudo mais suave para mim. Eu amo você!

Aos meus queridos sogro e sogra, Alzimar e Vilma, por me acolherem de braços abertos em seu lar, pelo carinho, paciência, apoio e tantos momentos de alegria.

Ao Professor Luiz Claudio, por me receber e acreditar em mim. Pela liberdade dada para a livre escolha do tema com que me identifico e pelo apoio em todos os momentos. Agradeço também por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e confiança depositada nestes seis anos de convívio e que há de se estender por muito tempo. Sob sua orientação evolui, tanto profissional quanto pessoalmente, e serei eternamente grata.

À Professora Juliana Peiró, pela disponibilidade e valiosa ajuda durante a elaboração deste trabalho. Não tenho palavras para descrever o quanto a admiro e quão grande é minha gratidão. A senhora é demais!

Aos amigos que ajudaram nas coletas, processamentos e análises: Leonardo, Priscila, Zanon, Daniela, Rafaela, Mariana, Arthur, João Pedro. Aos residentes, Eduardo, Guilherme e Natália. Vocês foram mais do que essenciais para a realização deste trabalho. Obrigada não só pela ajuda no trabalho, mais também por todos os momentos de aprendizados, descobertas e algumas falhas, afinal é errando que se aprende! Obrigada pela amizade e companheirismo.

À Professora Flávia e Professora Lina por participarem da minha qualificação e defesa e por ajudar a tornar este trabalho ainda melhor.

À Professora Fernanda Bovino, pela participação em minha defesa, pelas considerações e pela amizade.

Ao Professor João Pessoa Araújo Júnior por participar de minha banca de defesa e por suas valiosas considerações.

Ao Centro de Treinamento dos cavalos de laço por nos cederem o espaço, os animais e por serem tão prestativos. Um ótimo lugar para se trabalhar!

Agradeço imensamente à Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Araçatuba (FMVA/UNESP), pela oportunidade e acolhimento. Ao fazer parte desse ambiente, em 2010, conheci um mundo segundo e novo lar. Nesse campus cresci profissional e pessoalmente, e colhi muitos frutos. Obrigada!

Agradeço também à FAPESP pelo apoio financeiro, processo 2014/09362-5.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	04
Objetivos.....	12
Referências.....	12
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO PERFIL SÉRICO DE CITOCINAS DE EQUINOS DA RAÇA QUARTO DE MILHA SUBMETIDOS À PROVA DE LAÇO EM DUPLA.....	19
Resumo.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	22
Resultados.....	25
Discussão.....	31
Conclusão.....	38
Referências.....	38
CAPÍTULO 3 – USO DA TERMOGRAFIA PARA AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA EXTERNA DE EQUINOS DA RAÇA QUARTO DE MILHA SUBMETIDOS À PROVA DE LAÇO EM DUPLA.....	43
Resumo.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	45
Resultados.....	50
Discussão.....	55
Conclusão.....	60
Referências.....	60

PERFIL DE CITOCINAS SÉRICAS E TERMOGRAFIA EM EQUINOS QUARTO DE MILHA SUBMETIDOS À PROVA DE LAÇO EM DUPLA

RESUMO – Os objetivos do presente estudo foram verificar se existe reação inflamatória no exercício de curta duração e alta intensidade e se a mesma pode ser classificada em Th1, Th2 ou Th17. Além disso, verificar se as temperaturas corpóreas e locais se alteram com exercício este e se treinamentos distintos podem influenciar nestas alterações. Utilizaram-se 12 animais, idade entre 3 e 6 anos e peso médio de 450 kg, participantes de laço em dupla, divididos em: treino regular (GTR) e treino esporádico (GTE). O sangue coletado em tubos de 10 ml sem anticoagulante. Coletas e aferições de temperatura foram realizadas 30 minutos antes, imediatamente depois, uma, duas, seis, e 24 horas após o exercício. Utilizou-se como método de detecção das citocinas a citometria de fluxo. A concentração de IL-10, após uma hora do exercício, foi significativamente maior em GTE do que GTR. Observou-se maior concentração sérica de TNF- α , IL-6 e IL-10 entre os grupos, 24 horas após o exercício, mas sem alteração entre os momentos. A temperatura central se restabeleceu dentro de 24 horas. As temperaturas da região dos tendões em membros pélvicos e da garupa mantiveram-se elevadas. O exercício não causou nenhum tipo de resposta imune, animais condicionados, treinados esporadicamente, apresentaram resposta imune mista enquanto que animais condicionados, treinados regularmente, não apresentaram nenhum tipo de resposta imune. O mecanismo de termorregulação foi eficiente em ambos os grupos, o aumento de temperatura local após 24 horas pode ser influenciado pela temperatura ambiente ou ser sugestivo de inflamação subclínica.

Palavras-Chave: cavalos, citocinas, inflamação, citometria de fluxo, exercício, termometria.

PROFILE OF SERUM CYTOKINES AND THERMOGRAPHY IN QUARTER HORSES SUBJECTED TO TEAM ROPING

SUMMARY – The aims of this study were to verify if there is inflammation in the exercise of short duration and high intensity and whether it can be classified into Th1, Th2 or Th17. Moreover, check the body temperatures and locations change with exercise of short duration and high intensity and different training can influence these changes. 12 animals were used, 6 female and 6 males, mean age 3 to 6 years and weight ~ 450 kg. Animals were divided in two groups: regular training (GLTR) and sporadic training (GLTE). 10 mL of Blood were collected in tube without anticoagulant. Blood collections and temperatures were made 30 minutes before, immediately after, and one, two, six and 24 hours after competition. The analyses were made by flow cytometric. The serum concentration of IL-10 was significantly higher in GTE than in GTR. The serum concentrations of TNF- α , IL-6 and IL-10 were significantly higher in GTE than in GTR, 24 hours after exercise. The core temperature increased after exercise and returned to baseline after 24 hours. The temperature in the region of the hindlimbs raised immediately after exercise and did not return to baseline after 24 hours. The temperature of the croup (right side) increased immediately after exercise and remained so for more than 24 hours. The exercise did not cause any immune response, conditioned animals, trained sporadically showed mixed immune response while conditioned animals, trained regularly, did not show any immune response. The thermoregulatory mechanism was efficient in both groups, the local temperature increase after 24 hours due to room temperature or suggestive of subclinical inflammation.

Keywords: horses, cytokines, inflammation, flow cytometry, exercise, thermometry diagnosis.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

O rebanho equino nacional é o maior da América Latina e o terceiro maior rebanho mundial, com pouco mais de 5.363.185 animais (IBGE, 2013), sendo que o complexo do agronegócio equino no Brasil movimenta algo em torno de R\$7,5 bilhões por ano, gerando cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. Entre as várias atividades ligadas à cadeia do agronegócio equestre destaca-se o esporte, que movimenta valores da ordem de R\$ 705 milhões por ano e conta com a participação estimada de 50 mil equinos atletas (LIMA et al., 2006), ressaltando a importância dos cuidados com esses animais.

Humanos e cavalos estão intimamente ligados, não só por suas origens históricas e culturais, mas também porque compartilham uma aptidão natural para o desempenho atlético (DAVIS et al., 2005). A estreita relação entre humanos e equinos levou ao desenvolvimento de diversas modalidades de esportes equestres. De um modo geral, cada modalidade equestre varia em duração, velocidade, força e agilidade. Sendo assim, um tratamento diferenciado é exigido para os equinos que participam de diferentes modalidades (ARARIPE, 2010),

Atualmente, a quantificação de citocinas, termografia e expressão de RNAm estão sendo estudadas com a finalidade de detectar, precocemente, alterações locais e sistêmicas em humanos e cavalos atletas, a fim de avaliar o grau de estresse causado ao organismos, alterações clínicas e melhor treinamento (VALERA et al., 2012; LIBURT et al., 2009; DONOVAN et al., 2007; MARLIN et al., 1998).

Uma modalidade emergente dentro da citometria de fluxo é o ensaio multiplex baseado em beads, ou “BBMAs” (“Bead-based Multiplex Assays”). Esta técnica se baseia na marcação de microesferas de poliestireno marcadas por um fluoróforo, que permite a detecção e quantificação simultânea de múltiplos analitos, garantindo um alto rendimento das amostras. Esse método

se destaca pela redução do tempo e do volume amostral em comparação com outros métodos. Apesar de ser uma metodologia de grande potencial na Medicina Veterinária, está condicionada à acessibilidade a aparelhos de citometria de fluxo, desenvolvimento de anticorpos para as diversas espécies e disponibilidade de pessoal especializado para realizar as aquisições no aparelho, além de capacitação técnica dos médicos veterinários para interpretar os dados gerados pela tecnologia de citometria de fluxo (BRITO et al., 2016).

As respostas imunológicas promovidas pelo exercício, tanto de forma aguda quanto crônica, afetam diversos componentes do sistema imune. Sabe-se que exercício de intensidade moderada pode estimular parâmetros relacionados à imunidade celular e conseqüentemente diminuir o risco de infecção, enquanto o exercício de alta intensidade pode ocasionar decréscimo destes mesmos parâmetros, aumentando assim o risco de doenças infecciosas (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000).

A prática de exercício intenso e prolongado induz a elevação da concentração plasmática de citocinas, como a interleucina-6 (IL-6). Estes fatores estão hoje diretamente relacionados à diminuição da imunidade mediada por células evidenciada pós-exercício. Os linfócitos TCD4+ (auxiliares/helper-Th0) podem se diferenciar em diversas subpopulações, dentre as quais destacam-se as células Th1 (T helper tipo 1) e as células Th2 (T helper tipo 2), que produzem padrões diferentes de citocinas (DEL PRETE, 2008).

A imunidade mediada por células é potencializada após ativação da linhagem de linfócitos T-helper 1 (Th1). Esta linhagem promove comunicação e promoção da resposta imunitária, principalmente a partir da secreção de citocinas inflamatórias, tais como o interferongama (IFN- γ). A ativação dos linfócitos Th1 ocorre pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como: os macrófagos e células dendríticas (NUNES; FERNANDES, 2009). A diferenciação de linfócitos TCD4+ em Th1 pode ser estimulada pela

interleucina 12 (IL-12), produzida por células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) (DEL PRETE, 2008).

A diferenciação em Th2 é induzida por ação autócrina da IL-4, produzida por TCD4+. As células Th1 produzem predominantemente interferon-gama (IFN- γ) e estão relacionadas à resposta imune celular e ao controle de infecções causadas por microrganismos intracelulares. As células Th2 produzem principalmente IL-4 e são correlacionadas com a resposta imune humoral e controle das infecções extracelulares (DEL PRETE, 2008).

Diversas linhas de investigação mostram que a produção de IL-6 por monócitos (Lancaster e colaboradores, 2005a) e a produção de IL-2 e IFN- γ , por linfócitos T, está inibida durante e várias horas após exercício prolongado, sem modificação da produção de IL-4, a qual é característica de linfócitos T-helper 2 (Th2) (LANCASTER et al., 2005b; LANCASTER et al., 2004; NORTHOFF et al., 1998).

As citocinas são responsáveis pela comunicação intercelular, interorgânica e intersistêmica e podem ser classificadas de acordo com sua função, isto é, pró-inflamatória ou anti-inflamatória. Citocinas pró-inflamatórias induzem o aumento do processo inflamatório, como por exemplo: interleucina 1- beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon (IFN), interleucina 2 (IL-2) e quimiocinas. Já as citocinas anti-inflamatórias caracterizam-se pela diminuição do processo inflamatório, regulando a inflamação pela restrição de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas destacando-se: IL-4, IL-10, IL-13, assim como o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) (SMITH, 2000). Alguns autores classificam a IL-6 como pró e anti-inflamatório (FISCHER, 2006).

Diferentes citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, interferon-gama (INF- γ) e IL-10, são responsáveis por detectar alterações fisiológicas, tanto locais quanto sistêmicas. A resposta inflamatória desregulada pode ser resultado de uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias ou de sua produção num contexto biológico errado (HAN; ULEVITCH, 2005). Diversos fatores, como

modalidade, intensidade e duração do exercício, influenciam na resposta inflamatória (BRENNER et al., 1999).

Citocinas pró-inflamatórias, como as interleucina (IL) IL- β e IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), são induzidas pelo exercício (CUZZOCREA; REITER, 2001; SUZUKI et al., 2002). A expressão de RNAm desses mediadores inflamatórios, ou até mesmo sua produção sérica pós exercício, podem estar relacionadas a uma simples dor muscular ou a casos mais graves de lesão de tecidos moles, articulares ou ósseos. Dependendo do grau de comprometimento, o animal pode apresentar desde queda de desempenho até incapacidade permanente de praticar o esporte (NIEMAN et al., 2005; AUER, 1989).

Interleucina 1 β e fator de necrose tumoral α são consideradas como as principais citocinas pró-inflamatórias, conhecidas como "citocinas alarme". São produzidas por monócitos, neutrófilos, células endoteliais, células musculares lisas e esqueléticas. São estimuladas por processos relacionados diretamente com a lesão tecidual, como, por exemplo, alguns mediadores químicos intramusculares, como a histamina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006; SMITH, 2000). A interação destas citocinas com seus receptores no hipotálamo estimula o aumento na síntese de prostaglandinas, além de induzir alterações comportamentais, como redução do apetite e da sede e queda da libido. São responsáveis por induzirem a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e núcleo simpático, causando a elevação de cortisol e catecolaminas no plasma (SMITH, 2004; SMITH, 2000).

No fígado, ao interagir com seus receptores, a IL-1 β e TNF- α estimulam a síntese das proteínas de fase aguda. Além do mais, são responsáveis pelo aumento da produção de IL-6 por monócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos e células da musculatura esquelética (ABBAS, 2012).

O INF- γ é produzido pelas células T (CD8 e Th1) e NK. Age nas células B e T, NK e nos macrófagos. Nos macrófagos promove a ativação clássica (funções microbidas aumentadas); nas células B promove mudança de isotipo

para subclasses IgG opsonizantes e fixadoras do complemento; nas células T promove diferenciação de Th1; em diversas células aumenta a expressão de moléculas MHC classe I e II, aumento do processamento de antígenos e da apresentação destes às células T; é a citocina detectada mais cedo no local da imunização com antígenos proteicos. Inibe respostas Th2 (ABBAS, 2012; TIZARD, 1998).

As principais atividades da IL-6 consistem em exercer efeito sinérgico com a IL-1 e TNF- α para promover a ativação das células T pelas células apresentadoras de antígenos; em induzir a resposta de fase aguda; em intensificar a replicação e a diferenciação das células B e aumentar a produção de imunoglobulinas e em promover hematopoese e trombopoese (OPPENHEIM; RUSCETTI, 2004).

Além de exercer a função de citocina inflamatória, a interleucina 6 é considerada também como uma citocina anti-inflamatória, pois age como moduladora do processo inflamatório. De acordo com Petersen e Pedersen (2006), a IL-6 exerce efeito anti-inflamatório pela indução da liberação de receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) e IL-10, além dos efeitos inibitórios sobre a produção e secreção de TNF- α (PEDERSEN, 2007; FISCHER, 2006).

Pesquisas recentes mostraram que essa citocina é produzida em concentrações mais elevadas pelo tecido muscular estriado esquelético (LIBURT et al., 2010), leucócitos e células endoteliais via sinalização das citocinas pró-inflamatórias, sendo que sua secreção está relacionada à intensidade, duração e quantidade de massa muscular envolvida no exercício físico (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

A IL-6 já foi chamada de fator exercício ou miocina, por sua estreita relação com alterações musculares no pós-exercício. Essa citocina modula a função das células imunes em resposta ao exercício e treinamento (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

A IL-2 é um fator de crescimento autócrino e parácrino secretado por linfócitos T ativados, sendo essencial para a proliferação clonal das células T. Age através dos receptores IL-2R α , IL-2R β e IL-2R γ , usando a via intracelular

JAK/STAT para estimular o crescimento e a proliferação de linfócitos-T e células-B. Além disso, induz a produção de outras citocinas como IFN γ e FNT β , o que resulta na ativação de monócitos, neutrófilos e células NK. Desse modo, fica evidente que a IL-2 contribui para a geração e a propagação de respostas imunológicas específicas do antígeno. Devido ao fato de sua meia-vida plasmática ser inferior a 10 minutos, a IL-2 normalmente não é detectada em lesões agudas (RAEBURN et al., 2002; CURFS et al., 1997).

