

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CINÉTICA DE BIOMARCADORES SÉRICOS MUSCULARES
E CARDÍACOS DE CÃES SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
INTENSO E TREINAMENTO AERÓBIO**

Juliana Aparecida Cerqueira

Médica veterinária

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CINÉTICA DE BIOMARCADORES SÉRICOS MUSCULARES
E CARDÍACOS DE CÃES SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
INTENSO E TREINAMENTO AERÓBIO**

Juliana Aparecida Cerqueira

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Clínica Médica Veterinária.

2017

Cerqueira, Juliana Aparecida

C416c Cinética de biomarcadores séricos musculares e cardíacos de cães submetidos a exercício intenso e treinamento aeróbio / Juliana Aparecida Cerqueira. -- Jaboticabal, 2017
vi, 67 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz

Banca examinadora: Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi, Áureo Evangelista Santana.

Bibliografia

1. Teste de esforço incremental. 2. Creatina quinase. 3. Aspartato aminotransferase. 4. Mioglobina. 5. Troponina cardíaca. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:613.72:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CINÉTICA DE BIOMARCADORES SÉRICOS MUSCULARES E CARDÍACOS DE CÃES SUBMETIDOS A EXERCÍCIO INTENSO E TREINAMENTO AERÓBIO

AUTORA: JULIANA APARECIDA CERQUEIRA

ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. RUTHNEA APARECIDA LÁZARO MUZZI
Departamento de Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária / Universidade Federal de Lavras / Lavras/MG

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de julho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Juliana Aparecida Cerqueira nasceu na cidade de São Paulo no dia 29 de agosto de 1987, filha de Silvio José Cerqueira e Sonia Maria Cerqueira. Realizou sua graduação em Medicina Veterinária na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas), campus Poços de Caldas, concluindo-a em julho de 2012. Foi bolsista MEC no Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na área de Clínica Médica Veterinária no período de março de 2013 a fevereiro de 2015, pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Bernardes Nogueira. Concluiu Programa de Especialização Lato sensu em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pelo Instituto Qualittas de Pós-Graduação no período de março de 2015 a fevereiro de 2017. Em março de 2016 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP/JABOTICABAL, na área de Clínica Médica Veterinária como bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Guilherme de Camargo Ferraz.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Silvio José Cerqueira e Sonia Maria Cerqueira.
Nenhuma homenagem é suficiente para agradecer todo amor que vocês me dão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que plantou em meu coração este sonho e sempre iluminou meus passos para que eu chegasse até aqui. O Senhor me deu forças e me fez perceber que não existe fraqueza ou obstáculos que se imponham à Sua vontade. Obrigada Pai por me amparar nas dificuldades e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais e maravilhosas como estas que eu agradeço aqui neste momento. Obrigada Santa Filomena e Santo Antônio pela intercessão e pela conquista de tantas graças.

Gostaria de agradecer aos meus pais Silvio e Sonia por todo amor, carinho, paciência e incentivo. Sou imensamente grata a Deus por ter o privilégio de ter pais tão maravilhosos. Sem vocês nada disso seria possível. Agradeço à minha irmã Carolina e meu cunhado Thiago pelo carinho e por terem me dado um dos maiores presentes da minha vida, minha Julinha. Obrigada Pecorrucha por me dar tanto amor e perdoa a titia, que nestes últimos meses tão conturbados não pôde dar a atenção que você merecia. Agradeço ainda à minha avó Ivone por todo incentivo e orações. Vocês são meu alicerce e, junto a Deus, o principal motivo desta conquista.

Não posso deixar de agradecer também uma pessoa muito especial, que há alguns meses tornou minha vida muito mais feliz, meu namorado Daniel. Obrigada, meu amor, por todo carinho e paz que você me dá.

Sou imensamente grata ao professor Guilherme de Camargo Ferraz, meu orientador, pela oportunidade de trabalhar nesta equipe, por acreditar em mim e em meu trabalho e por todo conhecimento compartilhado durante esses dois anos. Agradeço ao professor Antônio de Queiroz Neto, idealizador e fundador do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Exercício Equino (LAFEQ). Agradeço também à Maria Luiza por toda colaboração no projeto, mas principalmente pela amizade e carinho maternal comigo e com todos os membros do LAFEQ. Agradeço ao amigo Alejandro pela parceria no experimento, pela paciência e por todos os ensinamentos. Gostaria também de agradecer em especial à doutoranda Mayara pela ajuda em todas as fases do projeto, pelos conselhos e carinho, sendo uma das pessoas mais importantes para a conclusão do mesmo. Tenho carinho e admiração enormes por você. Um agradecimento especial aos alunos de iniciação Lucas e

Samara por toda ajuda: vocês foram fundamentais e se tornaram grandes amigos. Agradeço também à amiga Henriette por tanta ternura. Você mora no meu coração. Obrigada ao amigos Gabriel que fez esta caminhada muito mais divertida. Ao doutorando Walter pela parceria e pelos lindos gráficos e tabelas. À Fernanda, Manoela e Naila, sempre dispostas a ajudar. À Júlia, Patrícia Testa e Patrícia Sitta. Tenho muito orgulho de fazer parte deste time.

Ao professor Dr. Gener Tadeu Pereira do Departamento de Ciências Exatas da FCAV – UNESP – Câmpus Jaboticabal, pelo auxílio na análise estatística deste trabalho.

Agradeço ao professor Aulus Cavalieri Carciofi e toda a equipe do Laboratório de Nutrição e Doenças nutricionais da FCAV – UNESP – Câmpus Jaboticabal. Em especial à Thaila, Elaine e Diego por cuidarem tão bem dos nossos cães e por encontrarem-se sempre dispostos a nos ajudar.

Agradeço também à Renata e à Claudinha do Laboratório de Pesquisa do DCCV pelo aprendizado, paciência, disposição para ajudar nas análises sorológicas e principalmente pelo carinho que sempre tiveram comigo. Vocês são fantásticas!

A amizade é o sentimento humano que mais se aproxima de Deus. Ela se faz sem vínculos sanguíneos, simplesmente existe de uma forma natural. Nunca se está só quando se tem amigos de verdade. Eu fui abençoada com vários deles. Agradeço aos amigos de Lavras: Thaís, Marina, Lívia, Andressa, Carina, Tatiana, Paula, Amanda, Gisela, Patrícia, Mainá, Mariana, Rafael, Guilherme e Fernando. Às amigas do coração Caroline Belchior e Bárbara Pinheiro, que mesmo com a distância têm sempre meu amor e carinho eternos. Á professora Maria Alessandra que tem meu total carinho e admiração. Em especial às minhas amigas de república: Gabriela, Érica, Eveline, Lúcia e Caroline. Vocês são minha família em Jaboticabal e tenho carinho muito especial por cada uma de vocês. Obrigada por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo e conselhos, por aceitarem meus defeitos e por trazerem tanta alegria ao meu dia a dia.

Não menos importante, gostaria de agradecer aos cães que participaram deste projeto. Pela generosidade e cooperação, além do carinho demonstrado a cada segundo que trabalhamos juntos. Guardo cada um com muito amor no meu coração.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp, Câmpus Jaboticabal, pela oportunidade de desenvolver este trabalho junto a esta renomada instituição.

Agradeço ao CNPq pela ajuda financeira para o desenvolvimento do projeto de pesquisa, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Perfil hematológico dos animais ensaiados (valores de referência da população amostral)..... 43
- Tabela 2.** Correlações entre biomarcadores musculares creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e mioglobina, e os biomarcadores cardíacos troponina cardíaca I (cTnI) e creatina quinase MB (CK-MB) de cães da raça Beagle..... 54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do protocolo experimental. TEI = teste de esforço incremental inicial (TEI-1) e final (TEI-2); T = grupo treinado (participou de TEI-1, programa de condicionamento e TEI-2, n=6); NT = grupo não treinado (participou de TEI-1, TEI-2 e não participou de programa de condicionamento, n=5); S = grupo sedentário (não participou de TEI e não participou de programa de condicionamento); LL = limiar de lactato; VLL = velocidade no limiar de lactato..... 35

Figura 2. Relação típica entre a concentração plasmática do lactato e a velocidade (curva lactato-velocidade (CLV)) em teste de esforço incremental (TEI). Observar o aumento abrupto e exponencial da concentração plasmática de lactato (limiar de lactato (LL)). A velocidade no limiar de lactato (VLL) foi utilizada para elaborar o protocolo de condicionamento físico..... 39

Figura 3. Representação gráfica das curvas lactato-velocidade (CLV) de cães da raça Beagle submetidos a teste de esforço incremental (TEI) e condicionamento aeróbio durante 8 semanas, realizado a 70-80% da velocidade correspondente ao limiar de lactato (VLL). (A) T_{Antes} e T_{Depois} = cães que realizaram TEI e condicionamento; (B) NT_{Antes} e NT_{Depois} = cães que realizaram somente o TEI. Observar linhas de tendências exponenciais, sendo a para T_{Antes} , $Y = 0,4556^{e^{0,2911x}}$, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,96$; para T_{Depois} , $Y = 0,5614^{e^{0,1796x}}$, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,93$; NT_{Antes} , $Y = 0,7011^{e^{0,1181x}}$, $p < 0,0071$, $R^2 = 0,57$; NT_{Depois} , $Y = 0,6808^{e^{0,1006x}}$, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,92$. (A) Seta indica deslocamento à direita da CLV..... 45

Figura 4. Representação gráfica das médias \pm erros padrões das velocidades no limiar de lactato (VLL) (A) e velocidades na frequência cardíaca no momento da fadiga (VFC_{Fadiga}) (B) em cães da raça Beagle do grupo treinado (T, n= 6), submetidos a um protocolo de condicionamento aeróbio com duração de 8 semanas, realizado a 70-80% do LL, durante oito semanas, e do grupo não treinado (NT, n= 6), que não participou de programa de condicionamento. TEI-1 e TEI-2, testes de esforço incremental 1 e 2. * indica aumento da VLL e da VFC_{Fadiga} no TEI-2 em relação ao TEI-1 no grupo T ($P \leq 0,05$).# indica maior VLL e VFC_{Fadiga} do grupo T em relação ao grupo NT ($P \leq 0,05$)..... 46

Figura 5. Cinética da atividade enzimática sérica da creatina quinase (CK) de 17 cães da raça Beagle distribuídos entre os grupos treinado (T, n=6) e não treinado (NT, n=5), submetidos a teste de esforço incremental (TEI), e grupo sedentário (S, n=6). Letras maiúsculas representam diferença entre os grupos, enquanto letras minúsculas correspondem à diferença intragrupos, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Utilizou-se transformação logarítmica ($\log_e(x) + 1$) para a análise estatística..... 48

Figura 6. Cinética da atividade enzimática sérica da aspartato aminotransferase (AST) de 17 cães da raça Beagle distribuídos entre os grupos treinado (T, n=6) e não treinado (NT, n=5), submetidos a teste de esforço incremental (TEI), e grupo sedentário (S, n=6). Letras maiúsculas representam diferença entre os grupos, enquanto letras minúsculas correspondem à diferença intragrupos, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Utilizou-se transformação logarítmica ($\log_e(x) + 1$) para a análise estatística..... 50

Figura 7. Cinética da atividade enzimática sérica da creatina quinase isoenzima MB (CK-MB) de 17 cães da raça Beagle distribuídos entre os grupos treinado (T, n=6) e não treinado (NT, n=5), submetidos a teste de esforço incremental (TEI), e grupo sedentário (S, n=6). Letras maiúsculas representam diferença entre os grupos, enquanto letras minúsculas correspondem à diferença intragrupos, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Utilizou-se transformação logarítmica ($\log_e(x) + 1$) para a análise estatística..... 52

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Fisiologia do exercício.....	3
2.1.1 Limiar de lactato (LL).....	3
2.1.2 Frequência cardíaca (FC).....	5
2.2 Biomarcadores musculares.....	6
2.2.1 Creatina fosfoquinase (CK).....	6
2.2.2 Aspartato aminotransferase (AST).....	9
2.2.3 Mioglobina.....	10
2.3 Biomarcadores cardíacos.....	12
2.3.1 Troponina cardíaca I (cTnl).....	12
2.3.2 Creatina quinase isoenzima MB (CK-MB).....	15
3. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2 – Cinética de biomarcadores séricos musculares e cardíacos de cães submetidos a exercício intenso e treinamento aeróbio.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Animais.....	33
2.2 Grupos experimentais.....	36
2.3 Adaptação, TEI e programa de treinamento	36
2.4 Amostras de sangue.....	40
2.5 Frequência cardíaca.....	41
2.6 Análise estatística.....	41
3. RESULTADOS.....	42

3.1 Avaliação da aptidão física.....	44
3.2 Creatina fosfoquinase (CK).....	47
3.3 Aspartato aminotransferase (AST).....	49
3.4 Mioglobina e troponina cardíaca I (cTnI).....	51
3.5 Creatina quinase isoenzima MB (CK-MB).....	51
3.6 Correlação.....	53
4. DISCUSSÃO.....	55
5. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO I	66



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Determinação das atividades séricas de creatina quinase, aspartato aminotransferase e mioglobina urinária em cães saudáveis da raça Beagle submetidos a teste de esforço incremental**", protocolo nº 21324/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2015.

Vigência do Projeto	01/04/2016 a 31/08/2016
Espécie / Linhagem	Canina / Beagles
Nº de animais	15
Peso / Idade	11,4 a 15,1 Kg / 13 a 17 meses
Sexo	07 machos e 08 fêmeas
Origem	Canil do Laboratório de Nutrição e Doenças Nutricionais da FCAV da UNESP

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2015.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

CINÉTICA DE BIOMARCADORES SÉRICOS MUSCULARES E CARDÍACOS DE CÃES SUBMETIDOS A EXERCÍCIO INTENSO E TREINAMENTO AERÓBIO

Resumo - As principais alterações fisiológicas ou patológicas induzidas pelo exercício que ocorrem na musculatura esquelética ou cardíaca podem ser identificadas por meio de biomarcadores séricos. Consolidados em atletas da espécie humana e equina, são praticamente inexistentes em cães estudos sobre a dinâmica destes biomarcadores relacionados com a prática de exercício máximo e treinamento. Objetivou-se determinar a cinética dos biomarcadores séricos musculares creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), mioglobina; e cardíacos, troponina cardíaca I (cTnI) e creatina quinase isoenzima MB (CK-MB) de cães submetidos a esforço intenso e condicionamento aeróbio. A ação da venopunção sobre os biomarcadores também foi avaliada. Foram utilizados 18 cães hípidos da raça Beagle distribuídos em três grupos: sedentário (S), não treinado (NT) e treinado (T). Os cães foram submetidos a dois testes de esforço incremental (TEI-1 e TEI-2) para obtenção da curva lactato-velocidade (CLV). Verificou-se se a CLV teve modelo exponencial. O programa de treinamento foi realizado em esteira por 8 semanas na velocidade relacionada a 70-80 % do limiar de lactato (VLL). Determinou-se a velocidade correspondente a frequência cardíaca no momento da fadiga (VFC_{Fadiga}). Os biomarcadores séricos foram quantificados nos momentos basal, antes e 1, 6, 12, 24, 48 e 72 h após os TEIs. Aplicou-se análise de variância de dois fatores para amostras repetidas no tempo seguida por teste de Tukey e correlação de Pearson ($P \leq 0,05$). Elevação ($P \leq 0,05$) das velocidades correspondentes a VLL e VFC_{Fadiga} evidenciou melhora da aptidão aeróbia do grupo T. Observou-se aumento ($P \leq 0,05$) na atividade sérica de CK e AST, com valores máximos após 6 h em ambos os TEIs, com retorno aos valores basais após 12-24 h. Em conjunto, a avaliação do comportamento dos biomarcadores musculares revelou recuperação do tecido muscular após os TEIs. A cTnI e a mioglobina não se alteraram. A CK-MB apresentou pico de elevação ($P \leq 0,05$) após 1 h e retorno aos valores basais após 12 h em ambos os TEIs, apontando ausência de lesões musculares cardíacas. Observou-se forte correlação entre CK-AST ($P=0,849$) e correlação moderada entre CK-CK-MB (0,493) e AST-CK-MB (0,501). Parece que as atividades séricas da CK e AST podem sofrer interferência da venopunção jugular. Conclui-se que o exercício intenso provocou aumento fisiológico das atividades séricas das enzimas musculares e cardíacas com rápida recuperação, sem indicativo de lesões. O protocolo de condicionamento físico melhorou o rendimento dos cães, mas não influenciou a atividade sérica das enzimas musculares e cardíacas. Para o monitoramento desportivo em cães a CK-MB foi o biomarcador mais confiável.

Palavras-chave: teste de esforço incremental, creatina quinase, aspartato aminotransferase, mioglobina, troponina cardíaca I.

KINETICS OF MUSCLE AND CARDIAC SERUM BIOMARKERS OF DOGS SUBJECTED TO INTENSE EXERCISE AND AEROBIC TRAINING

Abstract - The main physiological or pathological alterations induced by exercise on skeletal or cardiac musculature can be identified using serum biomarkers. While studies on the dynamics of such biomarkers are consolidated in humans and horses, they are virtually inexistent on maximum exercise and training among dogs. This study aimed to determine the kinetics of the muscle serum biomarkers creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), and myoglobin and of cardiac biomarkers cardiac troponin I (cTnI) and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) of dogs subjected to intense effort and aerobic conditioning. The effect of venipuncture on the biomarkers was also assessed. Eighteen healthy Beagle dogs were assigned to three groups: sedentary (S), untrained (U), and trained (T). The dogs were subjected to two incremental effort tests (IET-1 and IET-2) so that their lactate vs. velocity curve (LVC) could be obtained. It was verified whether LVC followed an exponential model. The eight-week training program was carried out on a treadmill with speed set to 70-80% of the velocity at lactate threshold (VLT). The velocity corresponding to the heart rate at the moment of fatigue (VHR_{Fatigue}) was determined. Serum biomarkers were quantified at the baseline, before, and 1, 6, 12, 24, 48, and 72 h after the IETs. Two-factor analysis of variance was applied for samples repeated over time followed by Tukey's test and Pearson correlation ($P \leq 0.05$). The increase ($P \leq 0.05$) in the velocities corresponding to VLT and VHR_{Fatigue} indicated an improvement in aerobic fitness of group T. Serum activity of CK and AST increased ($P \leq 0.05$), reached maximum values after 6 h in both IETs, and returned to baseline levels after 12-24 h. As a whole, the assessment of the behavior of muscle biomarkers showed recovery of muscle tissues after the IETs. Levels of cTnI and myoglobin were unaltered. Peak CK-MB ($P \leq 0.05$) was observed 1 h into the IETs and returned to baseline levels 12 h after they finished, indicating no cardiac muscle lesions. A strong correlation between CK and AST ($P = 0.849$) and moderate correlations between CK and CK-MB (0.493) and AST and CK-MB were observed. Apparently, serum activities of CK and AST may be impacted by jugular venipuncture. It is concluded that intense exercise led to a physiological increase in serum activities of muscle and cardiac enzymes with rapid recovery and no apparent lesions. The physical conditioning protocol improved the performance of the dogs, but did not impact the serum activity of muscle and cardiac enzymes. CK-MB was the most reliable sports monitoring biomarker in dogs.

Key words: incremental exercise test, creatine kinase, aspartate aminotransferase, myoglobin, cardiac troponin I.