A IL-4 é produzida por linfócitos T, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Age sobre os linfócitos T e B, células NK, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais, usando a via JAK/STAT. Promove a diferenciação de linfócitos B para produzir IgG e IgE. Além disso, ao atuar sobre macrófagos ativados, inibe os efeitos de IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 e ainda reduz a produção de radicais livres de oxigênio (SOMMER; WHITE, 2010).

A IL-10 é sintetizada em células imunológicas (macrófagos e células T) e também em tecidos neuroendócrino e neural. Sua produção é prejudicada por citocinas como IL-4, IL-13 e INF- γ , e também pela sua própria autorregulação. Tem por função inibir citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6 e promove a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de INF- γ pelas células NK (ZHANG; AN, 2007).

A IL-17A é pró-inflamatória, produzida por células T-CD4 e outras; aumenta a produção de quimiocinas (IL-6 e IL-8) nas células endoteliais; nos macrófagos aumenta a produção de quimiocinas e citocinas, promovendo também o aumento de defensinas GM-CSF e G-CSF (ABBAS, 2012).

O exercício físico induz a inflamação, processo o qual ocorre para promover o reparo tecidual e remodelamento pós-trauma. A sua ação pode ser local e/ou sistêmica e, para que isso ocorra, é necessária a participação de diversas células e componentes por elas secretados. O objetivo é restabelecer a homeostase orgânica após uma única sessão de exercício ou após diversas sessões. A resposta de fase aguda consiste de ações integradas entre leucócitos, citocinas, proteínas de fase aguda, hormônios e outras moléculas

sinalizadoras que controlam a resposta, tanto a uma sessão de exercícios como também direcionam as adaptações decorrentes do treinamento (SILVA; MACEDO, 2011).

A claudicação em equinos atletas, além de ser a maior causa de queda de desempenho nestes animais, é a causadora de perdas econômicas consideráveis para os criadores (WILSHER et al., 2006). Embora as causas de claudicação sejam diversas, a função dos mediadores inflamatórios nesse processo tem chamado à atenção dos pesquisadores (LEY et al., 2007; LEY et al., 2009).

Conforme Carvalho e Mara (2010), durante um esforço físico aproximadamente 20% da energia transformam-se em energia mecânica responsável pelo movimento e o restante transforma-se em energia térmica, que se acumula durante o exercício e eleva a temperatura corpórea.

A termometria cutânea por imagem infravermelha é o método mais eficiente para o estudo da distribuição da temperatura cutânea atualmente. Considerada uma técnica não invasiva, sem contraste e totalmente indolor, surgiu na década de 60 e foi aprimorada nos anos 90 com a introdução dos atuais sensores infravermelhos. O diagnóstico de anormalidades neurológicas, musculoesquelética ou de outros tecidos por meio das imagens termográficas é baseado na comparação entre diferentes temperaturas de tecidos considerados saudáveis e dos doentes. Alteração de temperatura que esteja fora do padrão normal para a região avaliada é considerada um sinal de anormalidade funcional da área, como uma desordem vascular (NG; FOK, 2003).

Como a temperatura local representa o metabolismo e circulação local, alterações anormais de seus valores podem significar um processo inflamatório. O uso da termografia para diagnosticar doenças em equinos não é um conceito novo (WEBBON, 1978; TURNER, 1991; BERTONE et al., 1992; MARR, 1992). Doenças clínicas, como laminite, síndrome do navicular, abscesso de sola e inflamação generalizada de casco foram reconhecidas e caracterizadas pela termografia há algum tempo (TURNER, 1991).

Trata-se de uma ferramenta capaz de evidenciar afecções com quaisquer tipos de alteração de perfusão sanguínea, tais como inflamações, tumores, fibroses, neuropatias ou isquemias. Permite o diagnóstico de problemas relacionados a tendões, ligamentos, articulações, músculos e ossos, desde que os últimos sejam cobertos por fina musculatura (CETINKAYA; DEMIRUTKU, 2012).

A característica essencial da termografia na detecção dessas doenças baseia-se na ocorrência de uma inflamação. A inflamação, por sua vez, está associada com a elevação de temperatura devido ao aumento da circulação local, resultado da ação de citocinas, que não só promovem maior circulação da área pelo aumento de permeabilidade vascular, mas também recrutam células inflamatórias locais que, futuramente, amplificam a resposta inflamatória (VAN HOOGMOED et al., 2000).

Normalmente a temperatura da pele é 5°C menor do que a corpórea, que oscila entre 37,5°C e 38°C no equino (TURNER, 1996). Se houver 1°C de diferença entre duas regiões anatomicamente simétricas é um indicativo de inflamação nessa região. É possível diagnosticar alterações nas regiões acometidas previamente, antes mesmo que haja manifestação clínica, sendo assim a termografia pode ser utilizada para detectar problemas subclínicos (HEAD; DYSON, 2001).

Caso haja uma inflamação associada com a musculatura, ela pode ser vista pela termografia como uma mancha avermelhada ao redor do músculo afetado. Quando há comprometimento do fluxo sanguíneo em determinada região muscular devido à presença de um edema, a imagem obtida pelo termógrafo na região acometida é azulada. A avaliação termográfica do músculo pode ser feita comparando-se as mesmas regiões anatômicas em lados opostos. Em uma situação normal, as imagens devem ser quase que idênticas. Alterações significativas nessas regiões podem indicar danos musculares (YANMAZ et al., 2007).

Objetivos:

- I. Verificar se existe reação inflamatória no exercício de curta duração e alta intensidade e se a mesma pode ser classificada em Th1, Th2 ou Th17.
- II. Verificar se as temperaturas corpóreas e locais se alteram com exercício de curta duração e alta intensidade e se treinamentos distintos podem influenciar nestas alterações.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7.ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2012, 552p.

ARARIPE, M.G.A. **Detecção sorológica do Herpesvírus Equídeo (EHV-1 / EHV-4) e parâmetros hematológicos e bioquímicos de equinos utilizados em vaquejada**. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, CE. 77p. 2010.

AUER, D.E. An hypothesis on the etio-pathogenesis of equine inflammatory joint disease. **Vet. Clin. Pathol.**, v.18, p. 21-26, 1989.

BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Ver Biochem.**, v. 75, p. 19-37, 2006.

BERTONE, A.L.; DAVIS, D.M.; COX, H.U.; KAMERLING, S.S.; ROBERTS, E.D.; CAPRILE, K.A.; GOSSETT, K.A. Arthrotomy versus arthroscopy and partial synovectomy for treatment of experimentally induced infectious arthritis in horses. **Am. J. Vet Res.**, v. 53, n. 4, p. 585- 591, 1992.

BRENNER, I.; NATALE, V.; VASILIOU, P.; MOLDOVEANU, A.; SHEK, P.; SHEPHARD, R. Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. **European Journal of Applied Physiology.**, v. 80, p. 452-460, 1999.

BRITO, H.C.D.; ANAI, L.A.; SANTANA, A.E. O uso do ensaio multiplex baseados em bead na medicina veterinária. **Investigação**, v. 15, n. 4, p. 12-18, 2016.

CARVALHO, T.; MARA, L.S. Hidratação e nutrição no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 2, p. 33-40, 2010.

CETINKAYA, M.A.; DEMIRUTKU, A. Thermography in the assessment of equine lameness. **Turk J. Vet. Anim. Sci.**, v. 36, n. 1, p. 43-48, 2012.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 10, p. 742-780, 1997.

CUZZOCREA, S.; REITER, R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 426, p. 01-10, 2001.

DAVIS, M.S.; MALAYER, J.R.; VANDEVENTER, L.; ROYER, C.M.; MCKENZIE, E.C.; WILLIAMSON, K.K. Cold weather exercise and airway cytokine expression. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p. 2132-2136, 2005.

DEL PRETE, G. The complexity of the CD4 T-cell responses: old and new T-cell subsets. **Parassitologia**, v. 50, p. 9-16, 2008.

DONOVAN, D.C.; JACKSON, C.A.; COLAHAN, P.T.; NORTON, N.; HURLEY, D.J. Exercise-induced alterations in pro-inflammatory cytokines and prostaglandin F2alpha in horses. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 118, p. 263-269, 2007.

FISCHER, C.P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? **Exerc. Immunol. Rev.**, v. 12, p. 06-33, 2006.

HAN, J.; ULEVITCH, R. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity – a review. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1198-1205. 2005.

HEAD, M.J.; DYSON, S. Talking the temperature of equine thermography. **Comment on Vet. J.**, v. 162, n. 3, p. 172-181, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2013. v. 41, p.1-108.

LANCASTER, G.I.; KHAN, Q.; DRYSDALE, P.T.; WALLACE, F.; JEUKENDRUP, A.E.; DRAYSON, M.T.; GLEESON, M. Effect of prolonged strenuous exercise and carbohydrate ingestion on type 1 and type 2 T lymphocyte distribution and intracellular cytokine production in humans. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p.565-571, 2005b.

LANCASTER, G.I.; HALSON, S.L.; KHAN, Q.; DRYSDALE, P.; JEUKENDRUP, A.E.; DRAYSON, M.T.; GLEESON, M. The effects of acute exhaustive exercise and intensified training on type 1/type 2 T cell distribution and cytokine production. **Exerc. Immunol. Ver.**, v. 10, p. 91-106, 2004.

LANCASTER, G.I.; KHAN, Q.; DRYSDALE, P.; WALLACE, F.; JEUKENDRUP, A.E.; DRAYSON, M.T.; GLEESON, M. The physiological regulation of toll-like

receptor expression and function in humans. **J. Physiol.**, v. 563, n. 3, p. 945-955. 2005a.

LEY, C.; EKMAN, S.; RONEUS, B.; ELORANTA, M.L. Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis. **Res. Vet. Sci.**, v. 86, p. 490-497, 2009.

LEY, C.; EKMAN, S.; ELMEN, A.; NILSSON, G.; ELORANTA, M.L. Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v. 54, p. 346-351, 2007.

LIBURT, N.R.; MCKEEVER, K.H.; STRELTSOVA, J.M.; FRANKE, W.C.; GORDON, M.E.; FILHO, H.C.M.; HOROHOV, D.W.; ROSEN, R.T.; HO, C.T.; SINGH, A.P.; VORSA, N. Effects of ginger and cranberry extracts on the physiological response to exercise and markers of inflammation in horses. **Comparative exercise Physiology**, v. 6, p. 157-169, 2009.

LIBURT, N.R.; ADAMS, A.A.; BETANCOURT, A.; HOROHOV, D.W.; MCKEEVER, K.H. Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. **Equine Vet. J.**, v. 42, p. 280-288, 2010.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: ESALQ/USP. 2006. 250p.

MARLIN, D.J.; SCOTT, C.M.; ROBERTS, C.A.; CASAS, I.; HOLAH, G.; SCHROTER, R.C. Post exercise changes in comparative body temperature accompanying intermitente cold watwr cooling in the hyperthermic horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 1, p. 28-34, 1998.

MARR, C. Microwave thermography: a non-invasive technique for investigation of injury of the superficial digital flexor tendon in the horse. **Equine Vet. J.**, v. 30, p. 28-34, 1992.

NG, E.Y.; FOK, SC. A framework for early discovery of breast tumor using thermography with artificial neural network, **The Breast Journal**, v.9, n. 4, p. 341–343, 2003.

NIEMAN, D.C.; DUMKE, C.L.; HENSON, D.A.; MCANULTY, S.R.; GROSS, S.J.; LIND, R.H. Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160 km race. **Brain Behav Immun**, v. 19, p. 398-403, 2005.

NORTHOFF, H.; BERG, A.; WEINSTOCK, C. Similarities and differences of the immune response to exercise and trauma: the IFN- γ concept. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 76, p. 497-504, 1998.

NUNES, E.; FERNANDES, L.C. Exercício agudo versus imunossupressão: talvez apenas outro mecanismo homeostático. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v.3, n.15, p. 312-324, 2009.

OPPENHEIM, J.J.; RUSCETTI, F.W. Citocinas. In: **Imunologia Médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 127-143, 2004.

PERDESEN, B.K. IL-6 signalling in exercise and disease. **Biochem. Soc. Trans.** v. 35, p. 1295-1297, 2007.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol. Ver.**, v. 80, p. 1055-1081, 2000.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p. 1154-1162, 2005.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 57, p. 43-51, 2006.

RAEBURN, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A.; ARYA, J.; HARKEN, A.H. Cytokines for surgeons. **Am. J. Surg.**, v. 183, p. 268-273, 2002.

SILVA, F.O.C.; MACEDO, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, v. 13, p. 320-328, 2011.

SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 32, p. 317-331, 2000.

SMITH, L.L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **J. Strength Cond. Res.**, v. 18, p. 185-193, 2004.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain. In: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; DICKENSON, A.H. – **Pharmacology of Pain**. 1.ed. Seattle, WA: IASP Press, p. 279-302, 2010.

SUZUKI, K.; NAKAJI, S.; YAMADA, M.; TOTSUKA, M.; SATO, K.; SUGAWARA, K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. **Cytokinekinetics. Exerc. Immunol. Rev.**, v.8, p. 6-48, 2002.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 5.ed. São Paulo: Roca. 545p. 1998.

TURNER, T.A. Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. **Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.**, v. 7, p. 311-338, 1991.

TURNER, T.A. Uses and limitations of thermography. **Pferdeheilkunde**, v.12, n.4, p. 684-685, 1996.

VALERA, M.D.; BARTOLOMÉ, E.; SANCHEZ, M.J.; MOLINA, A.; COOK, N.; SCHAEFER, A. Changes in Eye Temperature and Stress Assessment in Horses During Show Jumping Competitions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 827-830, 2012.

VAN HOOGMOED, L.; SNYDER, J.R.; ALLEN, A.K.; WALDSMITH, J.D. Use of infrared thermography to detect performance-enhancing techniques in horses. **Equine Vet. Educ.**, v.12, n. 2, p. 102-107, 2000.

WEBBON, P.M. Limb skin thermometry in racehorses. **Equine Vet. J.**, v. 10, p. 180-184, 1978.

WILSHER, S.; ALLEN, W.R.; WOOD, J.L. Factors associated with failure of thoroughbred horses to train and race. **Equine Vet. J.**, v. 38, p. 113-118, 2006.

YANMAZ, L.E.; OKUMUS, Z.; DOGAN, E. Instrumentation of thermography and its Applications in Horses. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 7, p. 858-862, 2007.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v. 45, p. 27-37, 2007.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO PERFIL SÉRICO DE CITOCINAS EM EQUINOS DA RAÇA QUARTO DE MILHA SUBMETIDOS À PROVA DE LAÇO EM DUPLA

RESUMO – O objetivo do presente estudo foi verificar se existe reação inflamatória, em equinos Quarto de Milha submetidos a exercícios de curta duração e alta intensidade e se a mesma pode ser classificada em Th1, Th2 ou Th17. Foram utilizados 12 animais da raça Quarto de Milha, machos e fêmeas, com idade entre 3 e 6 anos e peso de 450 kg, participantes da categoria laço em dupla, divididos em dois grupos: treino regular (GTR) e treino esporádico (GTE). As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 10 ml sem anticoagulante. As coletas foram realizadas 30 minutos antes, imediatamente depois, uma, duas, seis e 24 horas após a simulação de competição. Os níveis de citocinas séricas foram mensurados por meio da citometria de fluxo (método Cytometric Bead Array). Em relação à IL-10, sua concentração, após uma hora do exercício, foi significativamente maior no GTE quando comparado com o GTR. Além disso, observou-se um aumento significativo das concentrações séricas de TNF- α , IL-6 e IL-10 entre os grupos 24 horas depois do exercício, mas sem alteração entre momentos. O exercício não causou nenhum tipo de resposta imune. Animais condicionados, treinados esporadicamente, apresentaram resposta imune mista enquanto que animais condicionados, treinados regularmente, não apresentaram nenhum tipo de resposta imune.

Palavras-Chave: equinos, citocinas, resposta inflamatória, citometria de fluxo, exercício.

Introdução

O complexo do agronegócio movimentava bilhões de reais por ano, por meio da venda de animais e acessórios e da geração de empregos diretos e indiretos (LIMA et al., 2006). Os animais da raça Quarto de Milha são os mais utilizados nas provas classificadas como “western”, que incluem apartação, cinco tambores, laço de bezerro, laço em dupla, rédeas, maneabilidade, três tambores, western pleasure, vaquejada e laço comprido, sendo o número de cavalos registrados em torno de 402 mil (COELHO et al., 2011).

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas produzidas por diferentes tipos celulares em diversos tecidos. Elas medem as interações celulares e regulam a diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunes por meio da ativação de outras citocinas, as quais podem aumentar (pró-inflamatórias) ou diminuir (anti-inflamatórias) a resposta imunológica. As citocinas são importantes biomarcadores para condições inflamatórias e potencial diagnóstico de doenças (HALL et al., 2015).

O primeiro estudo que sugeriu a liberação de citocinas em resposta ao exercício físico foi descrito em 1983 por Cannon e Kluger. Em humanos é descrito que a atividade física pode induzir uma resposta inflamatória através de aumentos nos níveis séricos de IL-1, TNF- α e IL-6, seguidos pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, além de IL-1ra, sTNF-r2, que são inibidores das citocinas pró-inflamatórias. O tipo, duração e intensidade do exercício são fatores primordiais para o perfil de resposta das citocinas pós-exercício. Um exemplo disto é a liberação de IL-1, que parece ser mais sensível à intensidade do exercício, enquanto que a TNF- α e IL-6 são mais sensíveis à duração do exercício (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

As citocinas podem ser quantificadas em uma variedade de fluidos corporais, sendo o soro e o plasma os mais pesquisados. Para uma análise do sistema imune é mais interessante avaliar uma diversidade de citocinas, levando em consideração a combinação de seus efeitos e suas funções do que

analisá-las individualmente (JAGER et al., 2003). As pesquisas atuais usam rotineiramente como método de avaliação o ELISA, mensurando as citocinas individualmente. Também é usado o PCR em tempo real, porém neste método as modificações transcricionais e traducionais causam uma correlação imperfeita entre mRNA e síntese de proteína verdadeira (STORDEUR et al., 2003).

A citometria de fluxo é considerada uma das formas mais promissoras para a quantificação de citocinas. Em cavalos, poucos estudos foram realizados pela falta de anticorpos para a espécie, porém Wagner e Freer (2009) validaram o primeiro ensaio multiplex para a dosagem das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- α . O ensaio multiplex para a detecção de citocinas em equinos provou ser uma alternativa rápida e com boa relação entre custo e benefício (WAGNER; FREER, 2009; SCHNABEL et al., 2013).

Diversos trabalhos abordam a complexidade da fisiologia do exercício e o processo inflamatório por ele gerado, porém a maioria dos trabalhos relata a ocorrência apenas em animais submetidos a exercícios de longa duração, como o enduro, ou simulações em esteiras (HINES et al., 1994; LIBURT et al., 2010; DONOVAN et al., 2007). Além disso, este é o primeiro trabalho a quantificar citocinas séricas, por meio da citometria de fluxo, nos equinos da raça Quarto de milha submetidos à prova de laço.

Em razão da escassez de estudos, tanto dos que utilizam a citometria de fluxo como método de avaliação da concentração sérica de citocinas em equinos, como também sobre a influência de exercícios de curta duração e alta intensidade sobre o processo inflamatório por eles gerado e, ainda, da importância do treinamento para o desempenho atlético dos animais competidores da modalidade laço em dupla, o presente estudo tem por objetivo verificar se existe reação inflamatória em equinos Quarto de Milha, submetidos a exercício de curta duração e alta intensidade e se a mesma pode ser classificada em Th1, Th2 ou Th17.

Material e Métodos

Foram utilizados 12 animais da raça Quarto de Milha, de ambos os sexos e peso médio de 450 kg, clinicamente saudáveis e participantes da categoria laço em dupla. Todos os animais eram treinados profissionalmente, sendo que os integrantes do grupo treino regular eram treinados todos os dias da semana com dois dias de repouso e os do grupo esporádico eram animais afastados das competições, porém retornando a elas, com treinos de um a dois dias por semana. Todos os animais foram submetidos a uma série de exercícios semelhantes, de mesma intensidade e duração, porém com frequências diferentes. Os equinos foram divididos em dois grupos de acordo com treinamento: treino regular, (GTR – cinco dias por semana), idade média de 3,8 anos ($\pm 0,83$), e treino esporádico (GTE – um a dois dias por semana) e idade média de 6 anos ($\pm 1,3$). As coletas foram realizadas em uma propriedade na região comercial de Araçatuba-SP, onde os animais permaneceram alojados em baias individuais, recebendo feno de *Tifton* e ração comercial peletizada, duas vezes ao dia, além de sal mineral uma vez ao dia e água à vontade. Os equinos foram submetidos a repouso de, no mínimo, 24 horas antes do início do experimento.

As simulações de prova foram feitas no período da manhã, em dois dias diferentes, em pista coberta e de areia. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e cada cavalo participou uma única vez da simulação, a qual consistia na representação das provas oficiais, nas quais uma dupla de cavaleiros laça um bezerro, sendo um dos cavaleiros responsável em laçar a cabeça e o outro responsável em laçar os pés. O tempo da prova é, em média, de oito a 10 segundos, iniciando no momento em que os laçadores saem do boxe até o momento em que os dois cavaleiros laçam o bezerro, mantendo-o sobre a corda esticada e amarrada à sela do cavalo. Vence a dupla que completar a prova em menos tempo (CAIADO et al., 2011).

Todos os animais passaram por um período de aquecimento antes da prova de, aproximadamente, 20 minutos, divididos em cinco minutos de exercício ao passo, 10 minutos ao trote e cinco minutos a galope, em um percurso circular de sete metros de diâmetro. Os animais foram aquecidos e conduzidos pelos mesmos cavaleiros. O presente trabalho foi devidamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP Campus Araçatuba (Protocolo nº 2012-01985).

As coletas foram realizadas 30 minutos antes, imediatamente depois, uma, duas, seis e 24 horas após a simulação de competição. Os equinos foram submetidos ao exercício de laço em dupla cinco vezes consecutivas antes da realização da segunda coleta. As amostras de sangue foram coletadas pelo sistema a vácuo, em frascos de vidro siliconizados em tubos de 10 ml sem anticoagulante. Após a coleta, foram centrifugadas a $1.000 \times g$ durante 5 minutos, obtendo-se alíquotas de 1,5 mL de soro, que foram armazenadas em microtubos previamente identificados e congeladas (-80°C) até o momento da realização das análises.

As concentrações de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (Th1); IL-4, IL-6, IL-10 (Th2) e Th17 séricas foram mensuradas pelo método BD[®] Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. Brevemente, alíquotas de 25 μL de soro, alíquotas de 25 μL dos padrões de citocinas submetidas à diluição seriada com diluente (5.000 pg/mL, 1:2 – 2.500 pg/mL, 1:4 – 1.250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL, 1:512 – 10pg/mL) e 25 μL de diluente apenas (controle negativo) foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL. Em seguida foram adicionados em cada tubo 15 μL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ , com subsequente incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação as esferas de captura foram lavadas com 500 μL de tampão de lavagem, centrifugadas a $200 \times g$ por cinco minutos a 23°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram incubadas em 20 μL de uma solução de anticorpos

monoclonais anticitocinas humanas, conjugadas com o fluorocromo PE (FL-2) por 180 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL de tampão de lavagem, centrifugadas a 200 x g por cinco minutos a 23°C e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após a centrifugação as esferas foram ressuspendidas em 250 µL de reagente F e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo. A aquisição dos dados (2500 eventos) foi realizada a 488 nm. As análises foram feitas por software específico¹ e as concentrações de citocinas foram expressa em picogramas por mililitro (pg/mL).

Para justificar a utilização do kit humano foi realizado um “blast”² (comparação de sequências de aminoácidos), onde se observou o grau de homologia entre as citocinas humanas e as da espécie equina (*Equus caballus*) assim citada: TNF-α 89% (Emsembl NC_009163.2), IL-2 73% (Emsembl NC_009145.2), IL-4 69% (Emsembl NC_009157.2), IL-6 65% (Emsembl NC_009147.2), IL-10 73% (Emsembl NC_009148.2) e IFN-γ 66% (Emsembl NC_009149.2) e IL-17 82% (Emsembl NC_009163. 2).

Os dados obtidos quanto às concentrações séricas de INF-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas para comparação entre grupos e momentos, seguidos da comparação das médias pelo teste de comparações múltiplas de Tukey no nível de significância de 5%. Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e as análises foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System)³.

¹ FCAP Array™ Software Version 3.0; BD Biosciences San Jose, CA 95131

²http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LC=blasthome

³ SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., EUA, 2014.

Resultados

A concentração sérica de IL-10 foi significativamente maior nos animais do GTE, após uma hora do exercício, do que no GTR. Além disso, observou-se aumento significativo das concentrações séricas de TNF- α , IL-6 e, novamente, de IL-10, 24 horas depois do exercício, nos animais do GTE. Em relação às concentrações séricas de INF γ , IL-2 e IL-4, estas não se alteraram entre os grupos. Quando comparados os momentos não houve diferença significativa nas concentrações séricas de nenhuma das citocinas acima citadas (Figuras 1-6). As concentrações de interleucina- 17A não foram detectadas em nenhum dos grupos.

Os gráficos representativos dos “clusters” e picos das citocinas estudadas nos grupos GTR e GTE, obtidos pela citometria de fluxo, estão representados nas figuras 7 e 8, respectivamente.

As curvas-padrão das mesmas citocinas (Anexo) estão representadas na Figura 24.

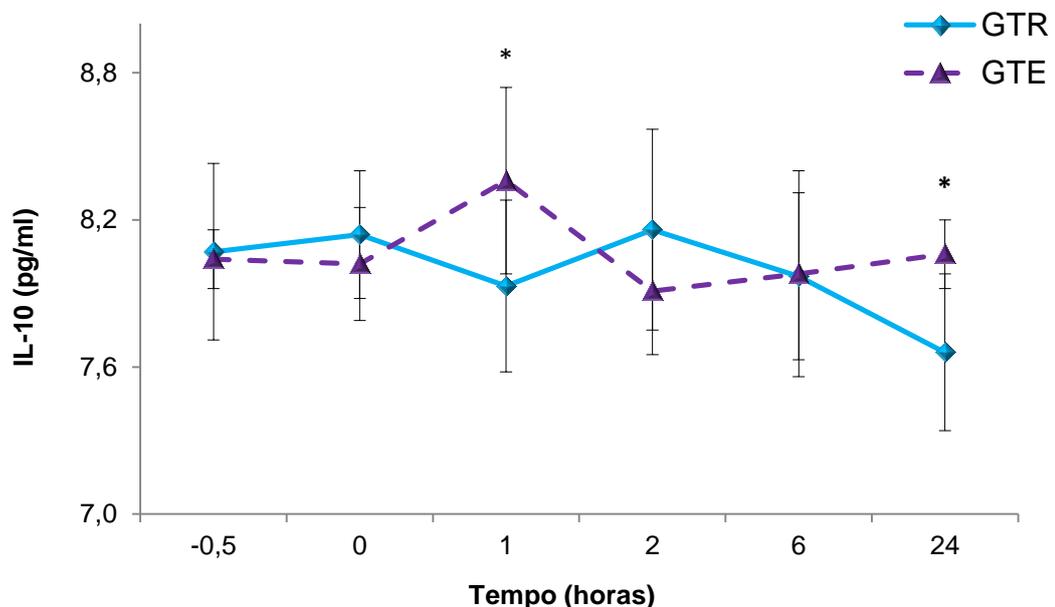


Figura 1 - Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de IL-10 de equinos da raça Quarto de Milha, praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). *Existe diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

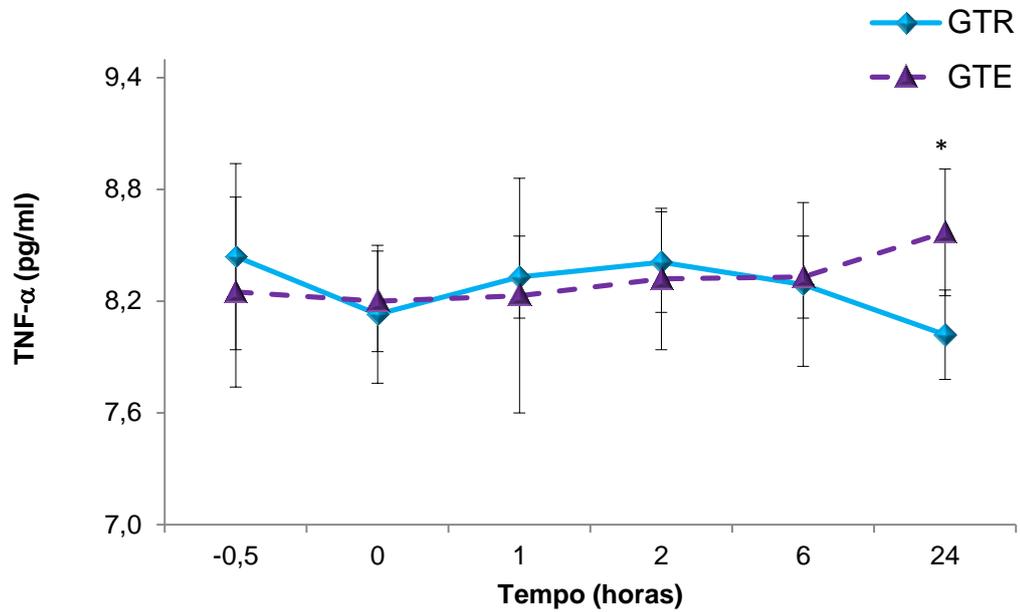


Figura 2 - Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de TNF- α de equinos da raça Quarto de Milha, praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). *Existe diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

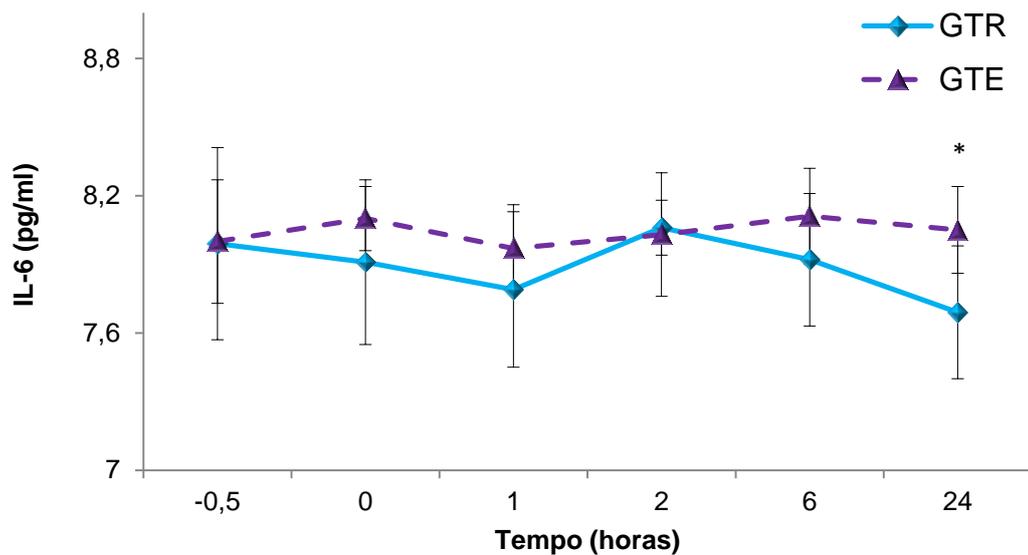


Figura 3 - Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de IL-6 de equinos da raça Quarto de Milha, praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). *Existe diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