LISTA DE ABREVIACES

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

CLV - curva lactato-velocidade

CK - creatina quinase

CK-MB - creatina quinase isoenzima MB

cTnl - troponina cardíaca I

FA - fosfatase alcalina

FC - frequência cardíaca

FC_{Máx} - frequência cardíaca máxima

LAFEQ - Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Exercício Equino

LDH - lactato desidrogenase

LL - limiar de lactato

[lac] - concentrao de lactato

MCT - transportadores de monocarboxilatos

PSI - Puro Sangue Inglês

SNC - sistema nervoso central

TEI - teste de esforço incremental

$\dot{V}O_2$ - consumo de oxignio

$\dot{V}O_{2Mx}$ - capacidade aeróbia máxima

VLL - velocidade no limiar de lactato

VFC_{Fadiga} - velocidade na frequência cardíaca na fadiga

VFC_{Máx} - velocidade na frequência cardíaca máxima

$[\dot{V}O_2 = \dot{Q} \times (a - VO_2)]$ - equao de Fick, onde

\dot{Q} - débito cardíaco na equao de Fick

a - conteúdo de oxignio arterial na equao de Fick

VO₂ - teor de oxignio no sangue venoso na equao de Fick

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O treinamento esportivo de cães compreende um processo disciplinado e contínuo cujo objetivo final é maximizar a aptidão física, técnico-tática e comportamental, mediante a realização de exercícios sistemáticos com sessões de esforço com intensidades progressivas, planejados e prescritos individualmente (PELLEGRINO et al., 2014).

Apesar da aparente disponibilidade para se trabalhar com cães em ambiente experimental, até o momento, há poucos estudos com foco em fisiologia do exercício nesta espécie. A maior parte das pesquisas científicas está relacionada com as corridas de Greyhounds (ILKIW; DAVIS; CHURCH, 1989; STEISS et al., 2000; DUNLOP et al., 2011; LUCAS et al., 2015), cães de trenó (HINCHCLIFF et al., 1993; HINCHCLIFF et al., 1998; DUROCHER et al., 2006; MCKENZIE et al., 2007) e competições de agilidade canina (ROVIRA; MUNOZ; BENITO, 2007). A maioria destes estudos descreve a demanda fisiológica (*workload*), sendo as variáveis analisadas antes e após o exercício.

Desta forma, faz-se necessário a realização de estudos com cães, focando programas de condicionamento físico com a finalidade de se verificar os efeitos provocados nos diversos sistemas orgânicos, notadamente, nos compartimentos musculares, esquelético e cardíaco.

Uma vez realizada adequadamente a adaptação ao exercício em esteira, tanto os testes de esforço como programas de condicionamento físico são relativamente fáceis de realizar. Contudo, resultados práticos obtidos a partir de atletas da espécie canina submetidos a protocolo de treino padronizado, prescrito individualmente e reprodutíveis são escassos na literatura. Para este fim, o uso de esteira rolante motorizada mostra-se bastante vantajoso, uma vez que permite o controle da intensidade e duração do exercício, bem como das condições ambientais, o que facilita a padronização dos testes para avaliação da aptidão física (FERASIN; MARCORA, 2009).

Uma das maiores limitações dos testes de esforço descritos na literatura é a aparente falta de vontade dos cães para caminhar ou correr numa esteira sem um período de adaptação anterior (KITTLESON; JOHNSON; PION, 1996). Todavia, alguns estudos observaram que mesmo os cães não familiarizados ao ambiente laboratorial, sem nunca terem se exercitado em esteira rolante, podem participar deste tipo de exercício com sucesso (FERASIN; MARCORA, 2009). A utilização de esteira de alto desempenho para cães permite a avaliação, sob condições laboratoriais controladas, das respostas metabólicas e musculares esqueléticas, frente à prática de esforço físico. Adicionalmente, pode ser utilizada como fator adjuvante para protocolos de treinamento e terapêuticos para espécie canina.

Um biomarcador é uma substância produzida por um tecido específico que pode ser detectado no sangue. Deve apresentar elevada sensibilidade e especificidade e ser liberado em quantidade proporcional à evolução da alteração tecidual, de modo a indicar sua presença, gravidade e prognóstico (ETTINGER; PROSEK, 2010). Atualmente, a avaliação da bioquímica sérica é utilizada para o monitoramento rotineiro dos atletas da espécie humana e equina. Para estas espécies estão consolidados perfis ou padrões clínicos de biomarcadores musculares e cardíacos relacionados com a prática de exercício. Contudo, estes estudos são praticamente inexistentes em cães. Desta forma, a determinação de um padrão espécie-específico da dinâmica dos biomarcadores séricos após o esforço físico pode contribuir para diferenciação das respostas normais ou fisiológicas, daquilo que pode ser considerado patológico também nesta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia do exercício

Tendo em vista a gama de atividades desempenhadas pelos cães, sejam elas provas desportivas, atividade de busca e salvamento ou mesmo visando à melhora do condicionamento, torna-se necessário a determinação de variáveis para se avaliar a aptidão física destes animais. No homem e em equinos, a determinação da lactatemia e da frequência cardíaca (FC) durante os testes de esforço são bem conhecidas. No entanto, na espécie canina, pouco se sabe a respeito destas importantes variáveis fisiológicas, uma vez que os testes de esforço são empregados principalmente na cardiologia veterinária, com finalidade de diagnóstico e prognóstico (KITTLESON; JOHNSON; PION, 1996; FERASIN; MARCORA, 2007).

O exercício físico é o estímulo estressante mais fisiológico que existe, pois submete o organismo a grandes alterações nos biomarcadores séricos. Por exemplo, elevações no hematócrito que podem indicar condições mórbidas, relacionadas com hemoconcentração, decorrente de processos fisiopatogênicos que, na maioria das vezes, são revertidos somente por meio de intervenções terapêuticas podem, por outro lado, ocorrer durante a prática de exercício físico (GONDIN et al., 2013).

O esforço induz a liberação de catecolaminas que, ao promoverem a contração esplênica com liberação de hemácias para a circulação, proporcionam melhor perfusão tecidual, principalmente para o sistema nervoso central (SNC) e musculatura esquelética (INOUE et al., 2005). Neste caso, ao término do esforço físico ocorre recuperação e esta variável retorna ao seu valor basal, sem que a variação represente enfermidade.

2.1.1 Limiar de lactato (LL)

A concentração de lactato [lac] sanguíneo durante o exercício é o resultado da produção de lactato pelo músculo em contração, pelo seu transporte do músculo para a corrente sanguínea, bem como pela sua eliminação (FERASIN; MARCORA,

2009). Sua produção se inicia quando ocorre aumento da taxa muscular glicolítica anaeróbia para produzir energia necessária para sustentar a atividade física.

A relação exponencial entre a [lac] plasmática obtida a partir de um teste de esforço incremental (TEI) é uma ferramenta importante para o diagnóstico do condicionamento e prescrição de programas de exercício (FAUDE; KINDERMANN; MEYER, 2009; SOARES et al., 2014). A deflexão da curva lactato-velocidade (CLV), caracterizada pelo aumento abrupto da [lac] durante um TEI, representa o início do desequilíbrio entre a produção e a remoção de lactato (CAMPBELL, 2011). Essa deflexão é conhecida como “*onset blood lactate accumulation (OBLA)*” ou limiar de lactato (LL) (MIRANDA et al., 2014).

Segundo Ferasin e Marcora (2009), nos cães não é possível uma fácil identificação do LL tal como está descrito em equinos e humanos, ou seja, um aumento abrupto e sustentado do lactato sanguíneo. Estes pesquisadores não encontraram o ponto de deflexão da CLV, sendo este achado imputado pela possível diferença existente em cães, no que diz respeito à capacidade de transporte de lactato produzido pelo músculo para o sangue. Os autores especularam que o transporte de lactato pode ocorrer mais lentamente no cão, talvez pela densidade baixa dos transportadores de monocarboxilatos (MCT).

Contudo, recentemente, o LAFEQ (Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Exercício Equino), que possui experiência na determinação de testes para avaliação da aptidão física em atletas da espécie equina (FERRAZ et al., 2009; MIRANDA et al., 2013; SOARES et al., 2014), conseguiu determinar o LL, por meio da CLV também em cães (ADAMS et al., 2015; RESTAN et al., 2015; TRISTÃO et al., 2015). Adams et al. (2015) e Tristão et al. (2015), ao utilizarem protocolos de TEI e programa de condicionamento aeróbio em Beagles cardiopatas, evidenciaram melhora da capacidade aeróbia constatada no teste de esforço final após obtenção de maiores velocidades no LL (VLL). Em cães com insuficiência cardíaca congestiva (ICC), na aplicação do TEI, Ferasin e Marcora (2007) também constataram aumento na capacidade física individual após a prescrição do treinamento.

Em cães hígidos submetidos a um protocolo de treinamento em esteira, cinco vezes por semana, durante quatro semanas, Pascon (2009) evidenciou que o programa de treinamento proposto foi capaz de melhorar o condicionamento físico,

bem como outros parâmetros cardiovasculares, tais como elevação da ativação parassimpática, redução de índices indicadores de pré-carga, pós-carga e melhorar a função diastólica. A melhora da capacidade física desses animais, nos estudos citados, envolve a compreensão dos supostos benefícios ao coração, musculatura esquelética e função vascular, já bem descritos para o exercício físico (CONRAADS et al., 2013; PHILLIPS et al., 2015).

2.1.2 Frequência cardíaca (FC)

Do ponto de vista fisiológico, durante o esforço, a capacidade aeróbia está relacionada ao débito cardíaco por meio da clássica equação de Fick [$\dot{V}O_2 = \dot{Q} \times (a - VO_2)$]. Durante o exercício físico, a FC se relaciona linearmente com o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$). Esta relação é linear com a velocidade do exercício. Dessa forma, o monitoramento da FC pode ser utilizado para estimar indiretamente o $\dot{V}O_2$, e constitui ferramenta útil para avaliação indireta da capacidade aeróbia (BERKMAN et al., 2015).

A frequência cardíaca máxima (FC_{máx}) é considerada o valor mais elevado da FC durante um esforço máximo até a fadiga, sendo utilizada como um dos critérios de verificação do esforço máximo em testes ergométricos progressivos (DENADAI; GRECO, 2005).

Em cavalos puro sangue inglês (PSI), foi observado forte correlação também entre velocidade na FC_{máx} (VFC_{máx}) e consumo de oxigênio máximo ($\dot{V}O_{2\text{máx}}$), demonstrando que a VFC_{máx} pode ser utilizada para avaliação da aptidão física (GRAMKOW; EVANS, 2006). Neste estudo, foi observado que os cavalos que atingiram velocidades mais altas na FC_{máx} são capazes de postergar a fadiga, ou seja, são capazes de alcançar velocidades maiores com menor dependência de glicólise anaeróbia, apresentando assim melhor desempenho (GRAMKOW; EVANS, 2006).

Contudo, a relação entre VFC_{máx} e desempenho, bem como de outros parâmetros utilizados para avaliar a aptidão física, depende do tipo de exercício realizado, visto a diferença na utilização de energia aeróbia durante a intensidade máxima. Em cães, não foram encontrados estudos envolvendo a VFC_{máx} durante o

exercício. Todavia, baseando-se nos princípios de fisiologia do exercício, acredita-se que VFC_{máx} seja um bom preditor de *endurance* também na espécie canina.

2.2 Biomarcadores musculares

O exercício induz uma variedade de alterações reversíveis e fisiológicas em cães (ROVIRA; MUNOZ; BENITO, 2008; PICCIONE et al., 2012; LUCAS et al., 2015), podendo a avaliação dessas variações servir para compreender as vias metabólicas envolvidas e as adaptações fisiológicas que são induzidas por diferentes tipos de exercício (PICCIONE et al., 2012).

Em relação à fibra muscular esquelética, os microtraumas gerados pelo esforço resultam na liberação de proteínas intracelulares como mioglobina, e enzimas como a creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) para a corrente sanguínea (SILVA; MACEDO, 2011), sendo a análise da atividade destes biomarcadores extremamente útil para o diagnóstico de danos do músculo esquelético (LUCAS et al., 2015).

O aumento da atividade plasmática dos biomarcadores musculares muda durante o exercício, provavelmente, como consequência de um metabolismo muscular aumentado e mudanças transitórias na permeabilidade da membrana celular, sem que para isso tenha que ocorrer lesão significativa das fibras musculares (ROVIRA; MUNOZ; BENITO, 2008).

2.2.1 Creatina quinase (CK)

Do ponto de vista bioenergético muscular, o sistema fosfagênio, representado pelos estoques de creatina fosfato, fornece um grupamento fosfato para produção de ATP durante o início e nos primeiros segundos de contração muscular. Esta reação é catalisada pela CK. Esta enzima é classicamente monitorada na espécie humana (STONE et al., 2017) e equina (FERRAZ et al., 2010).

A CK é primariamente encontrada no músculo esquelético, no miocárdio e no tecido cerebral (AKTAS et al., 1993), sendo considerada por muitos autores como o melhor indicador de danos musculares (AKTAS et al., 1993; CHANOIT et al., 2002).

Trata-se de uma molécula constituída por duas subunidades, M e B, que são imunologicamente distintas e sintetizadas por genes diferentes (AKTAS et al., 1993). Existem três isoenzimas formadas por estas subunidades: CK-BB, predominante no cérebro e sistema digestório; CK-MB, presente no tecido cardíaco, nos rins, nos intestinos e nos pulmões; e CK-MM, presente no músculo estriado (AKTAS et al., 1993).

É conceito estabelecido na literatura que exercícios de alta intensidade podem provocar elevações da atividade sérica da CK (MCGOWAN, 2008), sendo relacionadas a dano ou aumento transitório de permeabilidade do sarcolema (TEIXEIRA-NETO et al., 2008). Alguns autores utilizam o estudo da CK para avaliação de treinamento, sendo preconizada avaliação de até 24 horas após o exercício para diferenciação entre cavalos com resposta fisiológica daqueles com respostas mórbidas (LINDNER et al., 2006).

Segundo Cardinet (1997), os valores normais de CK nos animais domésticos podem variar com a atividade física, idade e sexo, entre outros. Meyer, Coles e Rich (1992) citaram valores de normalidade de CK para cães entre 20 e 200 U/L. Um levantamento realizado por Aktas et al. (1993) observou valores médios em cães da raça Beagle entre 4 e 118 U/l, comparando oito estudos, relatando grande variação individual na atividade sérica normal dessa enzima para a espécie canina.

Outros fatores também podem interferir na atividade deste biomarcador e devem ser considerados na avaliação da mesma. Segundo Stockham (1995), amostras mal coletadas e manuseadas inadequadamente podem resultar em um aumento nos valores de CK, uma vez que a venopunção inadequada pode lesionar as fibras musculares circundantes. Também a hemólise "in vitro" ou, ainda, a demora para remoção do soro, também podem produzir uma falsa elevação nos valores de CK, visto que os eritrócitos contêm substâncias como adenilatoquinase e glicose-6-fosfato que interferem com os resultados deste biomarcador (STOCKHAM, 1995).

Em humanos, a atividade sérica da CK é comumente utilizada como marcador bioquímico para o diagnóstico de rabdomiólise. Elevações acima de cinco vezes o limite superior do intervalo de referência é considerado sugestivo desta afecção muscular (MELLI; CHAUDHRY; CORNBATH, 2005). As maiores atividades

da CK pós-exercício são observados nos exercícios físicos prolongados tais como maratona e triathlon, podendo atingir 50 vezes os valores referenciais (ROSS et al., 2009).

Ainda em relação à rabdomiólise, em cães de trenó após provas de resistência, foram observados valores de CK de 336 a 12420 U/L com atividade média de 5080 U/L. Nestes cães, a atividade de CK atinge pico entre dois a três dias, com elevada incidência desta afecção (MCKENZIE et al., 2007). A rabdomiólise exercicional também é descrita em corridas curtas de Greyhounds (WODECKI; HEINRICH, 1993). No que tange seu comportamento frente ao exercício na espécie canina, Chanoit et al. (2002), ao estudarem Beagles saudáveis sem treinamento prévio, submetendo-os a corrida por 60 minutos, não verificaram alterações significativas em CK e AST imediatamente após o exercício.

Todavia, Rovira, Munoz e Benito (2008) observaram elevação discreta de CK e AST após 30 minutos de exercício de busca e resgate em terreno aberto com duração de 20 minutos. Os mesmos pesquisadores (2007) mais uma vez observaram elevações discretas, 30 minutos após prova de agilidade canina. Elevações sutis também foram relatadas por Matwichuk et al., (1999), após protocolo de exercício intenso com duração de dez minutos em Labradores Retrievers. Em contrapartida, em estudo com Greyhounds de corrida, observaram elevações significativas de CK ($584,19 \pm 695,88$ U/L), e de AST ($57,66 \pm 32,96$ U/L), quando as amostras foram coletadas 24 horas após corrida (LUCAS et al., 2015).

Segundo Ducan, Prasse e Mahaffey (1982), a atividade sérica de CK atinge valores máximos em 12 horas, retornando a valores basais 24 a 48 horas depois de cessar a alteração de permeabilidade muscular. Chanoit et al. (2002) ao avaliarem seis Beagles destreinados em pista de corrida durante uma hora (velocidade média de 9 km/h), observaram pico de atividade de CK após três horas, com elevações moderadas ($151 \pm 58,8$ U/L no pico), e retorno a valores basais após 24 horas.

Esta diferença observada entre os estudos se deve ao fato de que, no geral, estas respostas dependem de fatores como protocolo utilizado, intensidade, volume e a frequência de exercícios empregados, momentos de coleta após o exercício, o número e o nível de aptidão dos sujeitos constituintes da amostra dentre outros (SILVA; MACEDO, 2011).

No que diz respeito ao condicionamento, sabe-se que treinamentos diários podem resultar em aumentos séricos persistentes de CK (KRATZ et al., 2002), e que seus valores em repouso são maiores em atletas humanos (FALLON et al., 1999). Além disso, quando atletas e sedentários realizam testes de exercício físico semelhante, as atividades de biomarcadores musculares nos atletas são menores que os registrados em indivíduos sedentários (KARAMIZRAK et al., 1999). Na espécie canina até o momento não há registros do comportamento dos biomarcadores musculares em diferentes estágios de condicionamento.

2.2.2 Aspartato aminotransferase (AST)

A AST é encontrada principalmente no fígado, nos eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco. Por ser uma enzima presente no citoplasma e nas mitocôndrias, necessita de uma lesão maior para ser liberada na corrente sanguínea. Em contrapartida, CK e LDH, por serem enzimas presentes no citoplasma e apresentarem menor tamanho, conseguem ultrapassar a membrana celular mesmo que não exista um dano tecidual muito grande, ou seja, um simples aumento na permeabilidade de membrana é suficiente para que ocorra o extravasamento destas enzimas. Desta forma, valores de CK elevam-se primeiro que os da AST, sendo que a CK é também a primeira a regressar a valores normais. A interpretação dos valores destas duas enzimas pode ser uma fonte de informação quanto à duração ou fase da lesão (TEIXEIRA-NETO et al., 2008).

No que diz respeito ao exercício, em estudo com Greyhounds de corrida, amostras de sangue coletadas 24 horas após o exercício, apresentaram elevações discretas de AST ($57,66 \pm 32,96$ U/L) (LUCAS et al., 2015). Já corridas de cães de trenó, evidenciaram elevações de 24 ± 7 U/L para 137 ± 97 U/L após dois dias de prova (FRANK et al., 2015), e de $26,7 \pm 8,4$ U/L para $140,2 \pm 120$ U/L após cinco dias de maratona de longa distância (WAKSHLAG et al., 2010).

Em cães de busca e salvamento em treinamento com duração de 20 minutos, não foi observado elevações na atividade deste biomarcador ($31,5 \pm 6,25$ U/L) (ROVIRA; MUNOZ; BENITO, 2008), bem como em provas de agilidade canina ($23 \pm 6,7$ U/L) (ROVIRA; MUNOZ; BENITO, 2007), demonstrando que elevações na

concentração sérica de AST, assim como de CK, dependem do tipo de exercício, duração e distância percorrida (MCKENZIE et al., 2007).