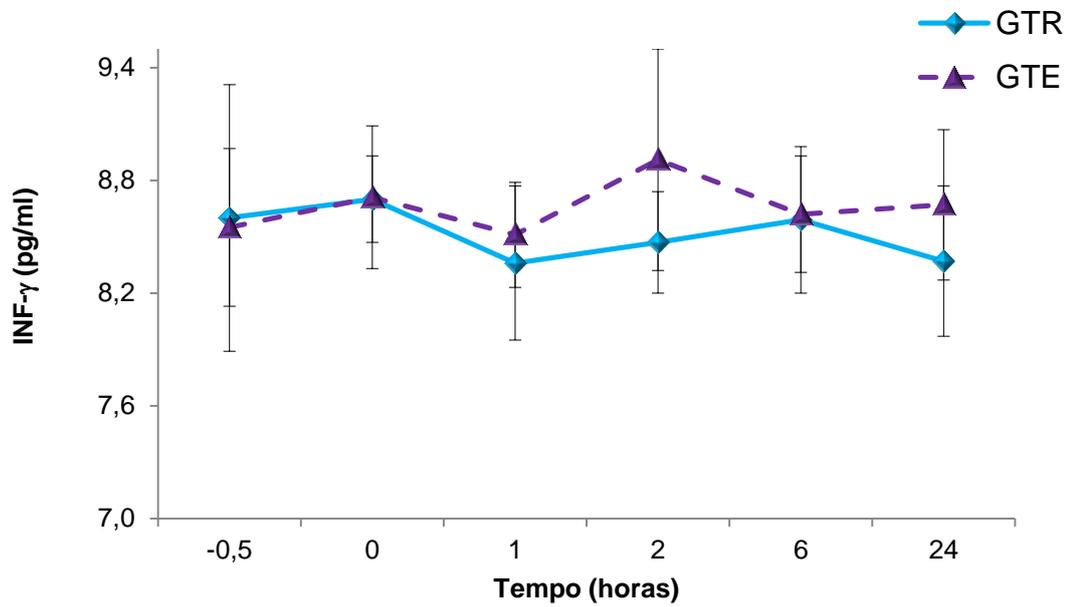


Figura 4 - Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de INF- γ de equinos da raça Quarto de Milha, praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). *Existe diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

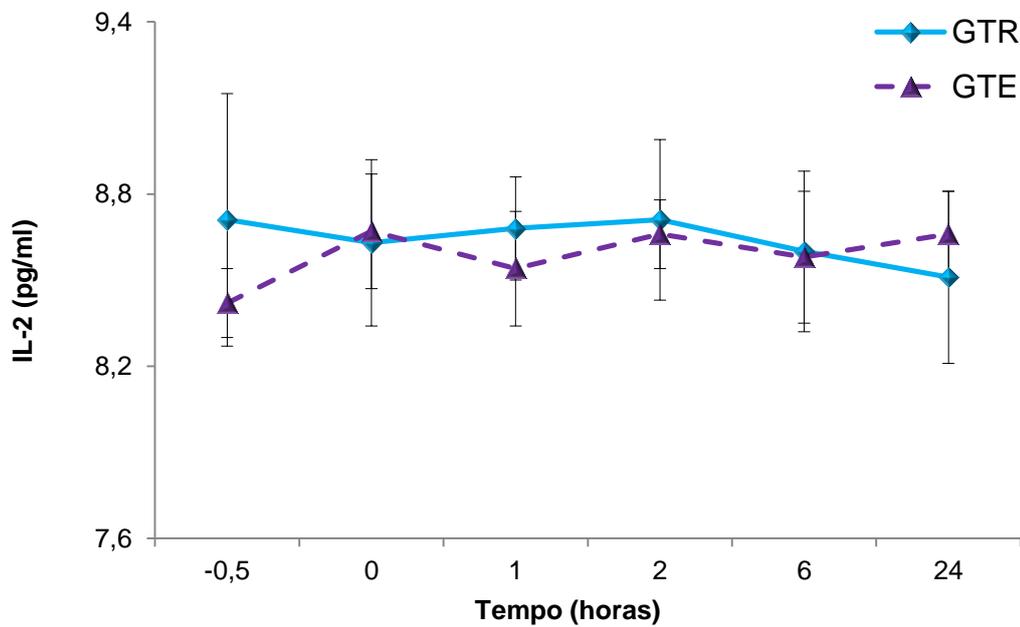


Figura 5 - Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de IL-2 de equinos da raça Quarto de Milha, praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). *Existe diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

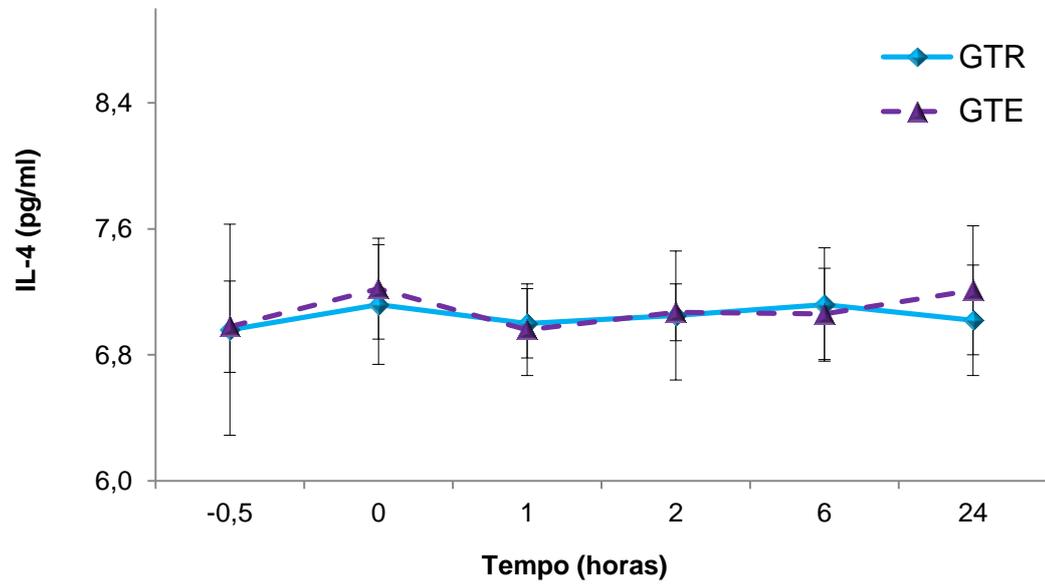


Figura 6 - Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de IL-4 de equinos da raça Quarto de Milha, praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). *Existe diferença significativa entre os os grupos ($P < 0,05$).

Grupo – Treino Regular

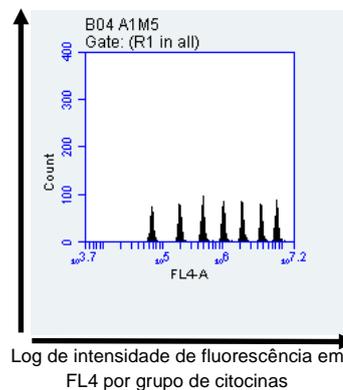
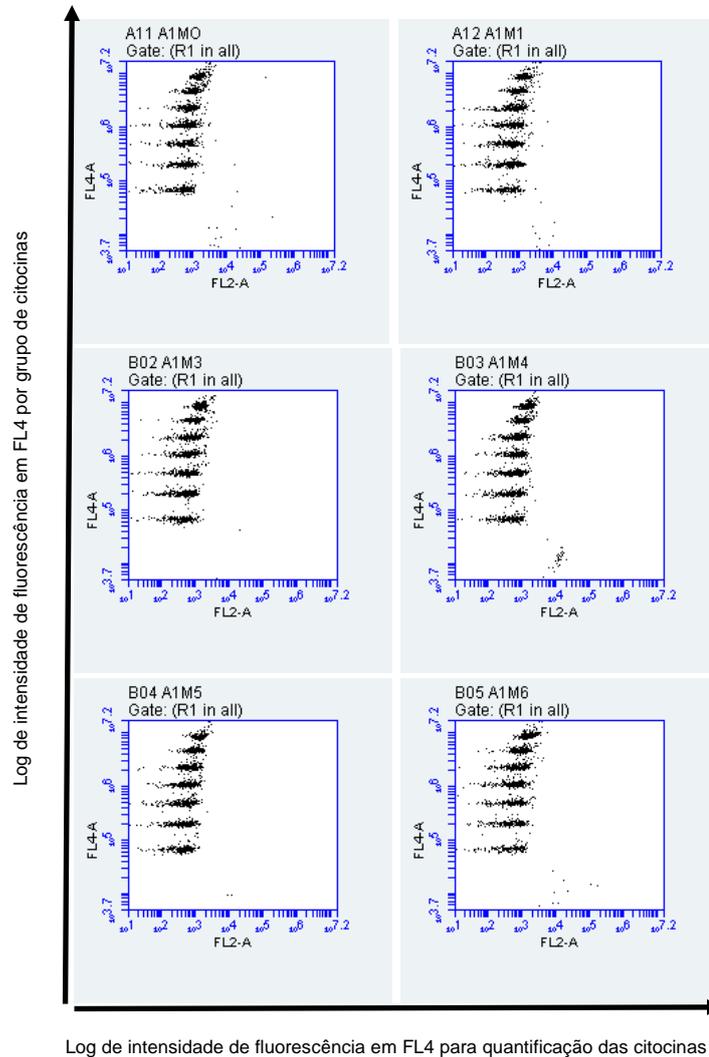
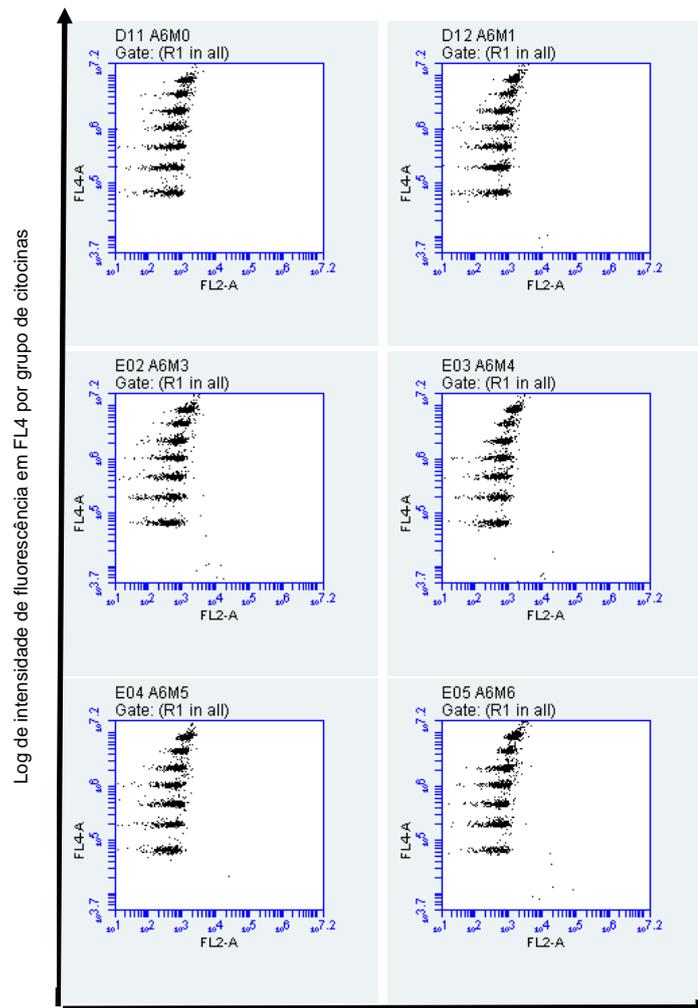
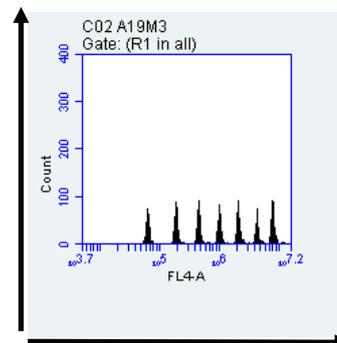


Figura 7 - Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo para cada citocina sérica (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 e IL-17A) demonstrando os deslocamentos dos “clusters” e os sete picos individuais, respectivamente, de equinos da raça Quarto de Milha participantes da prova de laço em dupla treinados regularmente (GTR).

Grupo – Treino Esporádico



Log de intensidade de fluorescência em FL4 para quantificação das citocinas



Log de intensidade de fluorescência em FL4 para quantificação das citocinas

Figura 8 - Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo para cada citocina sérica (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 e IL-17A) demonstrando os deslocamentos dos "clusters" e os sete picos individuais, respectivamente, de equinos da raça Quarto de Milha participantes da prova de laço em dupla treinados esporadicamente (GTE).

Discussão

O presente trabalho foi o primeiro a quantificar as citocinas séricas de equinos da raça Quarto de Milha praticantes da prova de laço em dupla, por meio da citometria de fluxo. Com exceção da IL-17A, todas as demais citocinas foram detectadas pelo método proposto.

A explicação para a ausência de detecção desta citocina provavelmente está relacionada com a baixa concentração sérica de IL-17A nos equinos deste experimento, já que, segundo informações do fabricante do kit, o limite de detecção da IL-17A é de, no mínimo, 18,9 pg/ml. A homologia entre as citocinas equinas e humanas não pode ser considerada um fator limitante neste caso, já que todas as citocinas apresentaram uma homologia acima de 65%. Segundo Scheerlinck (1999), a reação cruzada entre citocinas e células de espécies diferentes é mais provável quando a mesma citocina em ambas as espécies tem, pelo menos, 60% de homologia na sua composição de aminoácidos. Portanto, esse método mostrou-se eficiente para detectar concentrações séricas de citocinas em equinos atletas.

A resposta ao exercício é dividida em resposta aguda e adaptação crônica. São consideradas agudas as alterações temporárias da resposta imune causadas por uma sessão de exercício e entende-se por adaptações crônicas as modificações na resposta imune causadas por várias sessões de exercício, caracterizando um treinamento (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000). Portanto, nesta pesquisa, quando comparadas as concentrações de citocinas entre os grupos, foi avaliada a resposta imune a diferentes treinamentos. Quando comparadas as concentrações das citocinas, ao longo do tempo, foi analisada a resposta imune ao exercício, ao qual os animais foram expostos.

Quando comparadas as concentrações das citocinas entre os grupos desta pesquisa, observou-se uma maior concentração sérica de IL-10 no GTE uma hora depois do término do exercício físico. Visto que as concentrações

séricas de IL-6 e TNF- α somente se alteraram 24 horas após o exercício, sugere-se que a maior concentração de IL-10, uma hora depois do esforço físico, está relacionada com a maior concentração de IL-1 β , liberada em reposta ao exercício, nos animais do GTE. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e tem por função inibir resposta Th1 (IL-6, TNF- α e IL- β) (ABBAS, 2012).

No presente estudo observou-se que houve uma diferença significativa nas concentrações séricas de TNF- α , IL-6 e, novamente, IL-10, entre os grupos, 24 horas após o esforço físico. Os dois tipos de treinamento, aos quais os animais foram submetidos, eram compostos pela mesma intensidade, volume e duração, no entanto variaram em relação à frequência. Portanto, pode-se dizer que a frequência de treinamentos tem influência sobre a resposta inflamatória dos equinos competidores de laço em dupla.

Quando comparados os resultados, percebeu-se que os animais treinados frequentemente apresentaram uma menor concentração sérica de TNF- α , IL-6 e IL-10, 24 horas após o exercício. Provavelmente isso significa que os animais do grupo GTR têm uma capacidade de adaptação ao exercício melhor do que os do grupo GTE. Esta capacidade de adaptação está relacionada com o princípio da sobrecarga, no qual o treinamento é necessário para a melhora do desempenho físico.

Esse princípio leva em consideração que sobrecargas progressivas de esforço devem ser aplicadas durante o programa de treinamento, a fim de provocar um desequilíbrio na homeostasia celular e a consequente resposta ao estresse. A manipulação dessa sobrecarga pode ser realizada por diversas variáveis, dentre elas a frequência dos exercícios (TOIGO; BOUTELLIER, 2006). Portanto, pode-se dizer que, assim como em humanos, a resposta adaptativa pode ser avaliada por meio da quantificação de citocinas, as quais possivelmente desempenham um papel importante na adaptação ao treinamento regular (GOKHALE et al., 2007)

Como os animais do GTR são treinados com maior frequência, eles desenvolveram uma capacidade de adaptação maior que no grupo GTE.

Certamente as diferenças seriam maiores se os animais do grupo GTE não fossem treinados pelo menos duas vezes por semana ou estivessem em repouso. O condicionamento físico não ocorre se as cargas forem sempre iguais ou se forem aplicadas em intervalos longos entre si. Os intervalos prolongados entre as cargas faz com que a aptidão do atleta retorne aos seus níveis iniciais (WELCH, 1993).

A maior concentração de TNF- α e IL-6 neste estudo, 24 horas após o exercício, indica que houve um estímulo que promoveu a liberação dessas citocinas inflamatórias. A maior concentração de IL-6 está relacionada diretamente com a maior concentração de TNF- α , indutor direto de IL-6. A IL-10 também tem suas concentrações elevadas no mesmo momento, isso ocorre devido à ação moduladora de IL-6. Esta citocina auxilia na regulação do processo inflamatório por meio da estimulação de citocinas anti-inflamatórias, dentre elas a IL-10 (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Apesar de haver uma diferença nas concentrações séricas de citocinas entre os grupos, os valores estão bem próximos. Isto porque os animais do GTE, apesar de terem sido afastados temporariamente, já são condicionados ao exercício e por isso a diferença entre as concentrações de citocinas séricas não são tão evidentes.

As citocinas têm um papel importante como moduladoras da inflamação causada pelo esforço físico. Este processo inflamatório ocasionado pelo treinamento é importante, pois possibilita uma resposta adaptativa dos animais ao treino. Por meio dele inicia-se a sinalização para síntese de proteínas que leva à hipertrofia muscular, aumentando assim a força e desempenho do animal. Portanto, no presente estudo, a menor concentração sérica de TNF- α no GTR indica um processo inflamatório brando que foi modulado pela IL-6 e controlado pela IL-10, que tem ação anti-inflamatória. Estes resultados contrariam os obtidos por Donovan e colaboradores (2007), os quais observaram aumento sérico de TNF- α imediatamente após o exercício físico, porém nessa situação o tipo de treinamento foi diferente do abordado no presente trabalho, variando em intensidade, duração e período de treinamento.

Os autores acima citados mantiveram os animais sob treinamento em esteira durante oito semanas, três vezes por semana, antes de serem submetidos ao esforço físico. Provavelmente a contradição entre os resultados se deve, primeiramente, à duração do exercício, tipos de exercícios e tempo de treinamento.

O exercício e os diferentes treinamentos executados neste experimento não influenciaram nas concentrações séricas de INF- γ , IL-2 e IL-4. Aparentemente, o estímulo causado pelos treinamentos não foi suficiente para desencadear uma resposta do sistema imune em relação às citocinas acima citadas. O mesmo não foi visto em estudos realizados em humanos, em treinamento, onde as concentrações de IL-2 aumentaram em atletas praticantes de exercícios de baixa e média intensidade, enquanto que exercícios de alta intensidade levaram à inibição da mesma (SMITH, 1995; NIEMAN, 1994).

No presente estudo também não houve diferenças significativas na concentração sérica das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 ao longo do tempo em nenhum dos grupos avaliados, contrariando trabalhos realizados com humanos e cavalos (DONOVAN et al., 2007; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). No entanto, estudos anteriores mostraram que o sistema imune responde diferentemente, de acordo com o tipo de exercício ao qual o atleta é exposto, e que a liberação de citocinas séricas está relacionada com microtraumas teciduais ocasionados pelo exercício físico (OSTROWSKI et al., 1998; PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000) .

Baseado na informação de que a ativação do processo inflamatório é local e sistêmica (SILVA; MACEDO, 2011) e que os microtraumas induzidos no tecido muscular conseguem sinalizar, por meio das citocinas, outros tecidos como cérebro, fígado, rins, endotélio, células imunes e sistema endócrino (SMITH, 2000), entende-se que a ausência destas alterações na concentração sérica de citocinas indica que o exercício de curta duração e alta intensidade, ao qual os animais foram submetidos, não foi suficiente para causar lesões

teciduais que levassem à liberação das citocinas pró e, conseqüentemente, anti-inflamatórias séricas.

A integridade do tecido muscular destes animais foi comprovada por meio da análise da atividade sérica de creatinina quinase (CK) e concentração de lactato, os quais foram avaliados em um estudo paralelo. Os resultados mostraram que não ocorreram aumentos significativos de CK ao longo do tempo em ambos os grupos e nem entre os grupos. Em relação ao lactato houve um aumento significativo logo após o exercício, mas retornou aos seus valores basais rapidamente em ambos os grupos, não diferindo entre si (PEREIRA, 2015), ou seja, constando que não houve lesão muscular importante. Como já descrito por Pedersen e Hoffman-Goetz (2000), e verificado pelos resultados obtidos no presente trabalho, a inflamação promovida pelo esforço físico depende se a intensidade, resistência ou duração é suficiente para causar danos celulares.

A elevação tardia de $\text{INF-}\gamma$ foi verificada em animais submetidos a provas de longa distância, como o enduro, o aumento na concentração de INF-g foi observado no término da prova, três horas após e até 14 dias depois (SIQUEIRA; FERNANDES, 2016). Pesquisadores sugerem que o aumento tardio de $\text{INF-}\gamma$ esteja relacionado a uma reparação tecidual ou adaptação. Portanto, a ausência de lesão muscular nos equinos do presente trabalho justifica as baixas concentrações séricas de $\text{INF-}\gamma$ (LIBURT et al., 2010).

Há de se levar em consideração que pesquisas mais recentes mostraram que o estímulo para a produção de citocinas sistêmicas não está necessariamente restrito somente a alterações no tecido muscular, ou seja, ele pode vir de outros tecidos (LIBURT et al., 2010). No presente estudo o exercício não foi suficiente para causar uma resposta inflamatória sistêmica. No entanto, não foi possível afirmar que não tenha ocorrido uma resposta inflamatória local.

A ausência de alteração na concentração sérica de $\text{INF-}\gamma$ e também IL-2, neste estudo, podem estar relacionadas à ação do cortisol e epinefrina, hormônios que aumentam em resposta ao exercício. O cortisol age inibindo a

produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos e diminuindo a habilidade dos linfócitos T de responderem a essa interleucina. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, cuja função é aumentar a secreção de INF- γ pela NK e linfócitos TCD4. A epinefrina também suprime as células do tipo Th1, tanto pela diminuição da apresentação de antígenos quanto agindo diretamente sobre receptores dos linfócitos (FRANCHIMONT et al., 2000; ELENKOV; CHROUSOS, 1999).

Assim como visto em humanos e camundongos submetidos a exercícios extenuantes (FRANCHIMONT et al., 2000; ELENKOV; CHROUSOS, 1999), neste trabalho não houve alteração na concentração sérica de IL-4 dos equinos submetidos a exercícios de curta duração e alta intensidade. A alteração na concentração sérica de IL-4 parece estar associada com a relação entre células TCD4/TCD8. Quanto menor a relação, maior a concentração de IL-4 (SIQUEIRA, 2014).

Deve-se considerar também que, apesar de ser um exercício intenso, a modalidade laço em dupla tem uma duração muito curta, entre seis a oito segundos e, apesar de os equinos terem feito cinco corridas, o tempo exposto ao exercício de alta intensidade e curta duração não passou de um minuto, ou seja, a duração do esforço físico não seria suficiente para causar um estresse orgânico a ponto de desencadear uma resposta inflamatória sistêmica. Estudos realizados em humanos, por exemplo, mostraram um aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-1B, IL-6, IL-10 e INF- γ durante e após o exercício e que estes aumentos são diretamente influenciados, não somente pela intensidade e tipo, mas, principalmente, pela duração do mesmo, ou seja, a magnitude do aumento das concentrações de citocinas está fortemente ligada à duração do exercício (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Além disso, mais duas explicações poderiam ser aplicadas para justificar a não alteração na concentração sérica das citocinas, ao longo do tempo, no presente estudo. Segundo Liburt e colaboradores (2010), a quantificação da concentração de citocinas na corrente sanguínea pode ser dificultada por dois fatores, como baixa concentração e rápida remoção do tecido sanguíneo. No

entanto, os resultados mostraram que os animais saudáveis de ambos os grupos apresentaram um valor de citocina sérica basal e que os valores mensurados após o esforço físico foram bem próximos a eles, ou seja, os animais saudáveis em treinamento já apresentam uma concentração de citocina sérica facilmente mensurável. Em relação à rápida remoção da corrente sanguínea, esta justificativa não se aplica neste estudo, já que as amostras foram colhidas imediatamente após o esforço físico, não sendo detectada alteração significativa na concentração das citocinas quando comparadas à basal.

São poucos os trabalhos que avaliam o efeito do exercício sobre a possível inversão entre Th1 e Th2 em equinos atletas. Um experimento realizado por Hines e colaboradores (1994), com 3 cavalos que completaram uma prova de 80 km, mostrou uma diminuição da relação CD4/CD8 após a prova. Já Foz e colaboradores (2009) avaliaram cavalos de polo de elite exercitados em esteira rolante de alta velocidade e perceberam aumento do número, tanto de LT CD4 quanto LT CD8 após o *sprint* com posterior diminuição, não alterando a relação entre as mesmas.

Ao contrário dos estudos acima, no presente trabalho os resultados mostraram que não houve alteração nas concentrações séricas, tanto das citocinas pró-inflamatórias quanto das anti-inflamatórias após o exercício, mostrando equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2.

No entanto, quando comparado os grupos, nota-se que o GTE apresentou uma maior concentração de TNF- α e IL-6 e, considerando que estas citocinas são produzidas por células Th1, pode-se dizer que a resposta imune foi do tipo Th1. Contudo, também houve uma maior concentração de IL-10, também no GTE, caracterizando assim uma resposta do tipo Th2. Portanto pode-se dizer que os animais treinados esporadicamente apresentam uma resposta mista, do tipo Th1 e Th2.

Conclusão

O presente trabalho é o primeiro mensurar a concentração sérica de citocinas por meio da citometria de fluxo de equinos da raça Quarto de Milha, submetidos a exercícios de alta intensidade e curta duração, como o laço em dupla. O método proposto mostrou-se eficiente e de fácil execução pra ser utilizado para detecção da concentração de citocinas séricas. O exercício não foi suficiente para causar uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2, sendo sua curta duração o maior limitante. A resposta imune em animais condicionados, treinados esporadicamente, é do tipo mista (Th1 e Th2), enquanto que em animais condicionados, treinados regularmente, ela não se altera.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7.ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2012, 552p.

CAIADO, J.C.C.; PISSINATE, G.L.; SOUZA, V.R.C.; FONSECA, L.A.; COELHO, C.S. Lactacidemia e concentrações séricas de aspartato aminotransferase e creatinoquinase em equinos da raça Quarto de Milha usados em provas de laço em dupla. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 452-458, 2011.

CANNON, J.G.; KLUGER, M.J. Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. **Science**, v. 220, p. 617-619, 1983.

COELHO, C.S.; LOPES, P.F.R.; PISSINATI, G.L.; RAMALHO, L.O.; SOUZA, V.R.C. Influência do exercício físico sobre sódio e potássio séricos em equinos da raça Quarto de Milha e mestiços submetidos à prova de laço em dupla. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 18, p. 32-35, 2011.

DE JAGER, W.; TE VELTHUIS, H.; PRAKKEN, B.J.; KUIS, W.; RIJKERS, G.T. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. **Clin. Diag. Lab. Immunol**, v. 10, p. 133-139, 2003.

DONOVAN, D.C.; JACKSON, C.A.; COLAHAN, P.T.; NORTON, N.; HURLEY, D.J. Exercise-induced alterations in pro-inflammatory cytokines and prostaglandin F2alpha in horses. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 118, p. 263-269, 2007.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v.10, p. 359-368, 1999.

FOZ, N.B.; QUEIROZ-NETO, A; FERRAZ, G.C.; GRANER, C.; MASSOCO, C.O.; MACHADO, R.Z. Evaluation of T cell CD4 and CD8 population ratio in elite polo ponies submitted to lactate minimum speed (LMS) – a preliminary study. In: **International Congress Of World Equine Veterinarys Association**, v. 11, 2009.

FRANCHIMONT, D.; GALON, J.; GADINA, M.; VISCONTI, R.; ZHOU, Y.; ARINGER, M.; FRUCHT, D.M.; CHROUSOS, G.P.; O'SHEA, J.J. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12 – induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 1768-1774, 2000.

GOKHALE, R.; CHANDRASHEKARA, S.; VASANTHAKUMAR, K.C. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes - an adaptive response. **Cytokine**, v. 40, p. 123-127, 2007.

HALL, S.A.; STUCKE, D.; MORRONE, B.; LEBELT, D.; ZANELLA, A.J. Simultaneous detection and quantification of six equine cytokines in plasma using a fluorescent microsphere immunoassay (FMIA). **MethodsX**, v. 2, p. 241-248, 2015.

HINES, M.T.; SCHOTT II, H.C.; BAYLY, W.M.; LEROUX, A.J. Changes in lymphocytes subpopulation following prolonged exercise in horse. In: **Annual Veterinary Medical Forum**, v. 12, p. 1016, 1994.

LIBURT, N.R.; ADAMS, A.A.; BETANCOURT, A.; HOROHOV, D.W.; MCKEEVER, K.H. Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. **Equine Vet. J.**, v. 42, p. 280-288, 2010.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: ESALQ/USP. 2006. 250p.

NIEMAN, D.C. Exercise upper respiratory tract infection and the immune system. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 26, p. 128-39, 1994.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ZACHO, M.; ASP, S.; PEDERSEN, B.K. Evidence that interleukin 6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. **J. Physiol.**, v. 508, p. 949-953, 1998.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol. Ver.**, v. 80, p. 1055-1081, 2000.

PEREIRA, M.S. **Avaliação das concentrações séricas de lactato, creatina quinase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, parâmetros clínicos e hematológicos de equinos quarto de milha submetidos à prova de laço em dupla**. Dissertação de Mestrado. Universidade Paulista "Júlio de

Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária - FMVZ, Araçatuba-SP, 2015.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K.; The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p. 1154-1162, 2005.

SCHEERLINCK, J.P. Functional and structural comparison of cytokines in different species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 39-44, 1999.

SCHNABEL, C.L.; WAGNER, S.; WAGNER, B.; DURÁN, M.C.; BABASYAN, S.; NOLTE, I.; PFARRER, C.; FEIGE, K.; MURUA ESCOBAR, H.; CAVALLERI, J.M. Evaluation of the reactivity of commercially available monoclonal antibodies with equine cytokines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 156, n. 1, p.1-19, 2013.

SILVA, F.O.C.; MACEDO, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Bras. Cineantropom Desempenho Hum.**, v. 13, p. 320-328, 2011.

SIQUEIRA, R.F. **Efeito imunossupressor do exercício em equinos submetidos a prova de enduro de diferentes distâncias, suplementados ou não com glutamina.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-USP, São Paulo, 2014.

SIQUEIRA, R.F.; FERNANDES, W.R. Post-ride inflammatory markers in endurance horses. **Ciência Rural**, v.46, n.7, p.1256-1261, 2016.

SMITH, J. Guidelines A. Standard and perspectives in exercise immunology. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 27, p. 496-505, 1995.

SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Sci. Sports Exerc.**, v. 32, p. 317-331, 2000.

STORDEUR, P.; ZHOU, L.; BYL, B.; BROHET, F.; BURNY, W.; DE GROOTE, D.; VAN DER POLL, T.; GOLDMAN, M. Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. **J. Immunol. Methods.**, v. 276, p. 69-77, 2003.

TOIGO, M.; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 97, p. 643-663, 2006.

WAGNER, B.; FREER, H. Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 3, p. 242-248, 2009.