Em equinos, estudo realizado com animais da raça Quarto de Milha, a atividade sérica de AST, no repouso, foi de 208,5 U/L e, após prova de Team Penning, a atividade sérica alcançou valores de 231,2 U/L (MIRANDA et al., 2009). Já em outro estudo com equinos finalistas de provas de enduro, foram encontrados valores basais de AST de 313,9 U/L e, após o exercício, de 455,2 U/L, respectivamente (SALES et al., 2013).

2.2.3 Mioglobina

A mioglobina é uma protoporfirina dimérica encontrada nos músculos estriados esquelético e cardíaco. Perfusão tecidual inadequada ou trauma podem levar à liberação de mioglobina na corrente sanguínea. Na prática médica, é utilizada principalmente como ferramenta diagnóstica precoce no infarto agudo do miocárdio (COLLINSON; STUBBS; KESSLER, 2003), apresentando elevação na concentração plasmática após uma a três horas em quadros de necrose miocárdica, com picos entre seis e nove horas, retornando à normalidade em períodos inferiores a 24 horas (SALLACH et al., 2004).

Em relação ao exercício, em humanos foi observada elevação significativa da mioglobina sérica após provas de triatlão (THOMAS; MOTLEY, 1984), maratonas de corrida (SIEGEL et al., 2001; APPLE et al., 2002; GERTH et al., 2002; SMITH et al., 2004) e em exercício de elevada intensidade (FEASSÓN et al., 2002; CLARKSON et al., 2006). Peake et al. (2004) observaram valores médios de mioglobina sérica de 90 ng/mL uma hora após exercício de corrida moderado (60% do VO_2 máx) e de 258 ng/mL após exercício de alta intensidade (85% do VO_2 máx).

Em cavalos submetidos a teste de esforço submáximo, a mioglobina plasmática apresentou elevação após o exercício, com pico após 5 minutos. As concentrações plasmáticas diminuíram rapidamente, retornando aos valores basais 24 horas após o exercício (VALBERG et al., 1993). Já em outro estudo com equinos submetidos a exercício de rápida aceleração e curta duração, considerado de alta

intensidade, foram observadas elevações muito sutis da mioglobina sérica, com ausência de aumento significativo (YONEZAWA et al., 2010).

Estudos de mioglobinemia na espécie canina são bastante escassos e até o momento não há valores de referência para a espécie (FRANK et al., 2015). Sua meia-vida é significativamente curta (aproximadamente nove minutos), devido à rápida depuração renal (AKTAS et al., 1993). Segundo Carretón et al. (2011) a elevação plasmática da mioglobina em cães não é considerada clinicamente útil devido à sua baixa especificidade, eliminação rápida e baixa incidência dos níveis de doença cardíaca isquêmica nesta espécie.

Todavia, diversas pesquisas têm demonstrado concentrações elevadas de mioglobina sérica em cães em variadas patologias. Estudo em cães infectados com *Dirofilária immitis* demonstrou concentrações séricas elevadas (média de 93 ng/mL) em cães infectados, notadamente em cães com microfilaremia (média 273 ng/mL) (CARRETÓN et al., 2011). Outro estudo semelhante demonstrou valores séricos elevados de mioglobina na dirofilariose canina, considerando valores patológicos acima de 54 ng/mL (CARRETÓN et al., 2012).

Em cães com torção vólvulo-gástrica também foi observada elevação das concentrações séricas de mioglobina, bem como uma diferença significativa dos valores entre sobreviventes (74 ng/mL) e não sobreviventes (238 ng/mL) após o diagnóstico. A elevação foi associada à distensão gástrica, elevação da pressão abdominal e diminuição do retorno venoso, que levam à redução do débito cardíaco, hipotensão sistêmica e hipóxia (ADAMILK et al., 2009).

Burgener et al. (2006) também observaram elevação sérica da mioglobina em cães após 48 horas do diagnóstico de torção vólvulo-gástrica (47 a 700 ng/mL) e no trauma torácico (118 a 700 ng/mL). Estudo envolvendo cães hipotensos demonstrou elevação rápida da mioglobina. A taxa linear de aumento de mioglobina arterial durante a primeira hora de reperfusão foi de 51 ± 16 ng/mL/minuto (SPANGENTHAL; ELLIS, 1995).

Foi encontrado apenas um estudo envolvendo a mensuração da mioglobina sérica durante o exercício na espécie canina. Em cães de trenó em provas de resistência, foram observados valores médios de mioglobina de 90,8 ng/mL após dois dias de prova (aproximadamente 153 km), evidenciando que este tipo de

exercício é capaz de promover elevações globais dos marcadores musculares, tais como CK, AST, ALT e mioglobina (FRANK et al., 2015). Neste mesmo estudo, o aumento da mioglobina foi moderadamente correlacionado com o aumento da CK. Sendo a falta de correlação forte relacionada às diferenças observadas na meias-vidas de CK (horas) e mioglobina (minutos) em cães. Estudos mostrando fortes correlações entre CK e mioglobina foram observados em humanos em provas de triatlón (THOMAS; MOTLEY, 1984).

2.3 Biomarcadores cardíacos

Na Medicina Veterinária os biomarcadores cardíacos são utilizados como ferramenta diagnóstica e prognóstica (OYAMA, 2013). Os biomarcadores cardíacos podem indicar lesão das células miocárdicas, sendo liberados quando há ruptura de miócitos, ou ainda indicar estresse miocárdico, sendo liberado quando ocorre estiramento do tecido muscular cardíaco (BOSWOOD, 2007). A mensuração de suas atividades séricas é útil em situações como diferenciação entre causas cardíacas e não cardíacas de dispneia e tosse, lesão miocárdica isquêmica, trauma torácico, miocardite, cardiotoxicidade de fármacos, e no diagnóstico de doença cardíaca assintomática, permitindo intervenção terapêutica precoce (ETTINGER; PROSEK, 2010).

2.3.1 Troponina Cardíaca I (cTnI)

As troponinas têm recebido crescente atenção como marcadores específicos de injúria celular miocárdica em humanos e, atualmente, são consideradas como os preferíveis de injúria cardíaca em mamíferos (LAVECCHIO et al., 2009). As troponinas cardíacas são exclusivamente expressas no miocárdio e têm se mostrado mais sensíveis e específicas do que outros marcadores séricos empregados anteriormente para o diagnóstico não invasivo de necrose miocárdica (FERRASIN; MARCORA, 2007; OYAMA, 2013), sendo pouco provável que sua elevação esteja relacionada à reação cruzada com músculo esquelético (O'BRIEN et al., 2006).

Devido à elevada sensibilidade e especificidade, a cTnI é uma importante ferramenta para o diagnóstico precoce do infarto agudo do miocárdio em humanos.

Embora o infarto agudo do miocárdio seja raro em cães, elevadas concentrações de cTnI têm sido associadas a muitas outras doenças clinicamente relevantes nesta espécie, tais como, doenças cardíacas congênitas e adquiridas (OYAMA; SISSON, 2004; SPRATT et al., 2005; BURGENER et al., 2006; NEWBY et al., 2012), efusão pericárdica (SHAW; RAOZANSKI; RUSH, 2004), dirofilariose (CARRETÓN et al., 2011; 2012; 2013), cardiomiopatia arritmogênica do Boxer (BAUMWART; ORVALHO; MEURS, 2007), contusão cardíaca (SCHOBER; KIRBACH; OECHTERING, 2009) e associada a doenças não cardíacas, mas que afetam o coração, como dilatação vólculo-gástrica (SCHOBER et al., 2002), piometra (HAGMAN et al., 2007; PEREIRA et al., 2016), insolação (MELLOR et al., 2006), insuficiência renal (PORCIELLO et al., 2008; SHARKEY et al., 2009), babesiose (LOBETTI et al., 2012), dentre outras. Todavia, segundo Santos et al. (2011), cães e gatos saudáveis podem não apresentar atividade de cTnI detectáveis na circulação. Alguns animais podem apresentar traços, ou seja, concentrações geralmente inferiores a 0,1ng/mL.

Embora haja muitos estudos que relatam elevação da concentração sérica de troponina após atividade física, não há um consenso sobre a prevalência, mecanismos e significado clínico da liberação de troponina induzida pelo exercício. Teorias sugerem que elevações nas concentrações de cTnI podem ser explicadas por uma leve hipóxia durante o exercício. Esta hipóxia poderia provocar uma alteração na permeabilidade do miocárdio, resultando numa fuga de macromoléculas na corrente sanguínea (NOSTELL; HÄGGSTÖM, 2008). Em ratos, foi observado que períodos curtos de hipóxia podem induzir a liberação de cTnI sem morte celular (PIPER et al., 1984). Desta forma, especula-se que esta liberação seja um processo benigno e que não esteja relacionada com necrose miocárdica (MARTINS, 2009; SHAVE et al., 2010). Contudo, novos estudos que investiguem o miocárdio durante e após o exercício devem ser conduzidos para validar esta hipótese (THARWAT; AL-SOBAYIL; BUCZINSKI, 2013).

Ao avaliar o exercício intenso de curta duração em esteira de alta velocidade em equinos, verificou-se que as concentrações máximas de cTnI ocorrem três a seis

horas após o exercício. Contudo, as elevações das concentrações séricas apresentam-se no limite superior das concentrações consideradas normais para a espécie (DURANDO et al., 2006).

Estudo com galgos de corrida apresentaram elevações discretas da cTnI (0,02 a 0,14 ng/mL), com pico duas horas após a corrida (7 km) e retorno aos valores basais após 24 horas (média 0,05 ng/mL) (THARWAT; AL-SOBAYIL; BUCZINSKI, 2013).

Já em estudos relacionados ao exercício de alta intensidade, avaliando a cTnI em repouso e após provas de enduro em equinos hípidos, foi observado aumento significativo na concentração sérica após a atividade física, sugerindo lesão miocárdica (HOLBROOK et al., 2006; NOSTELL; HÄGGSTRÖM, 2008). Também em atletas humanos, provas de enduro foram relacionada às elevações da cTnI (OKEEFE et al., 2012).

Ainda no contexto de exercício de alta intensidade, concentrações de cTnI em cães de trenó que participaram de provas de resistência de longa distância, foram encontradas bem acima do intervalo de referência estabelecido para a espécie (0,1 ng/mL). Estes cães percorreram 100 milhas diárias durante cinco dias e elevam consideravelmente as concentrações de cTnI (média 1,2 ng/mL) após o exercício diário (MCKENZIE et al., 2007).

Em outro estudo com cães de trenó em prova de duração moderada (dois dias), foi observado elevações discretas das concentrações séricas de cTnI imediatamente após o exercício (WAKSHLAG et al., 2010). Desta forma, observa-se que a atividade sérica de cTnI está diretamente relacionada à intensidade e duração do exercício.

Em atletas humanos após exercício máximo em esteira, não foram observadas elevações séricas das troponinas cardíacas (SHAVE et al., 2010).

Nostell e Häggström (2008) e Shave et al. (2010) dão ênfase na importância de considerar o momento de coleta da amostra após a atividade física, tipo de treinamento instituído e teste envolvido para avaliar o comportamento deste biomarcador quando relacionado à sua aplicabilidade em exercícios.

2.3.2 Creatina quinase isoenzima MB (CK-MB)

Outro biomarcador cardíaco intensamente utilizado na espécie canina é a creatina quinase – isoenzima MB (CK-MB). Quando ocorre necrose do miocárdio, há liberação desta isoenzima para o meio extracelular e sua dosagem representa um recurso importante para a detecção de lesão cardíaca nesta espécie (DINIZ; SCHWARTZ; COLLICCHIO-ZUANAZE, 2007).

Em humanos, a dosagem da CK-MB é utilizada como principal método para confirmação ou exclusão do infarto agudo do miocárdio e sua elevação pode indicar eventos cardíacos desfavoráveis em populações de alto risco (DE PAIVA et al., 2011). Em medicina veterinária é utilizada para avaliar cardiotoxicidade de fármacos e em protocolos experimentais de intoxicações (DINIZ; SCHWARTZ; COLLICCHIO-ZUANAZE, 2007; FREITAS et al., 2015).

O aumento da atividade sérica da CK-MB foi relatado em cães com comprometimento miocárdico secundário à parvovirose, dirofilariose, endocardite, cardiomiopatia hipertrófica, trauma torácico (SCHOBER et al., 1999; DINIZ; SCHWARTZ; COLLICCHIO-ZUANAZE, 2007) e degeneração mixomatosa da válvula mitral, podendo ser utilizado como parâmetro na detecção de lesão cardíaca e prognóstico desta cardiopatia (BAKIREL; GUNES, 2009). Segundo Pino et al., (2008), a hipóxia instalada nas doenças cardiovasculares ocasiona instabilidade e altera a permeabilidade da membrana dos miócitos, acarretando a elevação desta enzima no soro.

Contudo, é relatada considerável dificuldade para quantificar a CK-MB, que pode ser mensurada tanto por sua atividade sérica, por meio de testes bioquímicos (CK-MB atividade), quanto por sua concentração total (CK-MB massa), por meio de ensaios imunométricos. Enquanto a dosagem de CK-MB determina a atividade da enzima, o teste de CK-MB massa detecta sua concentração, independentemente de sua atividade, o que torna o CK-MB massa mais confiável, uma vez que apresenta melhor sensibilidade analítica, pois detecta enzimas ativas e inativas. A literatura veterinária é escassa em relatos de dosagem de CK-MB massa em cães e há poucos valores de referência para esta isoenzima, o que dificulta sua utilização na rotina veterinária (FREITAS et al., 2015). Ferreira et al. (2011) bem como Santos et

al. (2011) encontraram valores de normalidade inferiores a 20 U/L. Freitas et al. (2015) consideraram valores de normalidade entre 20,7 a 24,6 U/L para a espécie canina.

No que diz respeito ao exercício, estudo com cães saudáveis submetidos a um treinamento aeróbico observou, por cromatografia, aumento significativo na CK-MB no miocárdio do ventrículo esquerdo, atribuindo tal achado à hipertrofia cardíaca compensatória, resultado de uma resposta adaptativa favorável (STUEWE; GWIRTZ; MALLETT, 2001). Em estudo com Greyhounds de corrida, apenas cinco dos 32 cães avaliados apresentaram aumentos tênues nas concentrações plasmáticas de CK-MB após competição e, 24 horas após o término, estes mesmos animais já apresentaram valores estatisticamente semelhantes aos basais (THARWAT; AL-SOBAYIL, BUCZINSKI, 2013). Sabe-se ainda que a liberação da isoenzima MB ocorre de forma aguda, apresentando rápida inativação quando comparada as demais isoenzima (SCHOBER, 2005).

Em equinos, análise do soro e dos tecidos quanto à porcentagem de composição das isoenzimas da CK observaram quantidade de CK-MB muito pequena presente no coração (1,4% da CK total) e sugeriram que a determinação da isoenzima MB no soro de equinos não tem valor na detecção de lesão cardíaca. Além disso, a mensuração da atividade sérica da isoenzima CK-MB apresenta limitações baseadas na meia-vida curta e reatividade cruzada com o músculo esquelético também nesta espécie (MICHIMA; MIRANDOLA; FERNANDEZ, 2010).

Também nos cães, Schober (2005) considera que a CK-MB não seja um marcador cardíaco adequado por ser pouco específico para essa espécie, representando de 4 a 13% da atividade total da CK no miocárdio canino. Além do tecido cardíaco, a CK-MB também é encontrada nos pulmões, intestino, rins e musculatura esquelética.

Michima, Mirandola e Fernandez (2010) acreditam que a utilização da CK-MB como único marcador cardíaco não traz informações relevantes a respeito da integridade cardíaca sob influência do exercício. Contudo, quando associada à cTnI, a CK-MB pode aumentar sua especificidade na detecção de alteração miocárdica (YONEWAZA et al., 2010).

Neste trabalho avaliaram-se algumas enzimas, como a CK, AST e CK-MB. Tanto na espécie humana (STONE et al., 2017) como na equina (TEIXEIRA-NETO et al., 2008), os estudos da cinética destas enzimas foram realizados. Ademais, os cães participaram de um programa de condicionamento submáximo numa intensidade de 70-80% do LL em esteira. Os resultados desta pesquisa podem servir de base para outros estudos com a espécie canina. Desta forma, o segundo capítulo da presente dissertação abordará alguns métodos para determinação da capacidade aeróbia de cães, bem como a cinética de alguns biomarcadores cardíacos e musculares frente ao exercício. A versão em inglês deste artigo será enviada para o periódico **Research in Veterinary Science**.

3. REFERÊNCIAS

ADAMIK, K. N.; BURGENER, I. A.; KOVACEVIC, A.; SCHULZE, S. P.; KOHN, B. Myoglobin as a prognostic indicator for outcome in dogs with gastric dilatation-volvulus. **Journal of veterinary emergency and critical care**, v. 19, n. 3, p. 247-253, 2009.

ADAMS, F. K.; TRISTÃO, A. P.; RESTAN, W. A. Z.; ROSA, F. A. H. G.; FERRAZ, G. C.; SOUSA, M. G.; CAMACHO, A. A. Heart rate variability in dogs with myxomatous mitral valve disease undergoing treadmill exercise. In: ACVIM Forum Research Abstract Program, 2015, Indianápolis. **Anais...** ACVIM Forum Research Abstract Program, 2015. v. 29. p. 1150-1151.

ALLEN, S.; HOLM, J. Lactate: physiology and clinical utility. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 2, p. 123-132, 2008.

AKTAS, M.; AUGUSTE, D.; LEFEBVRE, H. P.; TOUTAIN, P. L.; BRAWN, J. P. Creatine kinase in the dog: a review. **Veterinary research communications**, v. 17, n. 5, p. 353-369, 1993.

APPLE, H. E. Q.; OTTO, A. P.; MATHEWS, W. E.; MURAKAMI, M. A. M. Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 1097-1100, 2002.

BAKIREL, U.; GUNES, S. Value of cardiac markers in dogs with chronic mitral valve disease. **Acta veterinaria**, v. 59, n. 2-3, p. 223-229, 2009.

BAUWART, R. D.; ORVALHO, J.; MEURS, K. M. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **American journal of veterinary research**, v. 68, n. 5, p. 524-528, 2007.

BERKMAN, C.; TEIXEIRA, L. G.; PEREIRA, M. C.; SAMPAIO, R. D. C. D. L.; BERNADI, N. S.; LACERDA-NETO, J. C. D.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G. D. C. Distance exercised during submaximal training on race winnings for Thoroughbred racehorses. **Ciência Rural**, v. 45, n.7, p. 1268-1273, 2015.

BOSWOOD, A. Laboratory tests for the diagnosis of heart disease and failure in dogs and cats. In: The World Small Animal Veterinary Association, **Proceedings WSAVA**, 2007.

BURGENER, I. A.; KOVACEVIC, A.; MAULDIN, G. N.; LOMBARD, C. W. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 20, n. 2, p. 277-283, 2006.

CAMPBELL, E. H. Lactate-driven equine conditioning programmes. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. 199-207, 2011.

CARDINET, G.H. Skeletal muscle function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. London: Academic Press, 1997. p 407-440.

CARRETÓN, E.; CORBERA, J. A.; JUSTEA, M. C.; MORCHÓN, R.; SIMÓN, F.; MONTOYA-ALONSO, J. A. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. **Veterinary parasitology**, v. 176, n. 4, p. 313-316, 2011.

CARRETÓN, E.; GRANDI, G.; MORCHÓN, R.; SIMÓN, F.; PASSERIB, B.; KRAMER, C. L.; MONTOYA-ALONSO, J. A. Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 189, n. 2, p. 390-393, 2012.

CARRETÓN, E.; MORCHÓN, R.; GONZALES-MIGUEL, J.; JUSTE, M. C.; SIMÓN, F.; MONTOYA-ALONSO, J. A. Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 1, p. 244-250, 2013.