WELCH, W.J. How cells respond to stress. **Scientific American**, v. 268, n.5, p. 34-41, 1993.

CAPÍTULO 3 – USO DA TERMOGRAFIA PARA AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA EXTERNA DE EQUINOS DA RAÇA QUARTO DE MILHA SUBMETIDOS À PROVA DE LAÇO EM DUPLA

RESUMO – Os objetivos do presente estudo foram verificar se a temperatura corpórea e local se alteram com este tipo de exercício e se treinamentos distintos podem influenciar nestas alterações. Foram utilizados 12 animais, machos e fêmeas, com idade entre 3 e 6 anos e peso médio de 450 kg, participantes da categoria laço em dupla, divididos em dois grupos: treino regular (GTR) e treino esporádico (GTE). As aferições da temperatura por meio de termografia infravermelha, da regiões ocular, coluna (toracolombar), tendíneas distais (membros torácicos e pélvicos) e garupa foram realizadas 30 minutos antes, imediatamente depois, uma, duas, seis e 24 horas após a simulação de competição. A termometria mostrou que, após 24 horas do exercício, os animais já restabeleceram sua temperatura central, no entanto não houve retorno aos valores basais das temperaturas da região dos tendões em membros pélvicos e da região da garupa nos animais do GTR. Os animais apresentaram uma capacidade de termorregulação eficiente. A dissipação de calor de regiões específicas como região tendínea distal dos membros pélvicos e musculatura da garupa pode ser dificultada devido a maior carga a elas aplicada durante o exercício. Aumentos de temperaturas localizados podem ser sugestivos de inflamação subclínica.

Palavras-Chave: equinos, termografia, inflamação, termorregulação.

Introdução

O Brasil possui um plantel em torno de cinco milhões de animais, dos quais um milhão é destinado ao esporte e lazer. Quando se fala em animais da raça Quarto de Milha o plantel chega a 400 mil animais registrados até o ano de 2013 (LIMA et al., 2015). O mercado econômico relacionado somente com equinos de esporte e lazer movimenta por volta de R\$ 5,84 bilhões de reais ao ano. O cuidado com esses equinos atletas é de extrema importância, portanto o acompanhamento, não só do desempenho atlético desses animais mais também do quadro clínico, é essencial para o desenvolvimento de atletas saudáveis e de alto desempenho (SILVA et al., 2007).

A termografia infravermelha é uma forma não invasiva e com potencial de diagnóstico, em tempo real, de inflamações locais, as quais podem levar a uma doença clínica (SIMON et al., 2006). A característica essencial da termografia na detecção dessas doenças baseia-se na ocorrência de uma inflamação. A inflamação, por sua vez, está associada com a elevação de temperatura, devido ao aumento da circulação local, resultado da ação de citocinas que não só promovem maior circulação da área pelo aumento de permeabilidade vascular como também recrutam células inflamatórias locais que, futuramente, amplificam a resposta inflamatória (VAN HOOGLMOED et al., 2000).

A avaliação termográfica do músculo pode ser feita comparando-se as mesmas regiões anatômicas em lados opostos. Em uma situação normal, as imagens devem ser quase que idênticas. Alterações significativas nessas regiões podem indicar danos musculares (YANMAZ et al., 2007). Além disso, este método de diagnóstico pode detectar alterações de temperatura locais, antes mesmo de serem detectadas pela palpação direta. Alterações teciduais importantes podem ser diagnosticadas até duas semanas antes da manifestação de outros sinais clínicos (TURNER et al., 2001).

Além disso, estudos anteriores (JOHNSON et al., 2011; DUNBAR et al., 2009; SCHAEFER et al., 2007) mostram que a alteração na temperatura da região ocular está associada com a alteração na temperatura corpórea. A utilização da termografia infravermelha vem sendo utilizada como um método rápido, indolor e de fácil execução para controle de febre em bovinos com doenças respiratórias (SCHAEFER et al., 2007). Dunbar *et al* (2009) mostrou que não houve diferença entre as temperaturas na região ocular, aferida por termografia, e temperatura retal em cervos. Em equinos, a termografia infravermelha da região ocular mostrou ser um bom indicador para temperatura corpórea (JOHNSON et al., 2011).

Já foi demonstrado que exercícios físicos de longa duração e alta intensidade, como cross country, enduro, esteira (COSTA, 2011; SIMON et al., 2006) causam alterações tanto na temperatura corpórea quanto local. No entanto, há poucos estudos relatando alterações de temperatura em animais submetidos à prova de laço em dupla (GOMIDE et al., 2014). Diante disso, os objetivos do presente estudo foram verificar se a temperatura corpórea e local se alteram com este tipo de exercício e se treinamentos distintos podem influenciar nestas alterações.

Material e Métodos

Foram utilizados 12 animais da raça Quarto de Milha, de ambos os sexos e peso médio de 450 kg, clinicamente saudáveis e participantes da categoria laço em dupla. Todos os animais eram treinados profissionalmente, sendo que os integrantes do grupo treino regular eram treinados todos os dias da semana com dois dias de repouso e os do grupo esporádico eram animais que estavam afastados e voltando às competições, treinando de um a dois dias por semana. Todos os animais foram submetidos a uma série de exercícios semelhantes, de mesma intensidade e duração, diferindo apenas na

frequência. Os equinos foram divididos em dois grupos de acordo com treinamento: treino regular, (GTR - cinco dias por semana), idade média de 3,8 anos ($\pm 0,83$), e treino esporádico (GTE – um a dois dias por semana), idade média de 6 anos ($\pm 1,3$). As aferições foram realizadas em uma propriedade na região comercial de Araçatuba-SP, onde os animais permaneceram alojados em baias individuais, recebendo feno de *Tifton* e ração comercial peletizada, duas vezes ao dia, além de sal mineral uma vez ao dia e água à vontade. Todos os animais foram submetidos a uma série de exercícios semelhantes e de mesma intensidade, porém com frequências diferentes. Os equinos foram submetidos a repouso de, no mínimo, 24 horas antes do início do experimento.

As simulações de prova foram feitas no período da manhã, em dois dias diferentes, em pista coberta e de areia. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e cada cavalo participou uma única vez da simulação, que consistia na representação das provas oficiais, nas quais uma dupla de cavaleiros laça um bezerro, sendo um dos cavaleiros responsável em laçar a cabeça e o outro os pés. O tempo da prova, em média de oito a 10 segundos, decorre desde o momento em que os laçadores saem do boxe até os dois cavaleiros laçarem o bezerro, mantendo-o sobre a corda esticada e amarrada à sela do cavalo. Vence a dupla que completar a prova em menos tempo (CAIADO et al., 2011).

Todos os animais passaram por um período de aquecimento antes da prova de, aproximadamente, 20 minutos, divididos em cinco minutos de exercício ao passo, 10 minutos ao trote e cinco minutos a galope, em um percurso circular de sete metros de diâmetro. Os animais foram aquecidos e conduzidos pelos mesmos cavaleiros. O presente trabalho foi devidamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP Campus Araçatuba (Protocolo nº 2012-01985).

As temperaturas externas correspondentes à região dos olhos, distolateral de membros torácicos e pélvicos, garupa e região da coluna (toracolombar) foram aferidas por meio da termografia. As temperaturas foram

aferidas através de uma câmara específica⁴ em tempo real, a uma distância de 1 metro. As temperaturas foram mensuradas 30 minutos antes, imediatamente depois, uma, duas, seis e 24 horas após a simulação de competição. Os equinos foram submetidos ao exercício de laço em dupla cinco vezes consecutivas antes da realização da segunda aferição. Os animais foram mantidos à sombra e em temperatura ambiente, tanto no momento da simulação de prova quanto nos intervalos de aferição de temperatura. As imagens, após serem gravadas, foram analisadas em software específico⁵, no qual também foram feitas as correções da temperatura superficial em relação à temperatura ambiente e umidade do ar. Na região ocular as análises de temperatura máxima foram feitas no canto medial dos olhos (Figura 9). Na região dos tendões distais dos membros torácicos (Figura 10) e pélvicos (Figuras 11) a análise foi feita por área, assim como a região da musculatura dos lados direito e esquerdo (Figura 12 A-B). A análise da coluna foi feita por linearidade (Figura 13).

A temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram monitoradas em todas as aferições, por meio do uso de equipamentos específicos.

⁴ Termovisores de alta resolução FLIR - i 60

⁵ FLIR Tools Version 5.5 16056.1003

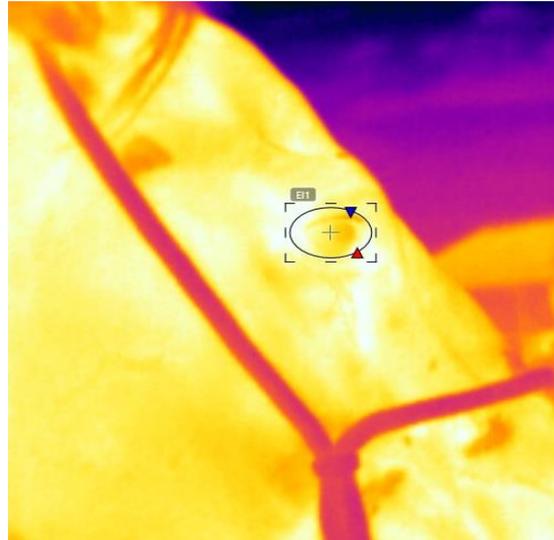


Figura 9 – Imagem termográfica da região ocular de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de prova de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE).

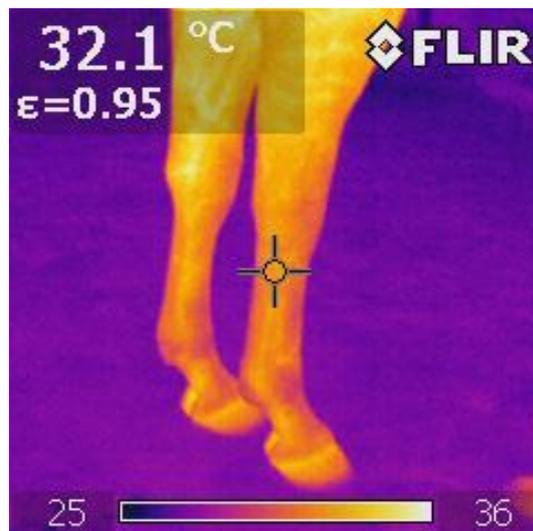


Figura 10 – Imagem termográfica da região tendínea distolateral direita de membro torácico de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de prova de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE).

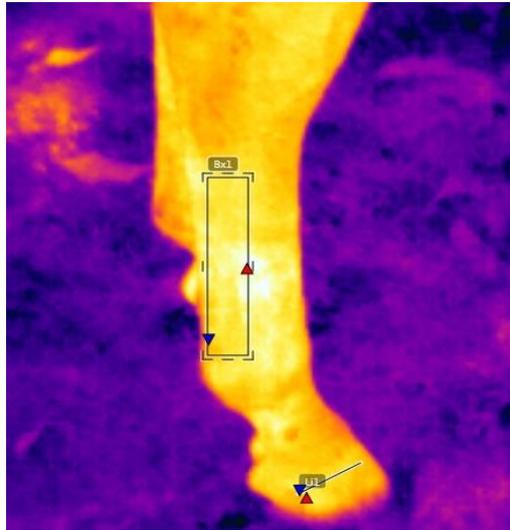


Figura 11 - Imagem termográfica da região tendínea distolateral direita de membro pélvico de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de prova de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE).

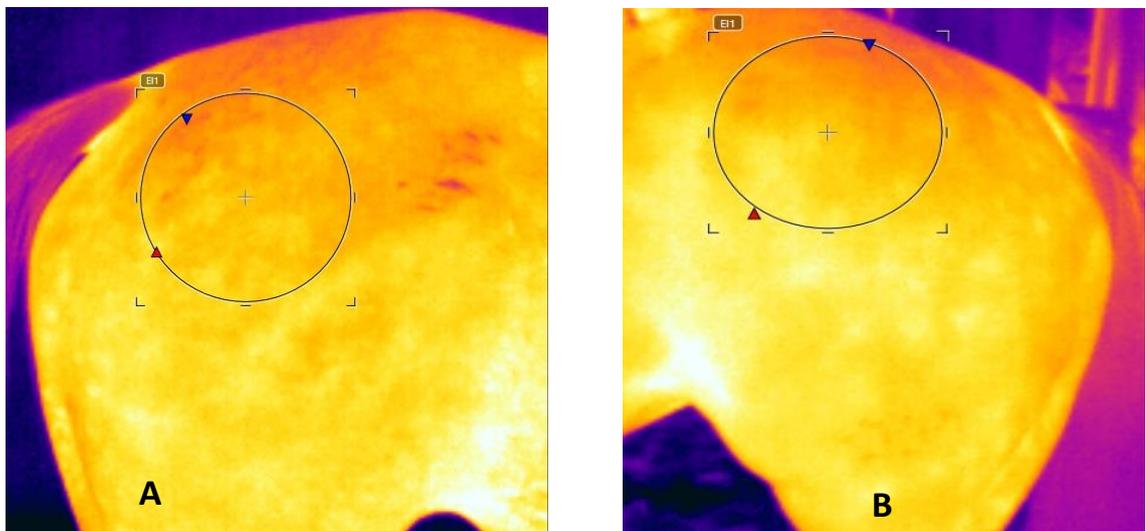


Figura 12 – Imagem termográfica da região da garupa, lado direito (A) e lado esquerdo (B), de equinos da raça Quarto de Milha, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE).

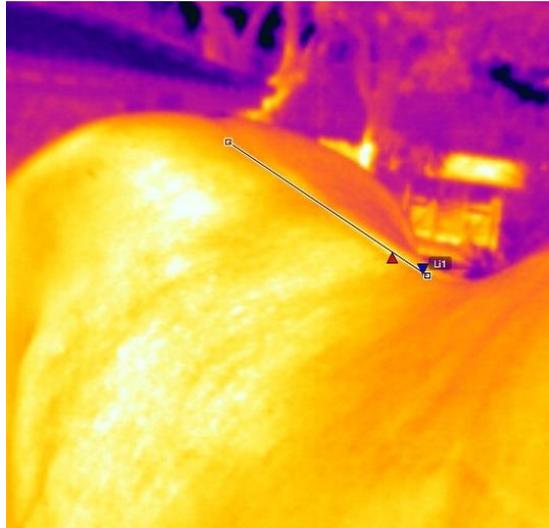


Figura 13 - Imagem termográfica da região da coluna (toracolombar) de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de prova de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE).

Os dados obtidos quanto às temperaturas do olho, pescoço, região lombar, garupa e membros torácicos e pélvicos foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas para comparação entre grupos e momentos, seguidos da comparação das médias pelo teste de comparações múltiplas de Tukey no nível de significância de 5%. Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e as análises foram efetuadas empregando-se o programa SAS⁶.

Resultados

Em relação à região ocular, no GTR observou-se um aumento significativo da temperatura 2 horas após o exercício, mantendo-se elevada por mais quatro horas. Já no GTE o aumento ocorreu logo após o exercício, retornou aos valores basais uma hora após o esforço físico e assim

⁶ SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., EUA, 2014.

permaneceu por mais uma hora, elevando-se novamente após seis horas do exercício. Depois de 24 horas a temperatura retornou ao valor basal em ambos os grupos (Figura 14).

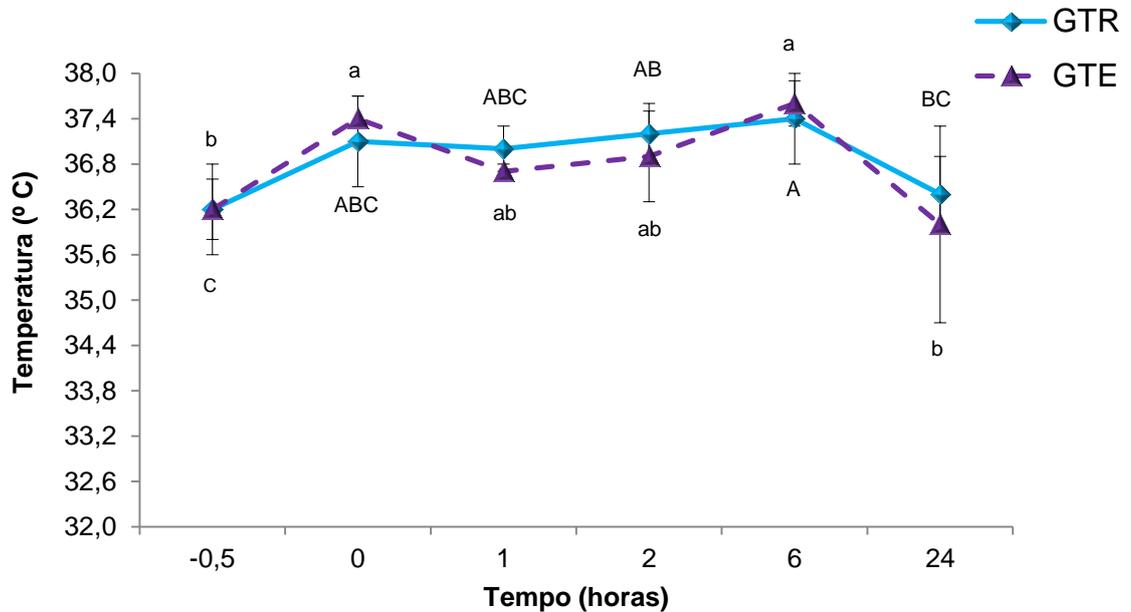


Figura 14 - Valor médio e desvio padrão das temperaturas na região ocular de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTR, pelo teste de Tukey ($P>0,05$). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTE, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Na região da coluna (torocolombar) houve um aumento significativo da temperatura em ambos os grupos, imediatamente após o exercício, porém no GTE houve uma diminuição significativa da temperatura uma hora depois. Em ambos os grupos a temperatura retornou ao valor basal após 24 horas do exercício (Figura 15).

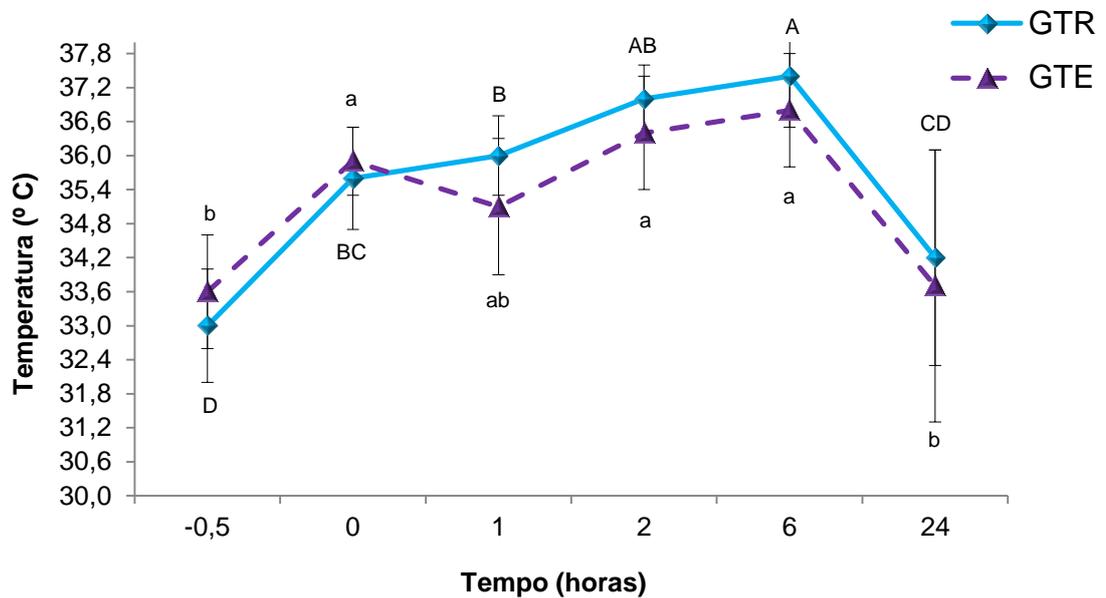


Figura 15 - Valor médio e desvio padrão das temperaturas na região da coluna (toracolombar) de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTR, pelo teste de Tukey ($P>0,05$). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTE, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Quando avaliada a região da garupa, o comportamento da temperatura foi o mesmo no GTR (lado esquerdo) e no GTE (lado direito). Houve um aumento significativo imediatamente após o exercício, que só retornou à temperatura inicial depois de 24 horas. Já no lado esquerdo do GTE também se observou um aumento significativo da temperatura logo após o exercício, no entanto a mesma diminuiu significativamente depois de uma hora. Elevou-se novamente depois de uma hora e retornou ao valor basal 24 horas após o exercício. A temperatura no lado direito da garupa do GTR aumentou logo após o exercício e assim se manteve por mais de 24 horas (Figura 16 A-B).

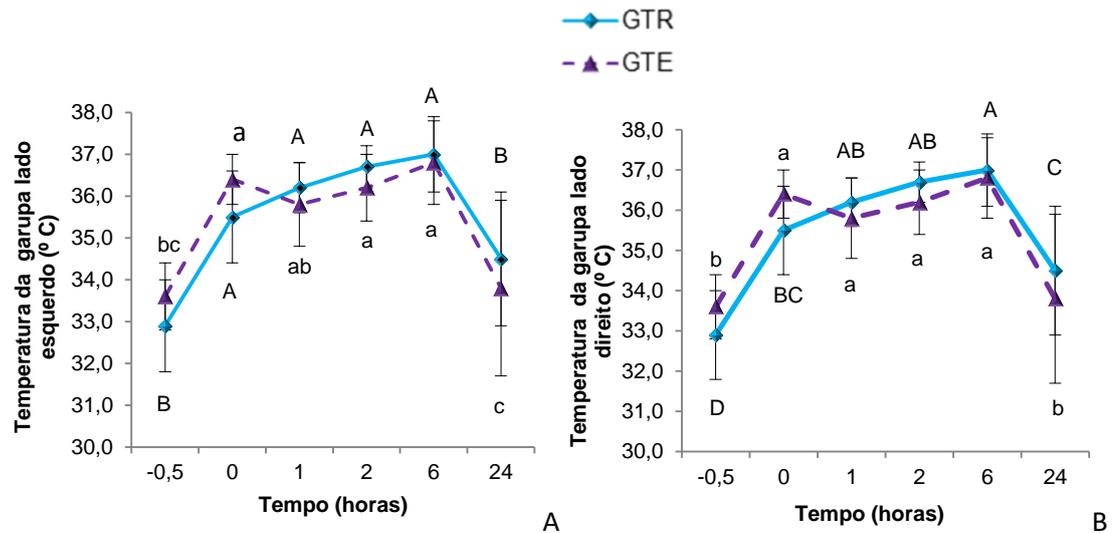


Figura 16 - Valor médio e desvio padrão das temperaturas na região da garupa, lado esquerdo (A) e direito (B) de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de laço em dupla, divididos em grupo de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTR, pelo teste de Tukey ($P>0,05$). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTE, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Em relação à região tendínea dos membros torácicos, a temperatura se elevou significativamente logo após o exercício e retornou ao valor basal 24 horas depois, em ambos os lados, tanto no GTR quanto no GTE (Figuras). As mesmas alterações de temperatura foram vistas na região dos membros pélvicos do GTE. No GTR, por outro lado, não houve retorno à temperatura basal 24 horas após o exercício. A temperatura se elevou significativamente logo após o exercício e assim se manteve (Figuras).

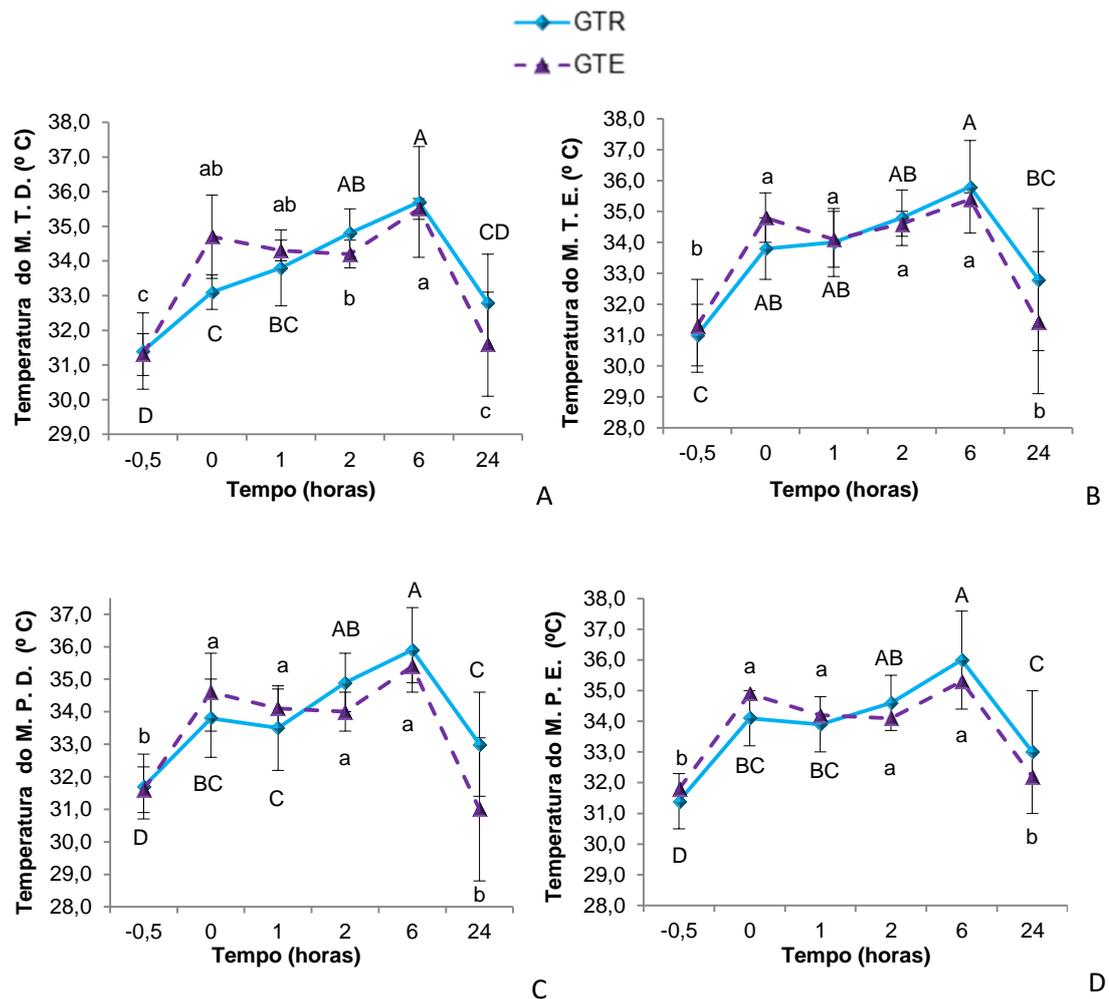


Figura 17- Valor médio e desvio padrão das temperaturas (°C) na região distolateral tendínea dos membros torácico diteito (M. T. D. - A) e esquerdo (M. T. E. - B.), pélvico direito (M.P. D. - C) e esquerdo (M. P. E. - D) e esquerdos, de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE). Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTR, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si, ao longo do tempo no GTE, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

As figuras 18 e 19 representam a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar, respectivamente.

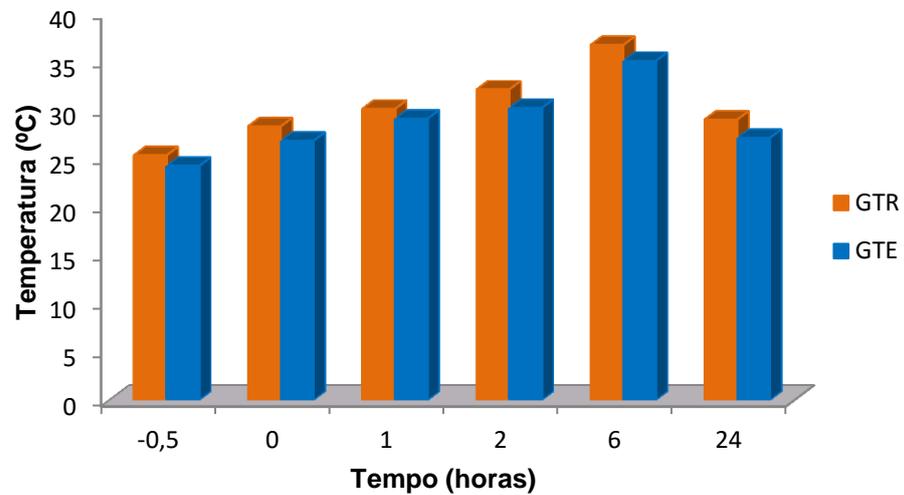


Figura 18 - Temperatura média do ambiente durante as avaliações termográficas, por meio da termografia infravermelha de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE).

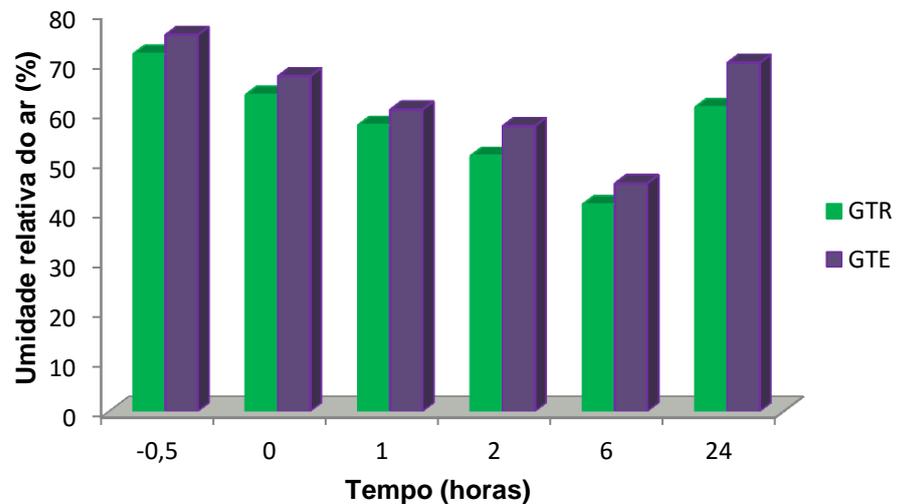


Figura 19 - Umidade relativa do ar média durante as avaliações termográficas, por meio da termografia infravermelha de equinos da raça Quarto de Milha praticantes de laço em dupla, divididos em grupos de treino regular (GTR) e grupo treino esporádico (GTE).

Discussão

Os achados do presente estudo mostraram que a temperatura na região ocular aumentou após o exercício no GTE, levando à conclusão de que a

prática do exercício foi suficiente para causar um desequilíbrio na temperatura central, mesmo sendo uma atividade de curta duração. Esse aumento na temperatura ocorreu devido ao metabolismo muscular que promove a produção de energia mecânica e térmica (MARTINOD, 2007). Como não houve alterações significativas da temperatura da região ocular entre os grupos, conclui-se que a frequência de treinamento, neste estudo, não influenciou na taxa de produção de calor central.

A ausência de elevação significativa de temperatura após o exercício físico no GTR pode estar relacionada a uma maior capacidade adaptativa desses animais. Apesar de a contratilidade muscular promover o aumento de temperatura corpórea, a capacidade de resfriamento nestes animais é superior, já que os animais conseguem manter a temperatura corpórea próxima ao basal, ao contrário do que foi visto no GTE.

Provavelmente os animais do GTR apresentam uma capacidade de bombeamento sanguíneo por minuto maior do que os do GTE, possibilitando maior redistribuição de sangue para os órgãos e tecidos que participam da termólise, incluindo a pele, músculos respiratórios e mucosas nasais e, conseqüentemente, promovendo uma dissipação de calor mais rápida e por isso a temperatura não se altera significativamente. Segundo Hodgson e Rose (1994), o condicionamento atlético é melhor quanto mais rápido o animal retornar às frequências e temperaturas basais.