CHANOIT, G. P.; CONCORDET, D.; LEFEBVRE, H. P.; ORCEL, K.; BRAUN, J. P. Exercise does not induce major changes in plasma muscle enzymes, creatinine, glucose and total proteins concentrations in untrained beagle dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series**, v. 49, n. 4, p. 222-224, 2002.

CLARKSON, P. M.; KEARNS, A. K.; ROUZIER, P.; RUBIN, R.; THOMPSON P. D. Serum creatine kinase levels and renal function measures in exertional muscle damage. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 38, n. 4, p. 623, 2006.

COLLINSON, P. O.; STUBBS, P. J.; KESSLER, A. C. Multicentre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T, CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice. **Heart**, v. 89, n. 3, p. 280-286, 2003.

CONRAADS, V. M.; VAN CRAENENCROECK, E. N.; MAEYER, C.; VAN BERENDONCK, A. M.; BECKERS, J.; VRINTS, C. J. Unraveling new mechanisms of exercise intolerance in chronic heart failure. Role of exercise training. **Heart failure review**, v.18, p.65-77, 2013.

DENADAI, B. Sérgio.; GRECO, C. C. **Prescrição do treinamento aeróbio: teoria e prática**. Guanabara Koogan, 2005.

DIBARTOLA, S. P.; TASKER, J. B. Elevated serum creatine phosphokinase: a study of 53 cases and a review of its diagnostic usefulness in clinical veterinary medicine. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 1977.

DINIZ, P. P. V. P.; SCHWARTZ, D. S.; COLLICCHIO-ZUANAZE. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: two case reports. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 85-89, 2007.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. **Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan s/a, 1982. 217 p.

DUNLOP, M. M.; SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J.; FREEMAN, K. P.; GIBSON, G.; SACCHINI, F.; LEWIS, F. Determination of serum biochemistry reference intervals in a large sample of adult greyhounds. **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, n. 1, p. 4-10, 2011.

DURANDO, M. M.; REEF, V. B.; KLINE, K.; BIRKS, E. K. Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 3, n. 04, p. 217-223, 2006.

DUROCHER, L.; HINCHCLIFF, K.; WILLIAMSON, K.; MCKENZIE, E.; HILBROOK, T.; WILLARD, M.; ROYLER, C.; DAVIS, M. Lack of microalbuminuria in sled dogs following exercise. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 3, n. 01, p. 1-2, 2006.

ETTINGER, S.J.; PROSEK, R. Biomarkers of Cardiovascular Disease. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010, p. 1143-1159.

FALLON, K. E.; SIVYER, G.; SIVYER, K.; DARE, A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. **British journal of sports medicine**, v. 33, n. 4, p. 264-269, 1999.

FAUDE, O.; KINDERMANN, W.; MEYER, T. Lactate threshold concepts. How valid are they? **Sports Medicine**. v.39, p.469-490, 2009.

FEASSON, L.; STOCKHOLM, D.; FREYSSENET, D.; RICHARD, I.; DUGUEZ, S.; BECKMANN, J. S.; DENIS, C. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 543, n. 1, p. 297-306, 2002.

FERASIN, L.; MARCORA, S. A pilot study to assess the feasibility of a submaximal exercise test to measure individual response to cardiac medication in dogs with acquired heart failure. **Veterinary research communications**, v. 31, n. 6, p. 725-737, 2007.

FERASIN, L.; MARCORA, S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 179, n. 7, p. 839-845, 2009.

FERRAZ, G. C.; SOARES, O. A. B.; FOZ, N. S. B.; PEREIRA, M. C.; QUEIROZ-NETO, A. The workload and plasma ion concentration in a training match session of high-goal (elite) polo ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. s38, p. 191-195, 2010.

FERRAZ, G. C.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; D'ANGELIS, F. D. F.; DE LACERDA-NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. D. Hematological and cardiac alterations in Arabian horses submitted to incremental effort test in treadmill. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 431-437, 2009.

FRANK, L.; MANN, S.; JOHNSON, J.; LEVINE, C.; DOWNEY, R.; GRIFFITS, C.; WAKSHLAG, J. Plasma chemistry before and after two consecutive days of racing in sled dogs: associations between muscle damage and electrolyte status. **Comparative Exercise Physiology**, v. 11, n. 3, p. 151-158, 2015.

FREITAS, M. V.; FERREIRA, F. D. S.; BARRETO, F. L.; CORRÊA, E. S.; CARVALHO, C. B. CREATINE PHOSPHOKINASE ISOENZYME-MB MASS (CK-MB MASS) AND TROPONIN I (cTnl) IN DOGS (*Canis familiaris*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 369-376, 2015.

GERTH, J.; OTT, U.; FÜNFSTÜCK, R.; BARTSCH, R.; KEIL, E.; SCHUBERT, K.; STEIN, G. The effects of prolonged physical exercise on renal function, electrolyte balance and muscle cell breakdown. **Clinical nephrology**, v. 57, n. 6, p. 425-431, 2002.

GONDIN, M. R.; FOZ, N. S.; PEREIRA, M. C.; FLAGLIARI, J. J.; OROZCO, C. A.; D'ANGELIS, F. H.; FERRAZ, G. C. Acute phase responses of different positions of high-goal (elite) polo ponies. **Journal of equine veterinary science**, v. 33, n.11, p. 956-961, 2013

GRAMKOW, H. L.; EVANS, D. L. Correlation of race earnings with velocity at maximal heart rate during a field exercise test in thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 36, p. 118-122, 2006.

HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A. S.; FRANSSON, B. A.; BERGSTRÖM, A.; Häggström, J. Cardiac troponin I levels in canine pyometra. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 1, p. 6, 2007.

HINCHCLIFF, K. W.; OLSON, J.; CRUSBERG, C.; KENYON, J.; LONG, R.; ROYLE, W.; BURR, J. Serum biochemical changes in dogs competing in a long-distance sled race. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 3, p. 401-405, 1993.

HINCHCLIFF, K. W.; SHAW, L. C.; VUKICH, N. S.; SCHMIDT, K. E. Effect of distance traveled and speed of racing on body weight and serum enzyme activity of sled dogs competing in a long-distance race. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 5, p. 639-644, 1998.

HODGSON, D. R. Myopathies in the athletic horse. **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)**, 1985.

HOLBROOK, T. C.; BIRKS, E. K.; SLEEPER, M. M.; DURANDO, M. Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. S36, p. 27-31, 2006.

ILKIW, J. E.; DAVIS, P. E.; CHURCH, D. B. Hematologic, biochemical, blood-gas, and acid-base values in greyhounds before and after exercise. **American journal of veterinary research**, v. 50, n. 4, p. 583-586, 1989.

INOUE, Y.; MATSUI, A.; ASAI, Y.; AOKI, F.; MATSUI, T.; YANO, H. Effect of exercise on iron metabolism in horses. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 107, n. 1, p. 33-42, 2005.

KARAMIZRAK, S. O.; EEGEN, E.; TÖRE, I. R.; AKGÜN, N. Changes in serum creatine kinase, lactate dehydrogenase and aldolase activities following supramaximal exercise in athletes. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 34, n. 2, p. 141-146, 1994.

KITTLESON, M. D.; JOHNSON, L. E.; PION, P. D. Submaximal exercise testing using lactate threshold and venous oxygen tension as endpoints in normal dogs and in dogs with heart failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 21-27, 1996.

KRATZ, A.; LEWANDROWSK, K. B.; SIEGEL, A. J.; CHUN, K. Y.; FLOOD, J. G.; VAN COTT, E. M.; LEE-LEWANDROWSKI, E. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. **American journal of clinical pathology**, v. 118, n. 6, p. 856-863, 2002.

LAVECCHIO, D.; MARIN, L. M.; BAUMWART, R.; IAZBIK, M. C.; WESTENDORF, N.; COUTO, C. G. Serum cardiac troponin I concentration in retired racing greyhounds. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n. 1, p. 87-90, 2009.

LINDNER, A.; SIGNORINI, R.; BRERO, L.; ARN, E.; MANCINI, R.; ENRIQUE, A. Effect of conditioning horses with short intervals at high speed on biochemical variables in blood. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, p. 88-92, 2006.

LOBETTI, R.; KIRBERGER, R.; KELLER, N.; KETTNER, F.; DVIR, E. NT-ProBNP and cardiac troponin I in virulent canine babesiosis. **Veterinary parasitology**, v. 190, n. 3, p. 333-339, 2012.

LUCAS, V.; BARRERA, R.; DUQUE, F. J.; RUIZ, P.; ZARAGOZA, C. Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds. **American journal of veterinary research**, v. 76, n. 7, p. 637-643, 2015.

MARTINS, C. S. Troponina: estrutura, fisiopatologia e importância clínica para além da isquemia miocárdica. **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 6, p. 221-240, 2009.

MATWICHUK, C. L.; TAYLOR, S. M.; SHMON, C. L.; KASS, P. H.; SHELTON, G. D. Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. **American journal of veterinary research**, v. 60, n. 1, p. 88-92, 1999.

MCGOWAN, C. Clinical pathology in the racing horse: the role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. **Veterinary Clinical of North American: Equine Practice**, v.24, p. 405-421, 2008.

MCKENZIE, E. C.; JOSE-CUNILLERAS, E.; HINCHCLIFF, K. W.; HOLBROOK, T. C.; ROYER, C.; PAYTON, M. E.; DAVIS, M. S. Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 10, p. 1486-1492, 2007.

MELLI, G.; CHAUDHRY, V.; CORNBATH, D. R. Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients. **Medicine**, v. 84, n. 6, p. 377-385, 2005.

MELLOR, P. J.; MELLANBY, R. J.; BAINES, E. A.; VILLIERS, E. J.; ARCHER, J.; HERRTAGE, M. E. High serum troponin I concentration as a marker of severe myocardial damage in a case of suspected exertional heatstroke in a dog. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2006.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Veterinary laboratory medicine, interpretation & diagnosis**. Philadelphia : W. B. Saunders, 1992. 350p.

MICHIMA, L. E. S.; MIRANDOLA, R. M. S.; FERNANDES, W. R. Estudo da isoenzima creatina quinase CKMB sérica em equinos de enduro após exercício físico prolongado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 23-30, 2010.

MIRANDA, R.L.; MUNDIM, A.V.; SAQUY, A.C.S.; COSTA, A.S. Biochemical serum profile of equines subjected to team penning. **Comparative Clinical Pathology**, v.18, n. 3, p. 313-319, 2009.

MIRANDA, M.C.P.C.; QUEIROZ-NETO, A.; SILVA-JÚNIOR, J.R.; SOARES, O.A.B.; BORGUI, R.T.; FERRAZ, G.C. Comparison of the lactate minimum speed and the maximal lactate steady state to determine aerobic capacity in purebred Arabian horses. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 62, p.15-20, 2014.

NEWBY, L. K.; JESSE, R. L.; BABB, J. D.; CHRISTENSON, R. H.; DE FER, T. M.; DIAMOND, G. A.; FESMIRE, F. M.; GERACI, S. A.; GERSH, B. J.; LARSE, G. C.; KAUL, S.; MCKAY, C. R.; PHILIPPIDES, G. J.; WEINTRAUB, W. ACCF 2012 expert consensus document on practical clinical considerations in the interpretation of troponin elevations. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 23, p. 2427-2463, 2012.

NOSTELL, K.; HÄGGSTRÖM, J. Resting concentrations of cardiac troponin I in fit horses and effect of racing. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 10, n. 2, p. 105-109, 2008.

O'BRIEN, P. J.; SMITH, D. E. C.; KNECHTEL, T. J.; MARCHAK, M. A.; PRUIMBOOM-BREES, I.; BREES, D. J.; PROVOST, J. P. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. **Laboratory Animals**, v. 40, n. 2, p. 153-171, 2006.

OKEEFE, J.H.; PATIL, H.R.; LAVIE, C.J.; MAGALSKI, A.; VOGEL, R.A.; MCCULLOUGH, P.A. Potential adverse cardiovascular effects from excessive endurance exercise. **Mayo Clinic Proceedings**, v.87, n.6, p.587-595, 2012.

OYAMA, M. A.; SISSON, D. D. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 831-839, 2004.

OYAMA, M. A. Using cardiac biomarkers in veterinary practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.43, n.6, p.1261-1272, 2013.

PASCON, J. P. E. **Estudo da Variabilidade da frequência cardíaca em cães**. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

PEAKE, J.; WILSON, G.; HORDERN, M.; SUZUKI, K.; YAMAYA, K.; NOSAKA, K.; COOMBES, J. S. Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate-and high-intensity exercise. **Journal of applied physiology**, v. 97, n. 2, p. 612-618, 2004.

PELLEGRINO, F. J.; RISSO, A. L.; ARIAS, D. O.; BILANCO, P. G.; CORRADA, Y. Optimización del Rendimiento Deportivo en Caninos. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 25, n. 4, p. 449-454, 2014.

PEREIRA, C.S.; MUZZI, R.A.L.; FIGUEIREDO, V.C.; MUZZI, L. A. L.; OBERLENDER, G.; LACRETA JUNIOR, A C C.; LEOMIL NETO, M. ; OLIVEIRA, M. M. . Troponina I como biomarcador de lesão cardíaca em cães com sepse. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)**, v. 68, p. 919-926, 2016.

PHILLIPS, S. A.; VUCKOVIC , K., CAHALIN L. P.; BAYNARD, T.; Defining the System: Contributors to Exercise Limitations in Heart Failure. **Heart failure clinics**, v. 11, p. 1-16, 2015.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; PANZERA, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained beagle dogs. **Experimental animals**, v. 61, n. 5, p. 511-515, 2012.

PIEPOLI, M. F.; CONRAADS, V.; CORRA, U.; DICKSTEIN, K.; FRANCIS, D. P.; JAARSMA, T.; ANKER, S. D. Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. **European journal of heart failure**, v. 13, n. 4, p. 347-357, 2011.

PINO, V.; ALVARADO, S.; FERNÁNDEZ, P.; DÁVILA, F. Determinación de los niveles séricos de enzimas cardíacas en perros adultos con enfermedad cardiovascular. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 19, n. 2, p. 144-147, 2008.

PIPER, H. M.; SCHWARTZ, P.; SPAHR, R.; HÜTTER, J. F.; SPIECKERMANN, P. G. Early enzyme release from myocardial cells is not due to irreversible cell damage. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 16, n. 4, p. 385-388, 1984.

PORCIELLO, F.; RISHNIW, M.; HERNDON, W. E.; BIRETONI, F.; ANTOGNONI, M. T.; SIMPSON, K. W. Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. **Australian veterinary journal**, v. 86, n. 10, p. 390-394, 2008.

RESTAN, W. A. Z.; TRISTÃO, A. P. P. A.; CAMACHO, A. A.; QUEIROZ NETO, A.; ADAMS, F. K.; FERRAZ, G. C. Limiar de lactato: um protocolo para cães. In: II Congresso Brasileiro de Cardiologia Veterinária, 2015, São Paulo. **Anais... II Congresso Brasileiro de Cardiologia Veterinária**, 2015. p. 69-70.

ROSS, L. F.; RAMOS, L. A. M.; RAMOS, R. R.; ARAÚJO, A. R. D. C. Rabdomiólise induzida por esforço físico intenso com altos níveis de creatinoquinase. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 53, n. 3, p. 269-72, 2009.

ROVIRA, S.; MUNOZ, A.; BENITO, M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 1, p. 30-35, 2007.

ROVIRA, S.; MUNOZ, A.; BENITO, M. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. **VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-**, v. 53, n. 6, p. 333, 2008.

SALES, J. V. F.; DUMONT, C. B. D. S.; LEITE, C. R.; MORAES, J. M. D.; GODOY, R. F. D.; LIMA, E. M. M. D. Expressão do Mg²⁺, CK, AST e LDH em equinos finalistas de provas de enduro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.1, p. 105-110, 2013.

SALLACH, S. M.; NOWAK, R.; HUDSON, M. P.; TOKARSKI, G.; KHOURY, N.; TOMLANOVICH, M. C.; MCCORD, J. A change in serum myoglobin to detect acute myocardial infarction in patients with normal troponin I levels. **The American journal of cardiology**, v. 94, n. 7, p. 864-867, 2004.

SANTOS, A. L.; LARSSON, M. H. M.; PEREIRA, G. G.; SANTOS, M. M.; GUTIERREZ, V. C. Dosagem sérica de troponina I em cães com desnível do segmento ST utilizando quimioluminescência. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1330-1336, 2011.

SCHOBBER, K. E.; KIRBACH, B.; OECHTERING, G. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. **Journal of veterinary cardiology**, v. 1, n. 2, p. 17-25, 1999.

SCHOBBER, K. E.; CORNAND, C.; KIRBACH, B.; AUPPERLE, H.; OECHTERING, G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 3, p. 381-388, 2002.

SCHOBER, K. E. Biochemical markers of cardiovascular disease. In ETTINGER, J.; FIELDMAN (Eds). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2005, p. 940-947.

SHARKEY, L. C.; BERZINA, I.; FERASIN, L.; TOBIAS, A. H.; LULICH, J. P.; HEGSTAD-DAVIES, R. L. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in dogs with renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 6, p. 767-770, 2009.

SHAVE, R.; BAGGISH, A.; GEORGE, K.; WOOD, M.; SCHARHAG, J.; WHYTE, G.; GAZE, D.; THOMPSON, P.D. Exercise-induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms and implications. **Journal of the American College of Cardiology**, v.56, n.3, p. 169 – 176, 2010.

SHAW, S. P.; ROZANSKI, E. A.; RUSH, J. E. Cardiac troponins I and T in dogs with pericardial effusion. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 18, n. 3, p. 322-324, 2004.

SIEGEL, A. J.; LEWANDROWSKI, E. L.; CHUN, K. Y.; SHOLAR, M. B.; FISCHMAN, A. J.; LEWANDROWSKI, K. B. Changes in cardiac markers including B-natriuretic peptide in runners following the Boston Marathon. **AMA Journal**, v. 16, n. 1, p. 12-16, 2003.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropomorfismo e Desempenho Humano**, v. 13, n. 4, p. 320-328, 2011.

SMITH, J. E.; GARBUTT, G.; LOPES, P.; PEDOE, D. T. Effects of prolonged strenuous exercise (marathon running) on biochemical and haematological markers used in the investigation of patients in the emergency department. **British journal of sports medicine**, v. 38, n. 3, p. 292-294, 2004.

SNOW, D.H.; and VALBERG, S.J. Muscle anatomy, physiology, and adaptations to exercise and training. In: **The Athletic Horse**, Eds: D.R. Hodgson and R.J. Rose, W.B. Saunders, Philadelphia. 1994. pp 1118-1122.

SOARES, O. A. B.; FERRAZ, G. C.; MARTINS, C. B.; DIAS, D. P. M.; LACERDA-NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. Comparison of maximal lactate steady state with V₂, V₄, individual anaerobic threshold and lactate minimum speed in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 39-46, 2014.

SPANGENTHAL, E. J.; ELLIS, A. K. Cardiac and skeletal muscle myoglobin release after reperfusion of injured myocardium in dogs with systemic hypotension. **Circulation**, v. 91, n. 10, p. 2635-2641, 1995.

SPRATT, D. P.; MELLANBY, R. J.; DRURY, N.; ARCHER, J. Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. **Journal of small animal practice**, v. 46, n. 3, p. 139-145, 2005.

STEISS, J. E.; BEWER, W. G.; WELLES, E.; WRIGHT, J. C. Hematologic and serum biochemical reference values in retired Greyhounds. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v. 22, n. 3, p. 243-248, 2000.

STOCKHAM, S.L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. In: MESSER, N.T. **The veterinary clinics of North America - equine practice**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995. p.391-414.

STONE, J. D.; KREUTZER, A.; MATA, J. D., NYSTROM, M. G.; JAGIM, A. R.; JONES, M. T.; OLIVER, J. M. Changes in Creatine Kinase and Hormones over the Course of an American Football Season. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 2017.

STUEWE, S. R.; GWIRTZ, P. A.; MALLET, R. T. Exercise training increases creatine kinase capacity in canine myocardium. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 1, p. 92-98, 2001.

TEIXEIRA-NETO, A. R.; FERRAZ, G. D. C.; MOSCARDINI, A. R. C.; BALSAMÃO, G. M.; SOUZA, J. C. F.; QUEIROZ-NETO, A. D. Alterations in muscular enzymes of horses competing long-distance endurance rides under tropical climate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 543-549, 2008.

THARWAT, M.; AL-SOBAYIL, F.; BUCZINSKI, S. Influence of racing on the serum concentrations of the cardiac biomarkers troponin I and creatine kinase myocardial band (CK-MB) in racing greyhounds. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 900-902, 2013.

THOMAS JR, B. D.; MOTLEY, C. P. Myoglobinemia and endurance exercise: a study of twenty-five participants in a triathlon competition. **The American journal of sports medicine**, v. 12, n. 2, p. 113-119, 1984.

TRISTÃO, A. P.; ADAMS, F. K.; RESTAN, W. A. Z.; MORANZA, H. G.; INNOCENTE, P. S.; SOUSA, M. G.; FERRAZ, G. C.; CAMACHO, A. A. Determination of lactate threshold in dogs with degenerative mitral valve disease submitted to incremental exercise test. In: ACVIM Forum Research Abstract Program, 2015, Indianápolis. **Anais...** ACVIM Forum Research Abstract Program, 2015. v. 29, p. 1144-1145.

WAKSHLAG, J. J. KRAUS, M. S.; GELZER, A. R.; DOWNEY, R. L.; VACCHANI, P. The influence of high-intensity moderate duration exercise on cardiac troponin I and C-reactive protein in sled dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 6, p. 1388-1392, 2010.

WODECKI, J. J.; HEINRICH, C. Paralytic myoglobinuria in greyhounds. **Tierärztliche Praxis**, v. 21, n. 4, p. 355-359, 1993.

YONEZAWA, L. A.; DA SILVEIRA, V. F.; SAITO, M. J. W. M. E.; KOHAYAGAWA, S. S. K. A. Malondialdeído e troponina I cardíaca em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E. **Ciência Rural**, v. 40, n.6, 2010.

CAPÍTULO 2 - Cinética de biomarcadores séricos musculares e cardíacos de cães submetidos a exercício intenso e treinamento aeróbio

1. INTRODUÇÃO

A avaliação da bioquímica sérica é utilizada para o monitoramento rotineiro dos atletas da espécie humana e equina. Técnicas laboratoriais automatizadas para a quantificação de alguns biomarcadores séricos tornaram-se acessíveis, com custos relativamente módicos. Isto originou perfis clínicos de biomarcadores musculares e cardíacos induzidos pelo exercício e treinamento, que podem auxiliar na determinação do grau de aptidão física dos atletas e até mesmo propiciar abordagem preventiva de lesões por meio do diagnóstico de enfermidades musculares subclínicas. Desta forma, a determinação de um padrão espécie-específico da dinâmica dos biomarcadores séricos após o esforço físico, notadamente, a atividade de algumas enzimas séricas como a creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e proteínas musculares como a mioglobina, pode contribuir para diferenciação de respostas fisiológicas, daquilo que pode ser considerado patológico.

A despeito da popularidade dos esportes praticados pelos cães, as informações na literatura sobre a dinâmica destes biomarcadores são relativamente reduzidas e difusas. Nos resultados científicos publicados previamente não há padronização dos momentos de coleta e as variáveis são obtidas a partir de estudos sobre a demanda fisiológica (*workload*), que caracterizaram o comportamento de biomarcadores musculares em algumas modalidades esportivas como as corridas de Greyhounds (Lucas et al., 2015), corridas de cães de trenó (Frank et al., 2015) e provas de agilidade (Rovira et al., 2007).

A atividade da CK é encontrada em diversos tecidos, sendo considerada indicadora de alterações da musculatura estriada esquelética durante programas treinamento ou exercício máximo. Já a AST é encontrada principalmente no fígado e músculos esquelético e cardíaco, podendo ser liberada na corrente sanguínea mais tardiamente em relação à CK. Em equinos, após a atividade física, valores séricos da CK tendem a se elevar primeiro quando comparado aos da AST, sendo que,

mudanças na atividade destas duas enzimas estão relacionadas à intensidade do exercício, máximo ou submáximo (Teixeira-Neto et al., 2008). Ademais, a ausência de elevações persistentes destas enzimas, após a atividade física, pode ser atribuída à prescrição adequada de intensidades de treinamento (Stone et al., 2017).

Outro biomarcador muscular com potencial para ser utilizado no monitoramento de atletas é a mioglobina, proteína com potencial para ligação ao oxigênio, encontrada nos músculos estriados esquelético e cardíaco. Perfusão tecidual inadequada ou lesões musculares podem levar à liberação de mioglobina na corrente sanguínea. Em humanos foi observado elevação significativa da mioglobina sérica após provas de maratona (Smith et al., 2004) e em exercício realizados por meio de contrações excêntricas máximas dos músculos do cotovelo (Clarkson et al., 2006). Na Medicina Veterinária desportiva os estudos são escassos, sendo relatado elevações pontuais na mioglobina sérica de cavalos submetidos a teste de esforço submáximo (Valberg et al., 1993) e cães de trenó (Frank et al., 2015). Semelhantemente às enzimas CK e AST, faltam estudos em cães sobre o perfil da mioglobina após o treinamento e exercício.

Com relação à musculatura cardíaca, as troponinas juntamente com a creatina quinase isoenzima MB (CK-MB) têm recebido crescente atenção como marcadores de injúria do miocárdio em mamíferos (LaVecchio et al., 2009). Em cães foi demonstrado que a troponina cardíaca I (cTnI) é biomarcador de eleição para lesões miocárdicas agudas e crônicas (Spratt et al., 2005). Observou-se elevações em cães de trenó (Wakshlag et al., 2010) e Greyhounds de corrida (Tharwat et al., 2013). Em relação CK-MB, quando ocorre necrose do miocárdio há liberação desta isoenzima para o meio extracelular e sua atividade sérica representa recurso importante para detecção de lesão cardíaca também na espécie canina (Diniz et al., 2007).

Estes biomarcadores supracitados podem ser avaliados conjuntamente durante programas de treinamento físico em cães. O treino sistemático é um processo de atividade contínua, cujo objetivo é maximizar as capacidades aeróbia e cognitiva mediante a realização de exercícios semanais, prescritos individualmente (Pellegrino et al., 2014). Na espécie humana e equina é comum a utilização de testes de exercício incremental (TEI) para obtenção do limar de lactato (LL). Trata-se

de índice clássico para diagnóstico do condicionamento aeróbio e prescrição de intensidades de treinamento (Faude et al., 2009; Soares et al., 2014). A deflexão da CLV, caracterizada pelo aumento abrupto da [lac] obtida a partir de um TEI, representa o início do desequilíbrio entre a produção e a remoção de lactato (Campbell, 2011). Essa deflexão é conhecida como *onset blood lactate accumulation* ou limiar de lactato (LL) (Miranda et al., 2013). Nestes testes também pode ser obtida a frequência cardíaca (FC), índice indireto para a predição da capacidade aeróbia (Berkman et al., 2015).

De maneira geral, faltam pesquisas sobre o padrão cinético de biomarcadores musculares e cardíacos de cães submetidos ao esforço físico intenso realizado em condições controladas. É hipótese desta pesquisa que a espécie canina apresenta um padrão sérico de biomarcadores musculares e cardíacos após a realização de exercício intenso. Conceitos elementares para elaboração de programas de condicionamento físico objetivando o aumento da capacidade aeróbia foram utilizados. Desta maneira, objetivou-se determinar a cinética dos biomarcadores da atividade muscular e cardíaca em cães submetidos ao exercício máximo e ao condicionamento aeróbio. Secundariamente, o impacto de fatores externos, como venopunção, transporte e cateterização, sobre os biomarcadores também foi avaliado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ), localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal, SP. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp/Jaboticabal (protocolo número 21324/15).

O fluxograma do estudo está apresentado na Figura 1. Utilizaram-se 18 cães adultos, sem quaisquer indicativos de doença prévia ou concorrente, da raça Beagle,

sendo dez machos e oito fêmeas, com idade média de 2 ± 1 anos, provenientes do canil do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos da FCAV da UNESP, campus de Jaboticabal, SP. Os cães foram mantidos em canis individuais, tendo à disposição água *ad libitum* e dieta exclusivamente à base de ração, calculada em consonância com sua demanda energética individual.

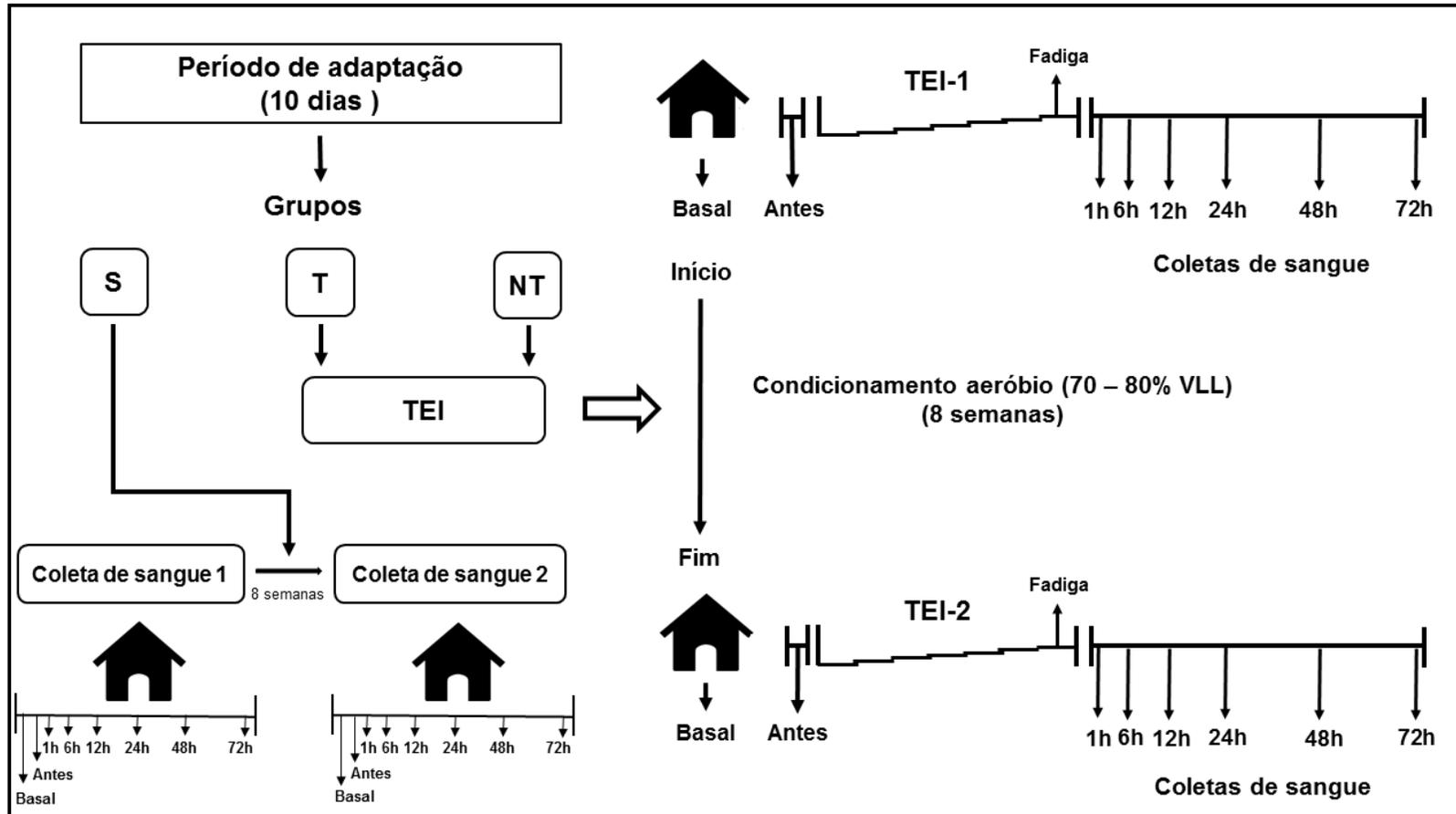


Figura 1. Fluxograma do protocolo experimental. TEI = teste de esforço incremental inicial (TEI-1) e final (TEI-2); T = grupo treinado (participou de TEI-1, programa de condicionamento e TEI-2, n=6); NT = grupo não treinado (participou de TEI-1, TEI-2 e não participou de programa de condicionamento, n=5); S = grupo sedentário (não participou de TEI e não participou de programa de condicionamento); LL = limiar de lactato; VLL = velocidade no limiar de lactato.

2.2 Grupos experimentais

Os cães foram distribuídos em três grupos. O grupo treinado (T) foi submetido a dois testes de esforço incremental (TEI-1 e TEI-2), separados entre si por um programa treinamento aeróbio com 8 semanas de duração (n=6, três machos e três fêmeas). O grupo não treinado (NT), controle positivo, realizou somente os testes de esforço (TEI-1 e TEI-2), não participando, portanto, do treinamento (n=6, quatro machos e duas fêmeas). Finalmente, o grupo sedentário (S) foi utilizado como controle negativo, sendo que os cães não realizaram TEI e treinamento, sendo realizado coletas de sangue nos mesmos 8 momentos que os cães submetidos a TEI (basal, antes e 1, 6, 12, 24, 48 e 72 h), antes (coleta 1) e após oito semanas (coleta 2) (n=6, três machos e três fêmeas). Este último grupo foi utilizado para verificação de possíveis interferências de fatores externos aos TEIs sobre os biomarcadores.

Para certificar o estado de saúde dos animais, hemogramas e exames bioquímicos foram realizados antes do início do experimento. Os hemogramas foram efetuados em analisador hematológico veterinário (Sysmex pochH-100iV[®], Lincolnshire - USA). A avaliação da bioquímica renal e hepática foi realizada por meio de processo cinético em analisador semiautomático (LABQUEST BIO 2000[®], São Paulo - Brasil), utilizando-se kits comerciais das enzimas alanina aminotransferase (ALT) (ALT/GPT Liquiform - Labtest), fosfatase alcalina (FA) (FA Liquiform - Labtest), uréia (Uréia Liquiform - Labtest) e creatinina (Creatinina Enzimática Liquiform – Labtest). Para assegurar a hígidez cardíaca, os animais foram submetidos a exame eletrocardiográfico com o aparelho digital (Eletrocardiógrafo TEB[®], Campinas – Brasil) e ecodopplercardiografia (Ecocardio Doppler[®] Siemens, Munique - Alemanha) nos modos bidimensional, M e Doppler.

2.3 Adaptação, TEI e programa de treinamento

Durante 10 dias, os 12 cães que participaram dos TEI-1 e TEI-2 foram adaptados à sala da esteira onde foram realizados os TEIs e o treinamento. Todos os cães foram incentivados a subir na esteira (Galopper[®] 5500, Sahinco, Palmital -

Brasil), desligada, e receberam reforço positivo, comida úmida e biscoitos, como recompensa. Após familiarização com o ambiente os cães foram posicionados, individualmente, sobre a esteira, que foi acionada na velocidade inicial de 1,5 m/s induzindo a movimentação do cão, que foi atraído por membros da equipe de pesquisadores que o estimularam a se deslocar para, posteriormente, iniciar o treinamento de modo seguro. Os cães utilizaram coleira peitoral anatômica de modo confortável para facilitar a contenção e garantir maior segurança durante o treinamento. Sessões diárias para adaptação tiveram duração de aproximadamente 5 min para cada cão.

Os TEIs foram realizados sempre no período da manhã, em sala climatizada (temperatura de 20°C e umidade do ar de aproximadamente 70%). Todos os cães foram submetidos a jejum alimentar de 3 h com acesso livre à água. Uma vez adaptados à esteira, iniciou-se o teste com aquecimento numa velocidade de 1,5 m/s por 5 min, sem inclinação. Na sequência, os cães foram submetidos a etapas de velocidades crescentes com inclinação de 7,5% e incrementos de velocidade de 0,5 m/s a cada 7 min. O teste foi finalizado no momento que os cães apresentassem sinais de fadiga caracterizados pela incapacidade de acompanhar a velocidade da esteira. Entre cada etapa de velocidade os cães foram submetidos a 120 s de repouso passivo com a esteira desligada.

A partir dos TEIs foi obtido o ponto de deflexão da CLV, de cada cão, dos grupos T e NT, para identificação visual do LL (Cunha et al., 2009). Tal ponto foi relacionado com a velocidade correspondente, estabelecendo, assim, a velocidade relacionada ao limiar de lactato (VLL). Aplicou-se função exponencial ($y=ae^{bx}$, onde $y= [lac]$, mmol/L e $x=$ velocidade, m/s) para verificação do padrão matemático da CLV. A VLL obtida no TEI-1 foi utilizada para prescrever individualmente o programa de condicionamento (Figura 2). Ao final o período de condicionamento, os cães foram submetidos novamente ao teste de esforço progressivo (TEI-2), objetivando comparar os resultados com aqueles obtidos no TEI-1.

Somente o grupo T realizou treinamento, que foi realizado três dias por semana (segunda, quarta e sexta-feira), durante oito semanas consecutivas, no período da manhã, entre 08:00 e 12:00 h. Após 5 min de aquecimento, a velocidade foi aumentada para 70% da VLL nas quatro primeiras semanas e posteriormente

para 80% da VLL da quinta a oitava semanas. As velocidades prescritas foram calculadas individualmente, a partir da velocidade correspondente ao LL, tomada como 100%. Estas velocidades foram mantidas durante 20 min com a esteira inclinada a 7,5%, permanecendo nesta inclinação até o término da sessão. Cada sessão de treino teve duração de 30 min contínuos, sendo os cinco minutos iniciais e finais correspondentes a 50% da velocidade programada, empregados como aquecimento e desaquecimento.