A diminuição na temperatura dos animais do GTE, uma hora depois do exercício, está relacionada ao mecanismo de ativação termorregulatório na tentativa de evitar uma hipertermia pós-exercício desses animais. O mecanismo de vasodilatação é acionado na tentativa de auxiliar na dissipação de calor. Sabe-se que a capacidade de modificar a irrigação dos diferentes órgãos, se ajustando a diferentes necessidades, faz do sistema cardiovascular o mais eficiente executor da termorregulação (MCCONAGHY et al., 1996). Pelos resultados obtidos neste estudo, observa-se que o mecanismo termorregulatório também foi eficiente nos animais do GTE, já que uma hora após o exercício físico a temperatura corpórea retornou ao valor basal. Os

animais do GTE são animais que apesar de terem se afastados temporariamente das competições e estarem voltando ao treinamento, já são animais condicionados ao exercício, isso explica a eficiência de seu mecanismo de termorregulação.

De acordo com Tanda (2016), o aumento na temperatura ambiente acarreta no aumento da temperatura central e consequente ativação do mecanismo termorregulatório. Portanto os aumentos tardios das temperaturas dos animais do GTR e dos animais do GTE provavelmente estão relacionados com a alteração na temperatura ambiental, mesmo que os animais tenham permanecido na sombra durante as aferições, a temperatura ambiente não era controlada. Apesar de a vasodilatação facilitar a troca de calor do animal com o meio ambiente por processos sensíveis, a eficácia desta depende do gradiente térmico entre o corpo do animal e a temperatura ambiente (MCCUTCHEON; GEOR, 2008). Provavelmente o aumento da temperatura ambiente dificultou a dissipação de calor dos animais de ambos os grupos.

Em relação às temperaturas regionais, fica evidente nos resultados apresentados que houve produção de calor em quase todas as áreas após o exercício e, conseqüentemente, uma elevação na temperatura local. O aumento temporário da temperatura ocorre, primeiramente, devido ao aumento do metabolismo muscular e, também, ao maior fluxo de sangue na região, com a finalidade de aumentar o aporte de oxigênio. Em humanos, por exemplo, o fluxo sanguíneo pode aumentar até 20 vezes no pico do exercício quando comparado à situação de repouso (LASH, 1996). No entanto, após o término do exercício, o fluxo tende a se normalizar novamente e a temperatura volta ao basal (HODGSON; ROSE, 1994). Esse processo foi observado após 24 horas do esforço físico nos animais do presente estudo.

Contudo, observou-se que a temperatura da região tendínea dos equinos do GTR, nos membros pélvicos esquerdo e direito não retornaram aos valores basais após 24 horas. Estes resultados contrariam os obtidos em estudos anteriores, os quais mostraram que a temperatura na região tendínea dos membros pélvicos de equinos submetidos a esforço físico em esteiras

retornaram aos valores basais 45 minutos após o exercício (SIMON et al., 2006).

A evaporação é a principal forma de perda de calor em equinos em ambientes quentes, por meio da sudação. A quantidade de calor dissipada por esta via dependerá da taxa de sudação e da umidade relativa do ar. Portanto, esse mecanismo será mais eficiente quando mais moderada for a sudação e menor for a umidade relativa do ar (GUTHRIE; LUND, 1998; TITTO et al., 1998). No presente trabalho observou-se que, após 24 horas, a temperatura na região ocular, que corresponderia à temperatura central, retornou ao valor basal, portanto a capacidade de perda de calor desses animais foi eficiente. Além disso, a umidade relativa do ar e a temperatura do ambiente foram favoráveis à perda de calor. Dessa forma conclui-se que o aumento de temperatura nessas regiões não está relacionado a uma falha no processo de perda de calor e sim a outro motivo.

Em relação à temperatura na região da garupa, estudos anteriores mostram que a perda da temperatura nas regiões musculares, em condições normais, tem a capacidade de retornar à temperatura basal após o exercício muito mais rápido do que as superfícies não musculares, isso devido à maior área de superfície. No entanto, contrariando os achados de Costa e colaboradores (2011), a temperatura da área correspondente à garupa (lado direito) dos animais do GTR não retornou aos valores basais após 24 horas.

A contrariedade entre os resultados apresentados por Simon e colaboradores (2006), Costa e colaboradores (2011) e os obtidos por este estudo, talvez esteja relacionada com a diferença entre a exigência do exercício, laço em dupla, sobre os membros pélvicos dos animais que o praticam. Os animais praticantes de laço em dupla tem uma carga maior sobre os tendões pélvicos no momento da largada e ainda os movimentos de curva, fazem com que o animal deposite seu peso nos membros pélvicos, principalmente o esquerdo, ao contrário do que é visto nos exercícios feitos em esteira, nos quais os animais percorrem um percurso em linha reta e sem movimentos de explosão. A contração da musculatura do lado direito da garupa

também é mais intensa do que do lado esquerdo, isso porque essa auxilia no deslocamento do animal para esquerda no momento de execução da curva. A temperatura elevada nestas áreas provavelmente esteja relacionada com a maior carga a elas aplicada.

Aferições de temperaturas pós 24 horas, no presente trabalho, poderiam confirmar se estas áreas em específico necessitam de mais tempo para voltar a ao valor basal. Caso isso não ocorra, outra explicação para a permanência da temperatura elevada nestas regiões, após 24 horas do exercício, pode estar relacionada a uma inflamação subclínica localizada. Ao compararem-se os valores das temperaturas médias das três regiões com seus valores basais correspondentes, observa-se uma diferença de mais de 1°C, sendo: 1,6°C na região do MPE; 1,3°C no MPD e 1,6°C na região da garupa (lado direito). A diferença de 1°C ou 1,25°C entre duas regiões anatomicamente simétricas é um indicativo de inflamação subclínica (SOROKO et al., 2013; HEAD; DYSON, 2001).

Diante disso, pode-se dizer que a permanência da temperatura na região tendínea dos membros pélvicos e da região da garupa, acima dos valores basais, nos animais do presente trabalho, podem estar relacionados, em primeiro lugar, à necessidade de maior tempo para dissipação de calor nestas áreas, já que são locais que trabalham com maior exigência para movimentar o animal. Em segundo, à persistência da temperatura acima do basal após 24 horas pode ser sugestivo de uma inflamação subclínica localizada, diagnosticada precocemente pela termografia. O diagnóstico precoce de lesão inflamatória já foi verificado em outros estudos, sendo que a alteração na termografia, indicativa de inflamação, foi vista duas semanas antes dos animais apresentarem sinais clínicos (TURNER et al., 2001; VADEN et al., 1980). A provável inflamação subclínica nesses animais pode estar relacionada a um esforço repetitivo dessas estruturas, visto que estes animais são treinados constantemente e, com isso, não há um intervalo hábil para recuperação dos tecidos.

Conclusão

Concluiu-se que a temperatura central de equinos da raça Quarto de Milha, submetidos à prova de laço em dupla, retornou ao seu valor basal 24 horas após o exercício físico, em ambos os grupos. A dissipação de calor de regiões específicas como região tendínea distal dos membros pélvicos e musculatura da garupa pode ser dificultada devido a uma maior carga a elas aplicada durante o exercício. Aumentos de temperatura localizados podem ser sugestivos de inflamação subclínica. E, por fim, o mecanismo de termorregulação foi eficiente em ambos os treinamentos, mostrando que os animais estão condicionados ao exercício de laço em dupla.

REFERÊNCIAS

CAIADO J.C.C.; PISSINATE G.L.; SOUZA V.R.C.; FONSECA L.A.; COELHO, C.S. Lactacidemia e concentrações séricas de aspartato aminotransferase e creatinoquinase em equinos da raça Quarto de Milha usados em provas de laço em dupla. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 452-458, 2011.

COSTA, A.P.D.; SOBRINHO, B.L.; BOGOSSIAN, P.; MENDONCA, L.P.V.; ANDRADE, V.A.A.; VIANA, A.P. Thermography in the evaluation of hindlimb muscles in horses after a cross-country test. **Proceedings of the 11th International Congress of World Equine Veterinary Association**. Guarujá-SP, 2011.

DUNBAR, M.; JOHNSON, S.R.; RHYAN, J.C.; MCCOLLUM, M. Use of infrared thermography to detect thermographic changes in mule deer (*Odocoileus hemionus*) experimentally infected with foot-and-mouth disease. **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 40, p. 296-301, 2009.

GOMIDE, L.M.W.; PANELLI, E.M.; CAMPOS, G.S.; GRAVENA, K.; MENDES, L.C.N.; PEIRO, J.R.; NETO, J.C.L. Thermography of team roping horses - preliminary results. 2014 ACVIM Forum, 2014, Nashville. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Malden: Wiley Periodicals, 2014. v. 28. p. 1121-1121.

GUTHRIE, A.J.; LUND, R.J. Thermoregulation in fluids and electrolytes in the athletic horse. **Vet. Clin. North Am. Eq. Pract.**, v. 14, p. 45-59, 1998.

HEAD, M.J.; DYSON, S. Talking the temperature of equine thermography. **Comment on Vet. J.**, v. 162, n. 3, p. 172-181, 2001.

HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. **Principles and Practice of Equine Sports Medicine: The athletic horse**. Oxford: W.B Saunders, 1994, 497p.

JOHNSON, S.R.; RAO, S.; HUSSEY, S.B.; MORLEY, P.S.; TRAUB-DARGATZ, J.L. Thermographic eye temperature as an index to body temperature in ponies. **Journal of equine Veterinary Science**, v. 31, p. 63-66, 2011.

LASH, J. Regulation of skeletal muscle blood flow during contractions. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 211, p. 218-35, 1996.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2015, 54p.

MARTINOD, S.R. Release of heat shock protein Hsp 72 after exercise and supplementation with opuntia ficus indica extract TEX-OE. **Annual Convention of American Association of Equine Practitioners**, p. 72-76, 2007.

MCCONAGHY, F.F.; HODGSON, D.R.; ROSE, R.J.; HALES, J.R. Redistribution of cardiac output in response to heat exposure in the pony. **Eq. Vet. J., Suppl.**, v. 22, p. 42-46, 1996.

MCCUTCHEON, L.J.; GEOR, R.J. Thermoregulation and exercise-associated heat stress. In: HINCHCLIFF, K.W.; GEOR, R.J.; KANEPS, A.J. **Equine exercise physiology: the science of exercise in the athletic horse**. Philadelphia: Elsevier, 2008. p.382-386.

SCHAEFER, A.L.; COOK, N.J.; CHURCH, J.S.; BASARAB, J.; PERRY, B.; MILLER, C.; TONG, A.K. The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. **Res. Vet. Sci.**, v. 83, n. 3, p. 376-384, 2007.

SILVA, M.A.G.; GOMIDE, L.M.W.; LACERDA-NETO, J.C. Venous hemogasometry and blood lactate levels in Quarter Horses during barrel racing. **Conferencia internacional de caballos de deporte**. San José, Costa Rica, fev. 2007.

SIMON, E.L.; GAUGHAN, E.M.; EPP, T.; SPIRE, M. Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 229, n. 12, p. 1940-1944, 2006.

SOROKO, M.; HENKLEWSKI, R.; FILIPOWSKI, H.; JODKOWSKA, E. The Effectiveness of Thermographic Analysis in Equine Orthopedics, **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 760-762, 2013.

TANDA, G. Skin temperature measurements by infrared thermography during running exercise. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 71, p. 103-113, 2016.

TITTO, E.A.L.; JÚNIOR, F.B.; TOLEDO, L.R.A.; BOMBARDA, A.F.; FILHO, J.C.M.N. Taxa de sudação e composição mineral do suor de equinos das raças Bretão, Anglo-Árabe e Mangalarga. **Ars Veterinary**, Jaboticabal, v. 14, n. 3, p. 264-272, 1998.

TURNER, T.A.; PANSCH, J.; WILSON, J.H. Thermographic assessment of Racing thoroughbreds. **AAEP Proceedings**, v. 47, p. 344-346, 2001.

VADEN, M.F., PUROHIT, R.C., MC COY, D., VAUGHAN, J. T. Thermography: a technique for subclinical diagnosis of osteoarthritis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p.1175-1179, 1980.

VAN HOOGMOED, L.; SNYDER, J.R.; ALLEN, A.K.; WALDSMITH, J.D. Use of infrared thermography to detect performance-enhancing techniques in horses. **Equine Veterinary Education**, v.12, n. 2, p.102-107, 2000.

YANMAZ, L.E.; OKUMUS, Z.; DOGAN, E. Instrumentation of thermography and its Applications in Horses. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 7, p. 858-862, 2007.

APÊNDICE

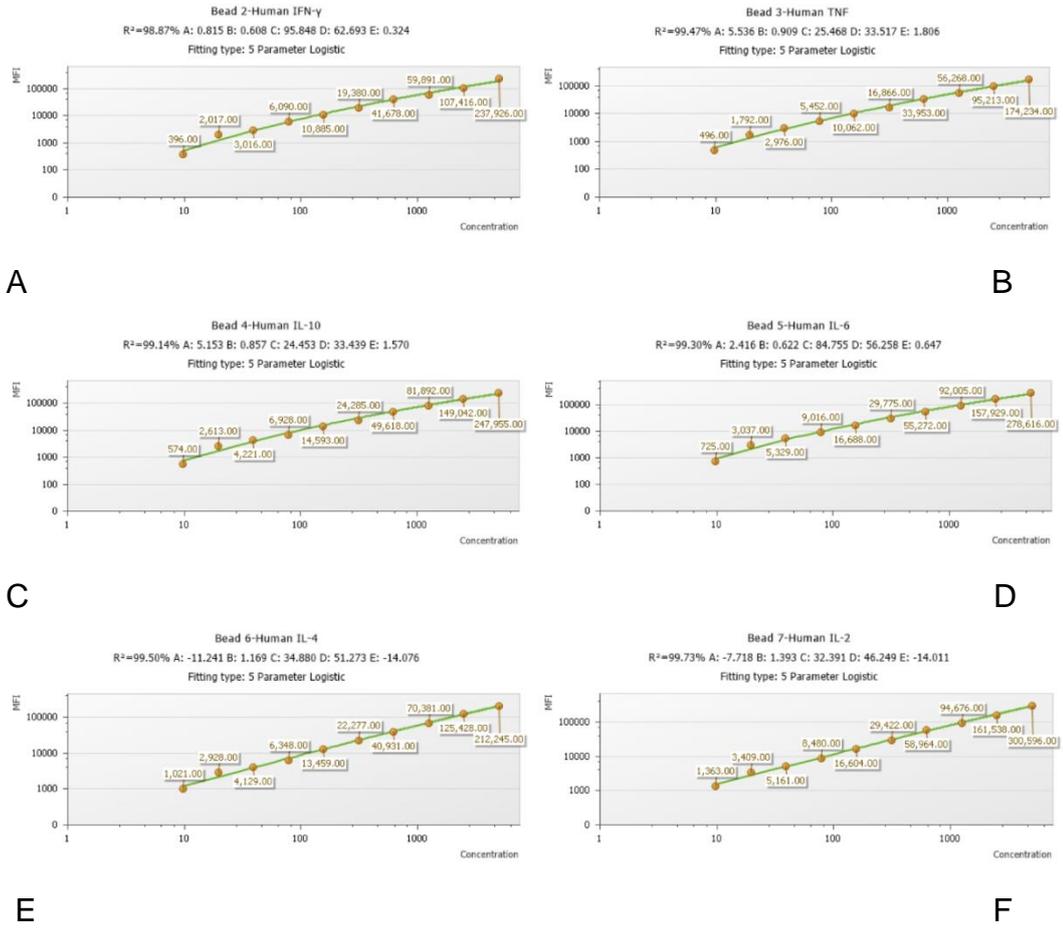


FIGURA 24 - (A-F) curvas padrões das citocinas onde o eixo X corresponde a concentração e o eixo Y corresponde à média de intensidade de fluorescência, com seus respectivos R^2 . Imagens obtidas do software FCAP array 3.0.