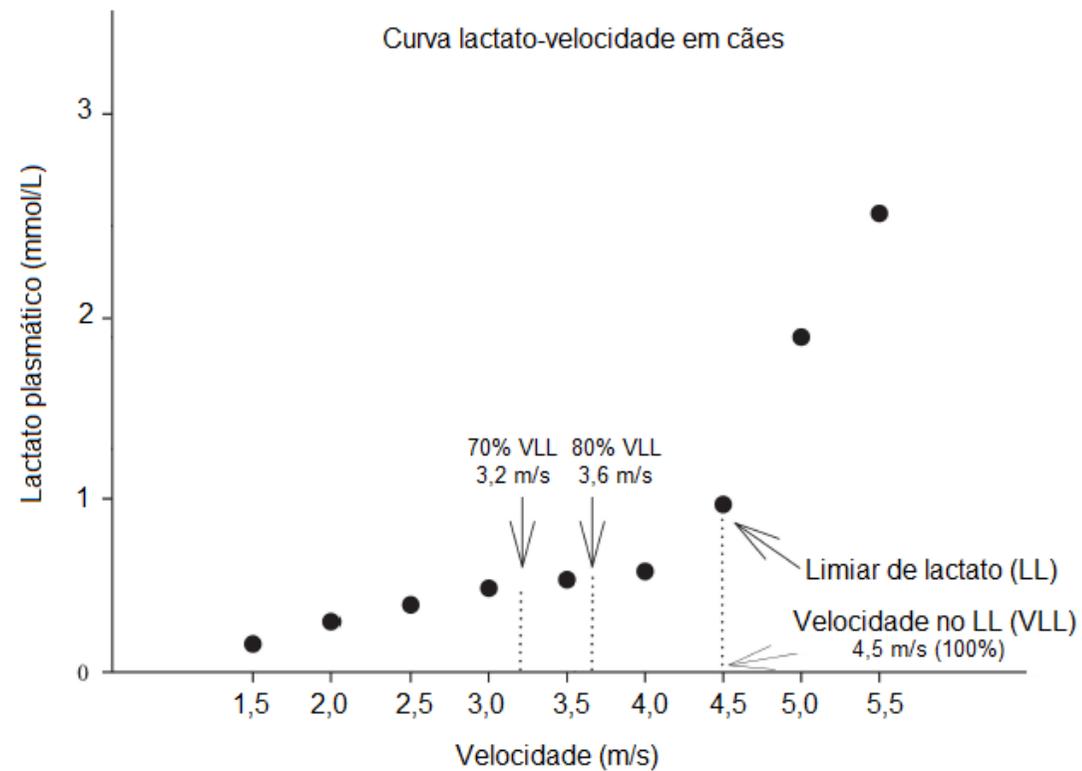


Figura 2. Relação típica entre a concentração plasmática do lactato e a velocidade (curva lactato-velocidade (CLV)) em teste de esforço incremental (TEI) em um cão. Observar o aumento abrupto e exponencial da concentração plasmática de lactato (limiar de lactato (LL)). A velocidade no limiar de lactato (VLL) foi utilizada para elaborar o protocolo de condicionamento físico.

2.4 Amostras de sangue

Objetivando-se elaborar as CLVs foi quantificado as [lac]s, durante os TEIs, por meio da obtenção de 4 mL de sangue, em cada etapa de esforço, por meio de cateter (BD Angiocath[®] 16 GA) fixado no terço médio da veia jugular direita. A obtenção de sangue, em cada etapa de esforço, foi realizada no momento 90 s, durante o período de repouso passivo. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos contendo fluoreto de sódio (6 mg), que foram mantidos sob refrigeração (4 °C). Imediatamente após o final dos TEIs, as [lac]s foram determinadas por meio do método eletroenzimático com bioanalisador automático (YSI 2300 Stat Plus[®], Ohio - USA).

Imediatamente após os TEIs, o cateter foi retirado e as amostras sanguíneas subsequentes para determinação dos biomarcadores musculares e cardíacos foram obtidas por meio da venopunção, alternadamente, das jugulares esquerda e direita, com agulhas 0,8 x 0,25 mm acopladas a seringas de 10 mL. Coletaram-se 8 mL de sangue em cada um dos 8 momentos (basal, antes, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 h), sendo distribuídos em tubos previamente identificados, sem anticoagulante, para obtenção de soro. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1470g em centrífuga refrigerada a 4°C. As alíquotas para a dosagem dos biomarcadores foram congeladas a -80°C, até o momento da análise. As amostras basais de todos os grupos foram coletadas no canil, por venopunção jugular, respeitando-se as condições habituais dos cães, sempre as 7:00 h da manhã. Ato contínuo, os cães foram transportados confortavelmente, internamente ao campus da FCAV/UNESP, por meio de veículo motorizado refrigerado, sendo que a distância entre o canil e a sala da esteira foi de aproximadamente 1000 m. A amostra no momento “antes” foi obtida por meio de cateter jugular, coletadas 30 a 60 min após a cateterização, devido à logística da equipe de pesquisadores na sala da esteira, imediatamente antes do início dos TEIs. Ao término do TEI o cateter foi retirado, sendo as amostras dos momentos 1, 6, 12, 24, 48 e 72 h após o término dos TEIs, coletadas por venopunção jugular. Antes dos TEIs, todos os cães foram mantidos sem atividade física por um período de 48 h.

As quantificações dos biomarcadores foram realizadas por meio de processo cinético em analisador semiautomático (LABQUEST BIO 2000[®], São Paulo - Brasil), utilizando-se kits comerciais para determinação da atividade enzimática das enzimas CK (CK-NAC Liquiform - Labtest), AST (AST/GOT Liquiform - Labtest) e CK-MB (CK-MB Liquiform - Labtest). A mioglobina e cTnI foram mensuradas por meio de ensaio imunométrico por quimioluminescência (Immulite[®] 1000 Immunoassay System – SIEMENS, Pennsylvania - USA) com cartucho específico, segundo instruções do fabricante.

2.5 Frequência cardíaca

Para a avaliação da frequência cardíaca foi realizada a monitorização por meio do equipamento Holter, utilizando-se aparelho digital (CardioLight - Cardios[®], São Paulo - Brasil), gravados em cartão eletromagnético (flash-card) e analisado por decodificação computadorizada (Sistema Cardioscan10, São Paulo - Brasil). O gravador foi diretamente atado ao dorso do animal, imediatamente antes do início dos TEIs, oferecendo liberdade de movimento durante o exercício, com proteção do aparelho e dos cabos, que foram ligados a eletrodos, por meio de ataduras de crepom tipo cysne (8cm x 1,8m), permitindo total liberdade de movimentação. Ao final dos testes o aparelho foi retirado e, a partir dos dados obtidos no Holter, determinou-se a FC no momento da fadiga e as velocidades correspondentes (VFC_{Fadiga})

2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade usando o teste de Bartlett. Os biomarcadores musculares e cardíacos sofreram transformação logarítmica ($\log_e(x) + 1$) para se ajustarem à distribuição normal. O esquema experimental utilizado foi um trifatorial (3 grupos, 2 testes e 8 momentos) no delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições. Utilizou-se o modelo $Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \delta_j + \beta_k + (\tau*\beta)_{ik} + \gamma_l + (\tau*\gamma)_{il} + (\beta*\gamma)_{kl} + (\tau*\beta*\gamma)_{ikl} + e_{ijkl}$, em que Y_{ijkl} é a observação $ijkl$, μ é a média geral, τ_i é o efeito do grupo i

(sedentário, não treinado ou treinado), δ_j é o efeito do animal j dentro de grupo (amostras repetidas no tempo), $(\tau^*\delta)_{ij}$ é a interação entre o grupo i e animal j , β é o efeito do teste incremental k (antes ou depois de 8 semanas), $(\tau^*\beta)_{ik}$ é a interação entre grupo i e teste k , γ_l é o efeito do momento de coleta l (basal, antes, após 1, 6, 12, 24, 48 e 72 h dos testes incrementais), $(\tau^*\gamma)_{il}$ é a interação entre grupo i e momento l , $(\beta^*\gamma)_{kl}$ é a interação do teste k e momento l , $(\tau^*\beta^*\gamma)_{ikl}$ é a interação entre o grupo i , o teste k e o momento de coleta l , e e_{ijkl} é o erro aleatório com média 0 e variância σ^2 , a variação entre as mensurações. Os dados foram submetidos à análise de variância de efeitos mistos para amostras repetidas, seguida por teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Realizou-se correlação de Pearson entre os resíduos das variáveis segundo o modelo apresentado acima ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.3. Os resultados, quando apresentados sem transformação foram expressos como mediana (mínimo-máximo).

3. RESULTADOS

O perfil da amostra dos exames hematológicos e bioquímicos para a verificação da higidez dos cães está apresentado na Tabela 1. Não foram evidenciadas alterações no eletrocardiograma e na ecodopplercardiografia.

Um dos cães do grupo NT não completou o primeiro TEI, pois se recusou a acompanhar os aumentos de velocidades, sendo retirado do teste antes de atingir a fadiga. Por este motivo também não participou do TEI-2.

Tabela 1. Perfil hematológico dos animais ensaiados (valores de referência da população amostral).

Variável	Média	Erro padrão	Mín/Máx
Leucócitos totais (μL)	10.028	0,636	6.600-13.600
Hematócrito (%)	46,6	0,933	41-53
Plaquetas (μL)	271.700	13,640	213.000-402.000
ALT (U/L)	64	6,156	20-102
FA (U/L)	67,2	7,913	20-115
Uréia (mg/dL)	37	7,230	22-66
Creatinina (mg/dL)	0,63	0,039	0,4-0,9

Média, Erro Padrão e Amplitude dos valores de hemograma, uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) de 18 cães da raça Beagle distribuídos entre os grupos treinado (T, n=6), não treinado (NT, n=6) e sedentário (S, n=6), realizados antes do início do experimento.

3.1 Avaliação da aptidão física

Para avaliação da eficácia do condicionamento aeróbio, o presente estudo utilizou índices tradicionais relacionados com as [lac]s e FC. As curvas de tendência e suas respectivas equações para os grupos T e NT foram significativas ($P \leq 0,01$) e estão apresentadas na Figura 3, sendo que revelaram modelo matemático de crescimento exponencial das CLV (Figura 3). No grupo T houve deslocamento da CLV para a direita após 8 semanas de treinamento aeróbio (Figura 3A). Tanto a VLL como a VFC_{Fadiga} aumentaram após 8 semanas de treino aeróbio, sendo que no TEI-2 as velocidades do grupo T foram maiores quando comparado ao grupo NT. Já no grupo NT, a VLL e a VFC_{Fadiga} não diferiram entre os TEIs (Figura 4).

As médias e erros padrões das FC apresentadas pelo grupo T no momento da fadiga foram de $240 \pm 5,3$ bpm no TEI-1 e $240 \pm 5,8$ bpm no TEI-2. Para o grupo NT as médias foram $221 \pm 4,3$ bpm e $211 \pm 4,9$ bpm respectivamente para o TEI-1 e TEI-2.

Nas outras variáveis CK, AST, cTnl e CK-MB, não houve interação entre momento, teste de esforço (TEI-1 e TEI-2) e grupo, na comparação entre os TEIs. Por este motivo, os dados de cada variável, dentro do mesmo grupo (intra-grupo), obtidos a partir dos TEI-1 e TEI-2, foram analisados juntamente para a elaboração dos gráficos de perfis. A seguir são apresentados os resultados dos biomarcadores séricos.

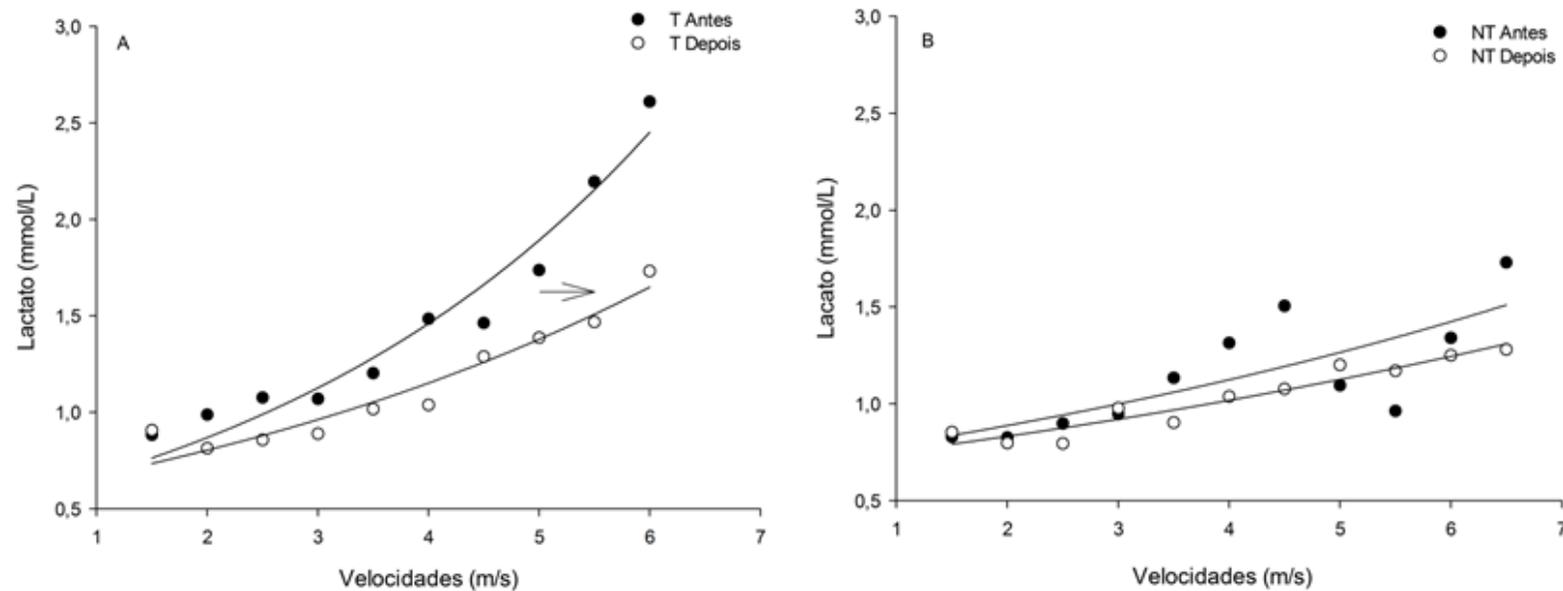


Figura 3. Representação gráfica das curvas lactato-velocidade (CLV) de cães da raça Beagle submetidos a teste de esforço incremental (TEI) e condicionamento aeróbio durante 8 semanas, realizado a 70-80% da velocidade correspondente ao limiar de lactato (VLL). (A) T_{Antes} e T_{Depois} = cães que realizaram TEI e condicionamento; (B) NT_{Antes} e NT_{Depois} = cães que realizaram somente o TEI. Observar linhas de tendências exponenciais, sendo a para T_{Antes} , $Y = 0,4556^{e^{0,2911x}}$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,96$; para T_{Depois} , $Y = 0,5614^{e^{0,1796x}}$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,93$; NT_{Antes} , $Y = 0,7011^{e^{0,1181x}}$, $P < 0,0071$, $R^2 = 0,57$; NT_{Depois} , $Y = 0,6808^{e^{0,1006x}}$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,92$. (A) Seta indica deslocamento à direita da CLV.

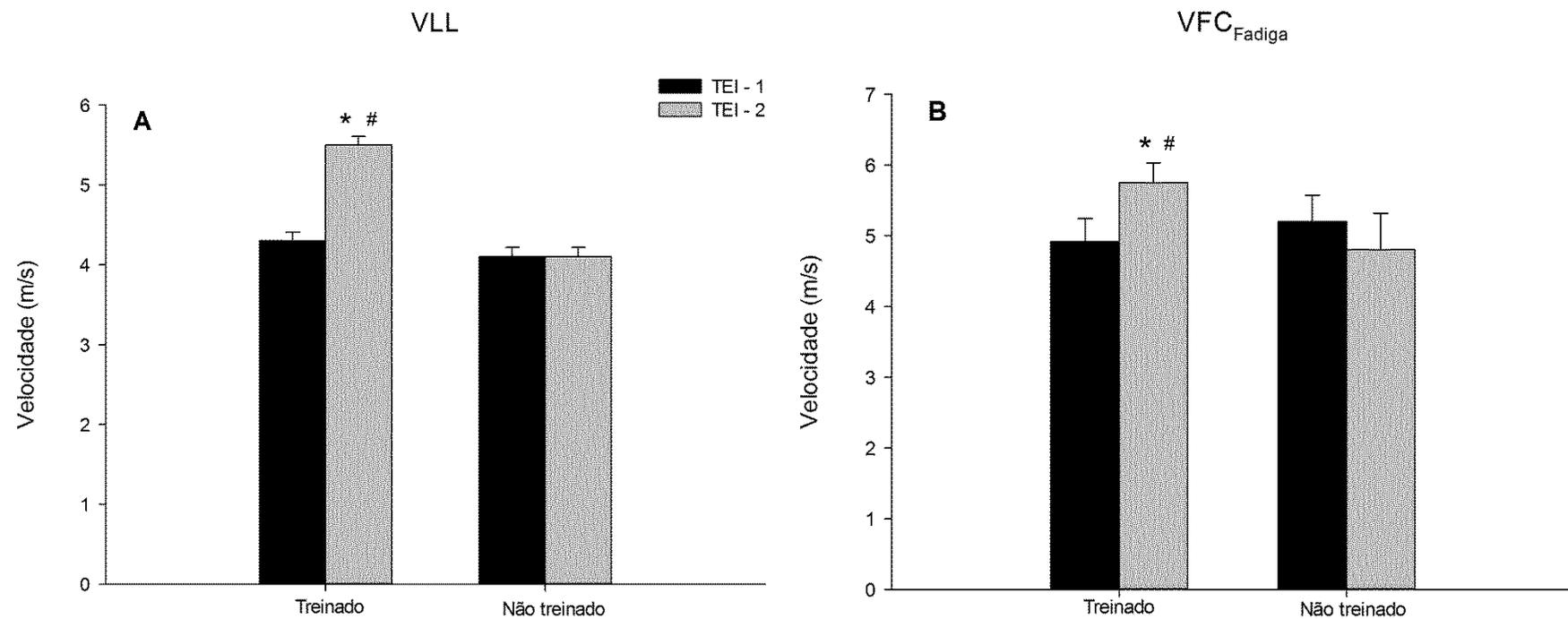


Figura 4. Representação gráfica das médias \pm erros padrões das velocidades no LL (A) e velocidades na frequência cardíaca no momento da fadiga (B) em cães da raça Beagle do grupo treinado (T, n=6), submetidos a um protocolo de condicionamento aeróbio com duração de 8 semanas, realizado a 70-80% do LL, durante 8 semanas, e do grupo não treinado (NT, n=6), que não participou de programa de condicionamento. TEI-1 e TEI-2, testes de esforço incremental 1 e 2.* indica aumento da VLL e da VFC_{Fadiga} no TEI-2 em relação ao TEI-1 no grupo T ($P \leq 0,05$). # indica maior VLL e VFC_{Fadiga} do grupo T em relação ao grupo NT ($P \leq 0,05$).

3.2 Creatina quinase (CK)

A cinética da CK está representada na Figura 5. O programa de treinamento não modificou a atividade da CK para o grupo T. Também não foi observado alteração para os grupo NT entre os TEIs, bem como no grupo S. No momento basal os valores foram iguais ($P>0,05$) entre os grupos. As atividades séricas de CK de cães que compuseram os grupos experimentais revelaram alguns valores marcadamente elevados, no momento antes dos testes de esforço. Para os grupos T e NT as medianas foram 792 (64 - 3120 U/L) e 246,2 (82 - 602 U/L) respectivamente. A atividade da CK foi maior ($P\leq 0,05$) nos grupos T e NT quando comparados ao grupo S até 24 h após o término dos TEIs. O pico de atividade sérica da CK foi observado após 6 h em todos os grupos, revelando valores maiores nos grupos T e NT. Especificamente para estes grupos, as medianas foram 4035 (164-15795 U/L) e 1190,5 (629 - 4433 U/L), respectivamente. No grupo NT os valores basais foram retomados após 12h. Já para o grupo T e S apenas às 48 h foram observados valores semelhantes ($P>0,05$) ao momento basal.

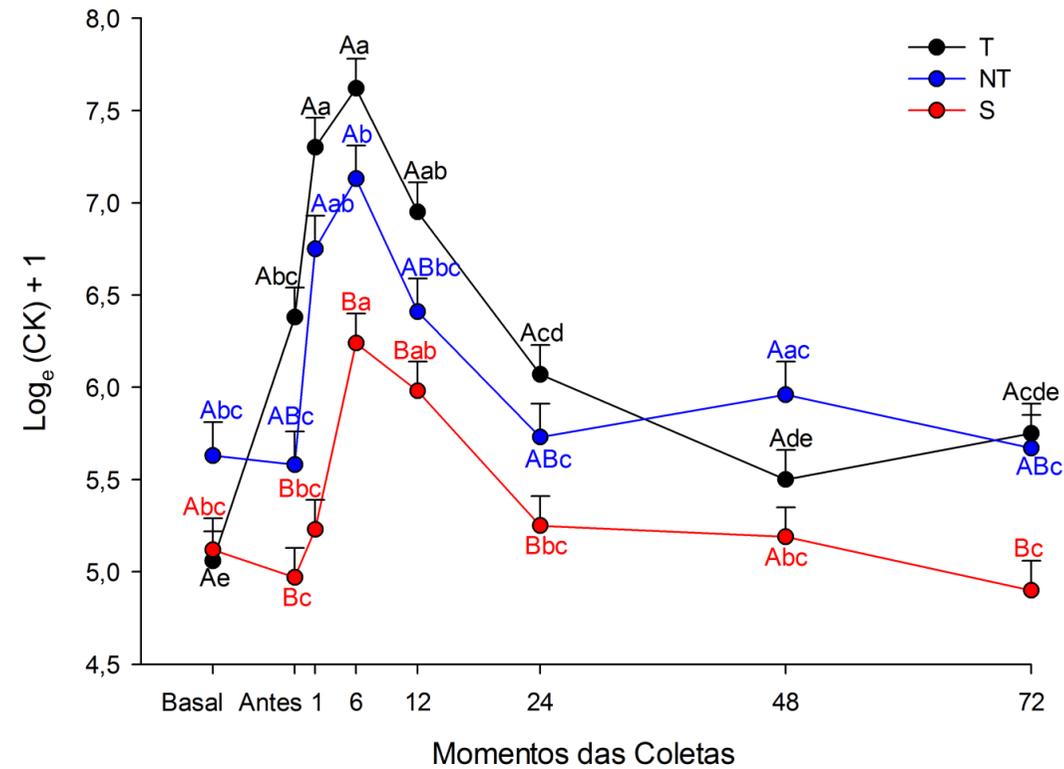


Figura 5. Cinética da atividade enzimática sérica da creatina quinase (CK) de 17 cães da raça Beagle distribuídos entre os grupos treinado (T, n=6) e não treinado (NT, n=5), submetidos a teste de esforço incremental (TEI), e grupo sedentário (S, n=6). Letras maiúsculas representam diferença entre os grupos, enquanto letras minúsculas correspondem à diferença intragrupos, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Utilizou-se transformação logarítmica ($\log_e(x) + 1$) para a análise estatística.

3.3 Aspartato aminotransferase (AST)

O programa de treinamento também não modificou a atividade da AST para o grupo T. Também não foi observado alteração para os grupo NT entre os TEIs, bem como no grupo S entre as duas coletas. No momento basal evidenciou-se igualdade ($P>0,05$) entre os grupos, como mostra a Figura 6. Assim como observado na atividade da CK, a AST revelou valores elevados nos grupos T e NT, com variação intragrupos. Foram observadas medianas de 65 (20-146 U/L) para o grupo T e 38,5 (26-52 U/L) para o grupo NT no momento “antes”. No momento 6 h, os grupos T e NT atingiram valores significativamente maiores ($P\leq 0,05$) que o grupo S. A partir de 12 h não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$). Semelhante ao observado com a CK, o pico plasmático da atividade de AST foi observado após 6 h em todos os grupos. No pico foram observadas medianas de 148,5 (15-738 U/L) para o grupo T, 73 (52-178 U/L) para o grupo NT, e 49,5 (20-314 U/L) para o grupo S. Houve recuperação da atividade da AST para o grupo T no momento 48 h. Para os grupos NT e S os valores basais foram retomados a partir de 12 h.

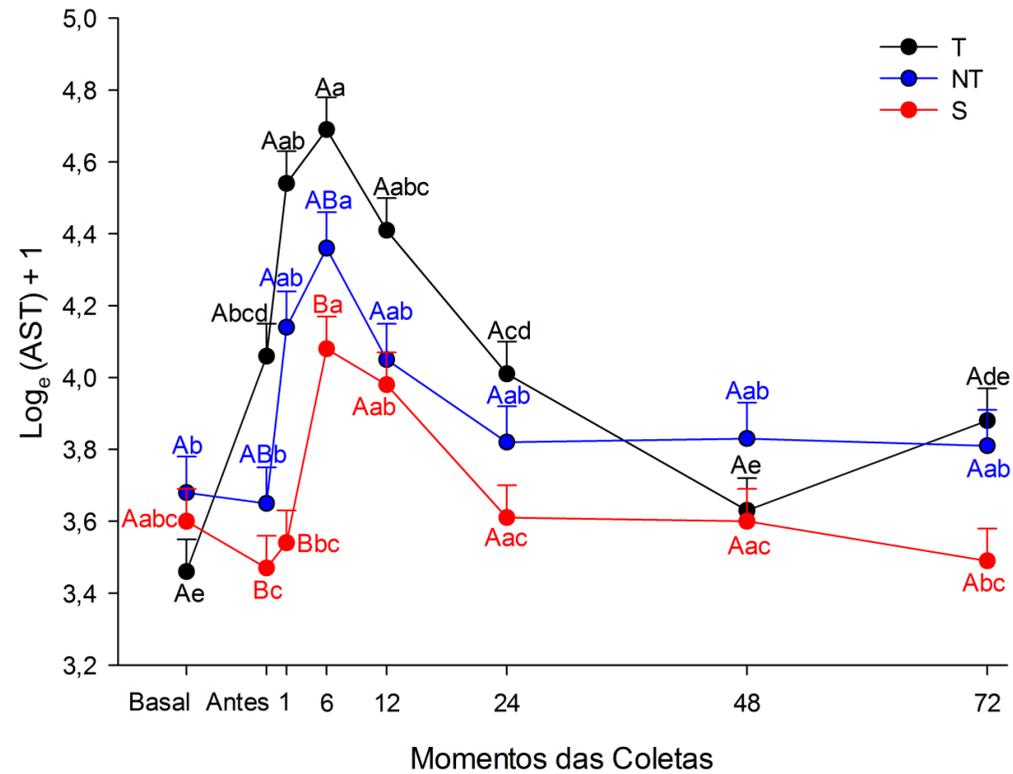


Figura 6. Cinética da atividade enzimática sérica da aspartato aminotransferase (AST) de 17 cães da raça Beagle distribuídos entre os grupos treinado (T, n=6) e não treinado (NT, n=5), submetidos a teste de esforço incremental (TEI), e grupo sedentário (S, n=6). Letras maiúsculas representam diferença entre os grupos, enquanto letras minúsculas correspondem à diferença intragrupos, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Utilizou-se transformação logarítmica ($\log_e(x) + 1$) para a análise estatística.

3.4 Mioglobina e troponina cardíaca I (cTnI)

Em relação à mioglobina sérica, observaram-se valores superiores aos detectáveis pela metodologia utilizada (2,0 ng/mL) somente em alguns cães submetidos aos TEIs (grupos T e NT), 1h após o esforço. No grupo T, somente um cão atingiu 2,4 no TEI-1 e três cães revelaram aumento de mioglobina no TEI-2, sendo a mediana de 2,9 (2,7-6,10 ng/mL). Já no grupo NT, somente um cão no TEI-1 apresentou aumento de mioglobina, sendo o valor de 3,7 ng/mL. Não houve alteração na cTnI, sendo que somente dois cães do grupo NT apresentaram valores iguais a 0,36 e 0,31 ng/mL nos momentos 6 (TEI-1) e 48 h (TEI-2), respectivamente.

3.6 Creatina quinase isoenzima MB (CK-MB)

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os TEIs entre os grupos T e NT, bem como entre as coletas antes e após o período experimental no grupo S, em nenhum dos momentos avaliados (Figura 7). Os valores nos momentos basais e antes do exercício não diferiram ($P>0,05$) entre os três grupos. Os grupos NT e T apresentaram valores maiores ($P\leq 0,05$) quando comparado ao grupo S entre 1 e 6 h. Às 12, 24 e 72 h não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$). No grupo T, o pico sérico foi evidenciado com 1 h, com mediana 138,5 (102-236 U/L), permanecendo até 6 h. A partir de 12 h as concentrações não diferiram ($P>0,05$) do valor basal no grupo T. No grupo NT, o pico também foi observado com 1 h, com mediana de 160,5 (107-223 U/L), e queda após 6 h. O grupo S não apresentou oscilações significativas até 72 h.

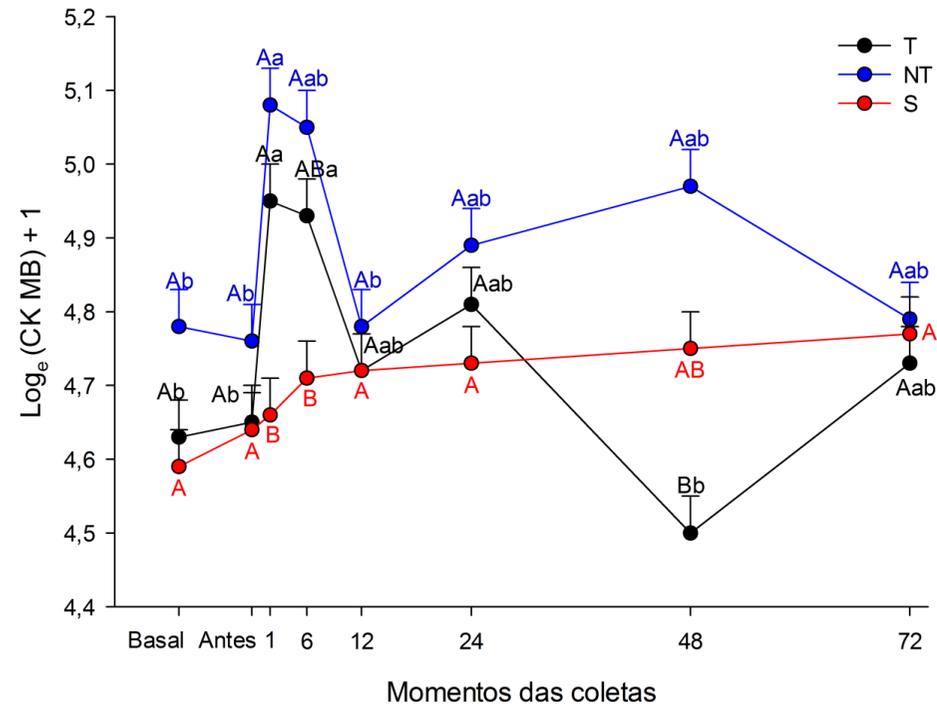


Figura 7. Cinética da atividade enzimática sérica da creatina quinase isoenzima MB (CK-MB) de 17 cães da raça Beagle distribuídos entre os grupos treinado (T, n=6) e não treinado (NT, n=5), submetidos a teste de esforço incremental (TEI), e grupo sedentário (S, n=6). Letras maiúsculas representam diferença entre os grupos, enquanto letras minúsculas correspondem à diferença intragrupos, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Utilizou-se transformação logarítmica ($\log_e(x) + 1$) para a análise estatística.

3.7 Correlação

A Tabela 2 revela os coeficientes de correlação obtidos. Houve forte correlação entre as concentrações de CK e AST, moderada correlação entre CK e CK-MB, bem como entre CK-MB e AST. Não houve correlação significativa entre os demais biomarcadores avaliados.

Tabela 2. Correlações entre biomarcadores musculares e cardíacos de cães da raça Beagle.

	CK	AST	Mioglobina	cTnl	CK-MB
CK	1.000	0.849*	0.115	0.015	0.493*
AST	0.849*	1.000	0.058	0.005	0.501*
Mioglobina	0.058	0.058	1.000	-0.000	0.094
cTnl	0.005	0.005	-0.000	1.000	-0.012
CK-MB	0.493*	0.501*	0.094	-0.012	1.000

Creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), troponina cardíaca I (cTnl), creatina quinase isoenzima MB (CK-MB). $P \leq 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Os principais achados obtidos neste estudo demonstraram que cães submetidos a esforço físico intenso apresentaram aumento transitório de biomarcadores séricos do metabolismo muscular. Ademais, em cães, parece que o transporte, contenção, cateterização e venopunção, podem alterar as atividades séricas de CK e AST. Foi possível determinar o padrão cinético das enzimas CK, AST e CK-MB que são classicamente monitoradas na espécie humana (Stone et al., 2017) e equina (Teixeira-Neto et al., 2008). Os cães que fizeram treinamento aeróbio em esteira melhoraram sua aptidão física. Este achado pode servir de base para outros estudos envolvendo cães de alto rendimento esportivo ou para elaboração de protocolos para manutenção da saúde ou terapia não farmacológica de enfermidades como obesidade e cardiopatias.

O TEI utilizado no presente estudo é rotineiramente empregado na medicina esportiva para determinação da capacidade funcional de atletas por meio da obtenção do LL e FC. Estas variáveis são empregadas para prescrever programas de treinamento, bem como para avaliar a capacidade funcional aeróbia (Piepoli et al., 2011). Em cães são relativamente escassos os estudos sobre o uso do TEI em esteira para obtenção da CLV, sendo que estas avaliações permitem a obtenção de resultados reproduzíveis, necessários para comparação com outros estudos (Piccione et al., 2012). Nesse sentido, o protocolo de TEI empregado no estudo em pauta foi satisfatório para fornecer respostas fisiológicas úteis tanto para prescrição como avaliação de um programa de atividade física aeróbia, levando-se em conta a individualidade de cada cão.

O método que utiliza a elevação abrupta da [lac] oriunda da CLV e a determinação visual da VLL foi utilizado a partir de estudo realizado em camundongos (Cunha et al., 2009). A opção por este método foi devido aos resultados obtidos a partir de estudos seminais (Restan et al., 2016; Tristão et al., 2015), realizados pelo LAFEC, que obtiveram, em cães, elevações das [lac]s relativamente menores quando comparados aos equinos (Miranda et al., 2013). Nesta última espécie, a maioria das pesquisas (Campbell, 2011) utiliza método que relaciona a velocidade com a concentração fixa de lactato em 4 mmol/l (V4),

conhecida, em inglês, como *onset blood lactate accumulation* (OBLA). Ademais, as regressões matemáticas tiveram coeficiente de determinação (R^2) positivo, indicando a existência de crescimento exponencial da CLV em cães, comportamento este classicamente estabelecido em humanos (Messias et al., 2017) e equinos (Soares et al., 2014). Sem dúvida, este é um achado que contribui com a literatura sobre fisiologia do exercício na espécie canina.

Ainda sobre a metodologia do TEI utilizado neste estudo, sabe-se que a protocolo-dependência das metodologias para obtenção da CLV (Miranda et al., 2013), pode influenciar o aumento da [lac] dos cães submetidos ao TEI. Sem dúvida, a relação entre protocolo de esforço e outros fatores como grau de aptidão física, raça e tipo de fibra muscular podem modificar a produção de lactato, sendo esta uma lacuna presente na literatura na espécie canina. Desta maneira, o procedimento utilizado na presente pesquisa foi baseado em estudo prévio (Ferasin; Marcora, 2009), que sugeriu haver um possível “delay” no transporte de lactato entre o músculo e o plasma, quando comparado aos humanos e equinos. Ademais, parece que as hemácias da espécie canina possuem capacidade maior de retirada de lactato do compartimento plasmático, via transportadores monocarboxilatos MCT1 e MCT7 (Koho et al., 2008). Estes dois mecanismos explicam a opção do protocolo aqui estabelecido, sendo prescrito intervalo de 2 min entre as etapas incrementais do TEI.

O treinamento prescrito melhorou a aptidão física dos cães, indicando aumento da capacidade funcional desses animais e, conseqüentemente, incremento da tolerância ao exercício, evidenciados pelo aumento das VLLs para o grupo T. Além disso, para este grupo, houve deslocamento da CVL para a direita após 8 semanas de treinamento, ou seja, as [lac] para uma mesma intensidade de exercício diminuíram com programa de condicionamento indicando menor necessidade de contribuição da via glicolítica e, por conseqüência, aumento da aptidão aeróbia. Este achado pode ser explicado pelo fato de que treinamento aeróbio promove aumento no número de mitocôndrias, capilares e enzimas oxidativas nas fibras musculares, maximizando a utilização do piruvato via fosforilação oxidativa (Ferraz et al., 2008).

Numa avaliação geral e empírica, a melhora da capacidade funcional após o período de condicionamento foi nítida. Nas primeiras sessões de treino, os cães

ficaram cansados e, transcorrida a primeira semana, verificou-se facilidade dos mesmos em acompanhar a velocidade estipulada na esteira. Outro aspecto observado foi à adaptabilidade apresentada pelos animais do grupo T. No decorrer das oito semanas de treinamento, os cães demonstraram menor ansiedade e agitação durante o transporte até a sala da esteira. Esta mudança comportamental positiva foi observada pelos tratadores, que relataram menor ansiedade e diminuição de disputas com outros cães, facilitando o manejo dos mesmos. Neste sentido, estudos complementares a respeito dos benefícios comportamentais promovidos pelo exercício em cães fazem-se necessários.

Também foi detectado melhora da aptidão cardiovascular. Durante o exercício físico, a FC se relaciona linearmente com o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e ambos possuem linearidade com a velocidade do exercício. Dessa forma, o monitoramento da FC foi utilizado, na presente pesquisa, para estimar indiretamente o $\dot{V}O_2$, constituindo ferramenta útil para avaliação aeróbia (Berkman et al., 2015). A FC obtida no momento de fadiga num TEI, por vezes, está próxima da $FC_{m\acute{a}x}$. Em cavalos Puro Sangue Inglês (PSI) foi observado forte correlação entre $VFC_{m\acute{a}x}$ e $\dot{V}O_{2m\acute{a}x}$, demonstrando que este índice pode ser uma ferramenta útil na avaliação da aptidão física (Gramkow; Evans, 2006). No presente estudo, foi observado maiores valores de VFC_{Fadiga} no grupo T. Em equinos, foi observado que os animais que alcançaram velocidades mais altas na $FC_{m\acute{a}x}$ foram capazes de retardar a fadiga, ou seja, alcançaram velocidades maiores com menor dependência de glicólise anaeróbia. Em cães, não foram encontrados estudos envolvendo a $VFC_{m\acute{a}x}$ durante o exercício. Contudo, a partir dos princípios fisiológicos, acreditamos que VFC_{Fadiga} seja um bom preditor de *endurance*. Desta forma, é possível afirmar que os aumentos da VLL e VFC_{Fadiga} apresentados pelo grupo T representaram adaptação metabólica aeróbia e cardiovascular em resposta ao protocolo de condicionamento.

Com relação às outras variáveis, o aumento da atividade sérica dos biomarcadores da musculatura esquelética após o exercício ocorreu, provavelmente, como consequência do metabolismo muscular exacerbado, que provocou mudanças transitórias na permeabilidade do sarcolema (Rovira et al., 2008; Teixeira-Neto et al., 2008). Em relação à CK, Meyer et al. (1992) reportaram valores de normalidade para cães entre 20 e 200 U/L. Adicionalmente, a literatura relatou que há grande variação

individual da atividade sérica normal dessa enzima para a espécie canina (Aktas et al., 1993), o que também foi evidenciado no presente estudo. Dentre os cães submetidos aos TEIs foram encontrados valores relativamente altos, em relação aos valores basais, após o transporte e a cateterização. Este fato pode ser explicado pela excitação durante o transporte e pela expectativa pré-exercício. Além disso, parece que a espécie canina é mais sensível ao processo invasivo de introdução do cateter, que provoca lesões tanto da musculatura lisa da veia jugular como do músculo esquelético adjacente. Esta explicação pode ser fundamentada a partir de estudos que relataram a importância da CK total no músculo liso de vasos de indivíduos da espécie canina e humana (Karamat et al., 2013; Morello et al., 2014; Stockham, 1995). Também foi relatado aumento da atividade sérica da CK, denominada enzima seromuscular, de cães submetidos à oclusão experimental da artéria mesentérica (Thompson et al., 1990).

Alguns estudos em cães, com diferentes intensidades de exercício e momentos de coleta distintos não encontraram alteração ou relataram discreta elevação nas atividades da CK e AST (Rovira et al., 2007; Rovira et al., 2008). Em contrapartida, estudo com Greyhounds de corrida (Lucas et al., 2015), observaram elevações significativas de CK ($584,19 \pm 695,88$ U/L), e de AST ($57,66 \pm 32,96$ U/L), quando as amostras foram coletadas 24 h após corrida, demonstrando que elevações na concentração sérica de CK e AST dependem do tipo de exercício, intensidade, duração e/ou da distância percorrida, bem como do momento da coleta (McKenzie et al., 2007). No presente estudo foram observadas elevações na atividade de CK na maioria dos cães avaliados. O pico da atividade de CK deu-se 6 h após o término do exercício em todos os grupos que fizeram TEI, retornando aos valores semelhantes aos basais em 24 h, de forma semelhante à espécie equina (Teixeira-Neto et al., 2008).

Em relação à AST, as elevações nas atividades séricas apresentaram-se mais discretas, proporcionalmente à CK, sendo que, em diversos momentos, os valores de AST não excederam os valores de referência para a espécie. Isso se deve ao fato da AST estar presente no citoplasma e nas mitocôndrias, necessitando de grau maior de comprometimento do sarcolema e da fibra muscular em si para ser liberada na corrente sanguínea. Em contrapartida, a CK, enzima presente no

citoplasma, apresenta peso molecular baixo, conseguindo ultrapassar o sarcolema mesmo que não exista um dano tecidual considerável, ou seja, um aumento moderado na permeabilidade de membrana é suficiente para que ocorra o extravasamento plasmático desta enzima (Perez et al., 1997). Em equinos, a atividade sérica da CK eleva-se primeiro que a AST, sendo que a CK é também a primeira a regressar a valores normais (Teixeira-Neto et al., 2008). Todavia, no presente estudo, a cinética da AST foi semelhante à da CK, sendo que os picos séricos de liberação ocorreram, em ambas as enzimas, 6 h após o término do exercício, sendo que houve recuperação após 24 h. Este achado pode ser explicado, possivelmente, pelo fato de as fibras musculares de cães apresentarem maior número de mitocôndrias em relação a outras espécies (Braga et al., 2016).

Sabe-se ainda que programas de treinamento podem induzir elevações basais séricas persistentes de CK (Stone et al., 2017). No estudo em questão não houve efeito do condicionamento físico, em nenhum momento, na atividade dos biomarcadores cardíacos e musculares. Entretanto, no grupo T as velocidades finais alcançadas foram maiores após o treinamento. Assim, mesmo estes cães permanecendo em exercício por mais tempo os valores médios da atividade sérica de CK e AST foram semelhantes aos encontrados no início do experimento. Além disso, os coeficientes de correlação de Pearson mostraram forte correlação entre as concentrações de CK e AST, assim como encontrado por Frank et al. (2015) em estudo com cães de trenó. Neste contexto, ambos biomarcadores mostraram poder ser utilizados, preventivamente, para predizer alterações musculares relacionadas ao treinamento na espécie canina.

Ainda sobre a cinética da CK e AST e sua relação com o monitoramento preventivo e clínico da ocorrência de rabdomiólise induzida pelo exercício, os achados deste estudo revelaram que, a despeito dos aumentos das atividades enzimáticas observadas, os cães não apresentaram sinais de lesão muscular importante. Em humanos, a atividade da CK acima de 5 vezes ao limite superior do intervalo de referência é considerada diagnóstico de rabdomiólise (Melli et al., 2005). Também em equinos, a classificação do grau de rabdomiólise é baseada nos valores de atividade sérica destas enzimas, sendo o maior grau associado a valores superiores a 1000 U/L de CK e de 1200 U/L de AST (Rivero; Piercy, 2008). No

presente estudo, diversos cães apresentaram atividade sérica de CK acima de 1000 U/L, com valor máximo de 15795 U/L no pico de atividade após 6 h. Contudo, nenhum dos cães estudados apresentou manifestações clínicas compatíveis com rabdomiólise, tais como músculos dolorosos e tensos, alterações da locomoção, ou coloração avermelhada da urina (Helton, 2009). Adicionalmente, o protocolo de teste de esforço incremental utilizado neste estudo provocou elevação transitória de mioglobina sérica somente em alguns cães e, do ponto de vista cardíaco, não houve alteração da cTnI.

A cTnI é frequentemente associada a CK-MB para incrementar a especificidade na detecção de alteração miocárdica (Yonezawa et al., 2010). Em estudo cromatográfico, cães hípidos submetidos a treinamento aeróbio observou-se, por meio de biópsia, aumento significativo na CK-MB no miocárdio do ventrículo esquerdo. Tal achado foi atribuído à hipertrofia cardíaca compensatória, resultado de uma resposta adaptativa benéfica (Stuewe et al., 2001). Ademais, em estudo com Greyhounds de corrida, apenas 5 dos 32 cães avaliados apresentaram aumento discreto nas concentrações plasmáticas de CK-MB após competição e, 24 h após o término, estes mesmos animais já apresentaram valores estatisticamente semelhantes aos basais (Tharwart et al., 2013). No presente estudo, o pico de atividade de CK-MB foi observado 1 h após os TEIs nos grupos T e NT. Os valores basais foram retomados 12 h após o término do exercício. Este achado é justificado pelo fato de a liberação da isoenzima MB ocorre de forma aguda, apresentando rápida eliminação renal quando comparada as demais isoenzima (Schober, 2005).

No grupo S não houve pico de elevação da atividade sérica de CK-MB, permanecendo estável durante todos os momentos de coleta. Este achado é de grande valia, pois sugere que, em cães, este biomarcador sofre menor impacto da coleta e do transporte, em relação à CK e AST, possivelmente, devido ao fato de sua origem ser principalmente o tecido cardíaco (1-42%) (Schober, 2005). No que diz respeito às correlações, entre CK e CK-MB houve correlação moderada, bem como entre CK-MB e AST. Pode-se estabelecer, em cães, a hipótese que este achado esteja associado à presença da CK-MB na musculatura esquelética, tendo em vista o comportamento da cTnI. Desta forma, podemos inferir que CK-MB pode ser utilizada como biomarcador muscular para a espécie canina.

5. CONCLUSÃO

O programa de condicionamento proposto induziu melhora da capacidade aeróbia dos cães treinados, sem impacto no comportamento dos biomarcadores musculares e cardíacos. Os biomarcadores musculares revelaram padrão cinético com elevações transitórias e retorno aos valores basais. Os achados relacionados à CK-MB, sem elevação da cTnI, apontam para ausência de lesões musculares cardíacas, sugerindo que o protocolo de TEI e o programa de condicionamento aeróbio não promoveram dano miocárdico.

REFERÊNCIAS

- A Braga, S., GF Padilha, F., MR Ferreira, A., 2016. Evaluation of Muscle Fiber Types in German Shepherd Dogs of Different Ages. *Anat. Rec.* 299, 1540–1547.
- Aktas, M., Auguste, D., Lefebvre, H.P., Toutain, P.L., Braun, J.P., 1993. Creatine kinase in the dog: A review. *Vet. Res. Commun.* doi:10.1007/BF01839386
- Berkman, C., Teixeira, L.G., Pereira, M.C., Bernardi, N.S., Neto, A.D.Q., Ferraz, G.D.C., 2015. Distance exercised during submaximal training on race winnings for Thoroughbred racehorses 1268–1273.
- Campbell, E.H., 2011. Lactate-driven equine conditioning programmes. *Vet. J.* doi:10.1016/j.tvjl.2010.11.012
- Clarkson, P.M., Kearns, A.K., Rouzier, P., Rubin, R., Thompson, P.D., 2006. Serum creatine kinase levels and renal function measures in exertional muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, 623–627. doi:10.1249/01.mss.0000210192.49210.fc
- Cunha, R.R., de Carvalho Cunha, V.N., Segundo, P.R., Moreira, S.R., Kokubun, E., Campbell, C.S.G., de Oliveira, R.J., Simões, H.G., 2009. Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. *Cell Biochem. Funct.* 27, 351–357. doi:10.1002/cbf.1580
- Diniz, P.P.V.P., Schwartz, D.S., Collicchio-Zuanaze, R.C., 2007. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: Two case reports. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 59, 85–89. doi:10.1590/S0102-09352007000100015
- Faude, O., 2009. Lactate Threshold Concepts - How Valid are They? *Institut Sport. Med. Univ. Paderborn* 6, 472.

- Ferasin, L., Marcora, S., 2009. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate , heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers 839–845. doi:10.1007/s00360-009-0367-z
- Ferraz, G.C., D'Angelis, F.H.F., Teixeira-Neto, A.R., Freitas, E.V. V, Lacerda-Neto, J.C., Queiroz-Neto, A., 2008. Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 60, 256–259. doi:10.1590/S0102-09352008000100035
- Frank, L., Mann, S., Johnson, J., Levine, C., Downey, R., Griffiths, C., Wakshlag, J., 2015. Plasma chemistry before and after two consecutive days of racing in sled dogs: associations between muscle damage and electrolyte status. *Comp. Exerc. Physiol.* 11, 151–158. doi:10.3920/CEP150020
- Gramkow, H.L., Evans, D.L., 2006. Correlation of race earnings with velocity at maximal heart rate during a field exercise test in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet. J.* 38, 118–122. doi:10.1111/j.2042-3306.2006.tb05526.x
- Helton, W.S., 2009. *Canine ergonomics: the science of working dogs.* CRC Press.
- Karamat, F.A., Clark, J.F., Brewster, L.M., 2013. Is creatine kinase the intrinsic factor of smooth muscle enhancing vascular contractility in subjects of African ancestry? *Hypertension.* doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01853
- Koho, N.M., Raekallio, M., Kuusela, E., Vuolle, J., Pösö, A.R., 2008. Lactate transport in canine red blood cells. *Am. J. Vet. Res.* 69, 1091–1096. doi:10.2460/ajvr.69.8.1091
- Lavecchio, D., Marin, L.M., Baumwart, R., Iazbik, M.C., Westendorf, N., Couto, C.G., 2009. Serum Cardiac Troponin I Concentration in Retired Racing Greyhounds 87–90.
- Lucas, V., Barrera, R., Duque, F.J., Ruiz, P., Zaragoza, C., 2015. Effect of exercise on serum markers of muscle. *Am. J. Vet. Res.* 76, 637–643. doi:10.2460/ajvr.76.7.637
- McKenzie, E.C., Jose-Cunilleras, E., Hinchcliff, K.W., Holbrook, T.C., Royer, C., Payton, M.E., Williamson, K., Nelson, S., Willard, M.D., Davis, M.S., 2007. Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 1486–1492. doi:10.2460/javma.230.10.1486

- Melli, G., Chaudhry, V., Cornblath, D.R., 2005. Rhabdomyolysis. *Medicine (Baltimore)*. 84, 377–385. doi:10.1097/01.md.0000188565.48918.41
- Messias, L.H.D., Gobatto, C.A., Beck, W.R., Manchado-Gobatto, F.B., 2017. The lactate minimum test: Concept, methodological aspects and insights for future investigations in human and animal models. *Front. Physiol.* doi:10.3389/fphys.2017.00389
- Meyer, D.J.C., Rich, E.H., Meyer, L.J.D.J., Coles, E.H., Rich, L.J., 1992. *Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis*.
- Miranda, M., Queiroz-Neto, A., Silva-Júnior, J., Pereira, M., Soares, O., Borghi, R., Ferraz, G., 2014. Comparison of the lactate minimum speed and the maximal lactate steady state to determine aerobic capacity in purebred Arabian horses. *N. Z. Vet. J.* 62, 15–20. doi:10.1080/00480169.2013.815103
- Morello, F., Piler, P., Novak, M., Kruzliak, P., 2014. Biomarkers for diagnosis and prognostic stratification of aortic dissection: challenges and perspectives. *Biomark. Med.* 8, 931–41. doi:10.2217/bmm.14.38
- Pellegrino, F.J., Risso, A.L., Arias, D.O., Blanco, P.G., Corrada, Y., 2014. Optimización del rendimiento deportivo en caninos. *Rev. Investig. Vet. del Peru* 25, 449–454. doi:10.15381/rivep.v25i4.10778
- PEREZ, R., García, M., CABEZAS, I., Guzmán, R., MERINO, V., VALENZUELA, S., GONZALEZ, C., 1997. Actividad física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. *Arch. Med. Vet.* 29, 221–234.
- Piccione, G., Casella, S., Panzera, M., Giannetto, C., Fazio, F., 2012. Effect of Moderate Treadmill Exercise on Some Physiological Parameters in Untrained Beagle Dogs. *Exp. Anim.* 61, 511–515. doi:10.1538/expanim.61.511
- Piepoli, M.F., Conraads, V., Corr??, U., Dickstein, K., Francis, D.P., Jaarsma, T., McMurray, J., Pieske, B., Piotrowicz, E., Schmid, J.P., Anker, S.D., Solal, A.C., Filippatos, G.S., Hoes, A.W., Gielen, S., Giannuzzi, P., Ponikowski, P.P., 2011. Exercise training in heart failure: From theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur. J. Heart Fail.* 13, 347–357. doi:10.1093/eurjhf/hfr017

- Restan, A.Z., Zacché, E., Braz, J., Canola, R.M., Beretta, S., Queiroz-neto, A., Ferraz, G.C., Camacho, A.A., 2016. Determining The Lactate And Glucose Thresholds And The Acid-base Imbalances In Beagles Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1485.
- Rivero, J.L.L., Piercy, J., 2008. Prevalence and clinical management of equine exertional rhabdomyolysis syndrome in different types of sport horses, in: *Proc. Conference on Equine Sports Medicine and Science*. A. Lindner, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands. pp. 81–90.
- Rovira, S., Munoz, A., Benito, M., 2008. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. *Vet. Med. (Praha)*. 53, 333–346.
- Rovira, S., Muñoz, A., Benito, M., 2007. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 30–35. doi:10.1111/j.1939-165X.2007.tb00178.x
- Schober, K.E., 2005. Biochemical markers of cardiovascular disease. *Textb. Vet. Intern. Med.* 6, 940–948.
- Smith, J.E., 2004. Effects of prolonged strenuous exercise (marathon running) on biochemical and haematological markers used in the investigation of patients in the emergency department. *Br. J. Sports Med.* 38, 292–294. doi:10.1136/bjism.2002.002873
- Soares, O.A.B., Ferraz, G.C., Martins, C.B., Dias, D.P.M., Lacerda-Neto, J.C., Queiroz-Neto, A., 2014. Comparison of maximal lactate steady state with V₂, V₄, individual anaerobic threshold and lactate minimum speed in horses. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 66, 39–46. doi:10.1590/S0102-09352014000100007
- Spratt, D.P., Mellanby, R.J., Drury, N., Archer, J., 2005. Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *J. Small Anim. Pract.* 46, 139–145. doi:10.1111/j.1748-5827.2005.tb00304.x
- Stockham, S.L., 1995. Interpretation of equine serum biochemical profile results. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 11, 391–414.

- Stone, J.D., Kreutzer, A., Mata, J.D., Nystrom, M.G., Jagim, A.R., Jones, M.T., Oliver, J.M., 2017. Changes in Creatine Kinase and Hormones over the Course of an American Football Season. *J. Strength Cond. Res.* 1. doi:10.1519/JSC.0000000000001920
- Stuewe, S.R., Gwartz, P.A., Mallet, R.T., 2001. Exercise training increases creatine kinase capacity in canine myocardium. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33, 92–98.
- Teixeira-Neto, A.R., Ferraz, G.C., Moscardini, A.R.C., Balsamo, G.M., Souza, J.C.F., Queiroz-Neto, A., 2008. Alterations in muscular enzymes of horses competing long-distance endurance rides under tropical climate. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 60, 543–549. doi:10.1590/S0102-09352008000300004
- Tharwat, M., Al-Sobayil, F., Buczinski, S., 2013. Influence of racing on the serum concentrations of the cardiac biomarkers troponin I and creatine kinase myocardial band (CK-MB) in racing greyhounds. *Vet. J.* 197, 900–902. doi:10.1016/j.tvjl.2013.01.023
- Thompson, J.S., Bragg, L.E., West, W.W., 1990. Serum enzyme levels during intestinal ischemia. *Ann. Surg.* 211, 369–73.
- Tristão, A.P.P.A., Adams, F.K., Restan, W.A.Z., Moranza, H.G., Innocente, P.S., Sousa, M.G., Ferraz, G.C., Camacho, A.A., 2015. Determination Of Lactate Threshold In Dogs With Degenerative Mitral Valve Disease Submitted To Incremental Exercise Test. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1144–1145.
- VALBERG, S., JÖNSSON, L., LINDHOLM, A., HOLMGREN, N., 1993. Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet. J.* 25, 11–16. doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb02893.x
- Wakshlag, J.J., Kraus, M.S., Gelzer, A.R., Downey, R.L., Vacchani, P., 2010. The Influence of High-Intensity Mode Rate Duration Exercise on Cardiac Troponin I and C - Reactive Protein in Sled Dogs 1388–1392.
- Yonezawa, L.A., Machado, L.P., Silveira, V.F., Watanabe, M.J., Saito, M.E., Kitamura, S.S., Kohayagawa, A., 2009. Exame eletrocardiográfico em equinos da raça puro sangue Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade e suplementação com vitamina E. *Arch. Vet. Sci.* 14, 134–142.

ANEXO 1

Tabela 1. Mediana, amplitude (mín-máx) e coeficiente de variação (CV(%)) das atividades séricas de creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase isoenzima MB (CK-MB) de 17 cães da raça Beagle, distribuídos em grupos treinado (T, n=6) e não treinado (NT, n=5), submetidos a teste de esforço incremental (TEI), e grupo sedentário (S, n=6).

		Momentos							
		Basal	Antes	1h	6h	12h	24h	48h	72h
CK (U/L)	T (n=6)	136,5	792	3173	4035	2048	645	257	415,5
		(82 - 601)	(64 - 3120)	(164 - 12342)	(164 - 15795)	(82 - 7829)	(85 - 2550)	(82 - 1380)	(82 - 5542)
		89,4%	99,4%	104,8%	107,6%	101,3%	99,9%	104,6%	181,2%
	NT (n=5)	259,5	246,2	820,9	1190,5	478,85	259,95	273,6	287,35
		(109 - 765)	(82 - 602)	(357,7 - 4077)	(629 - 4433)	(219 - 2709)	(137 - 2134)	(137 - 2490)	(109 - 1231)
		71,4%	60,2%	98,4%	74,9%	98,7%	131,3%	119,1%	88,4%
	S (n=6)	135	135	190	405	375	165	182	120
		(48 - 539)	(48 - 539)	(72 - 780)	(72 - 12343)	(72 - 3278)	(72 - 922)	(72 - 990)	(72 - 388)
		76,9%	76,9%	86,9%	199,3%	127,4%	97,2%	104,3%	68,8%
AST (U/L)	T (n=6)	28,5	65	120	148,5	112,5	65	38,5	54,5
		(20 - 68)	(20 - 146)	(26 - 466)	(15 - 738)	(20 - 502)	(20 - 204)	(15 - 89)	(20 - 272)
		50,1%	64,5%	92,4%	110,9%	104,6%	75,4%	46,5%	108,3%
	NT (n=5)	41	38,5	59,5	73	52	38,5	47	41
		(20 - 68)	(26 - 52)	(41 - 141)	(52 - 178)	(31 - 131)	(31 - 99)	(26 - 94)	(26 - 73)
		41,2%	26,3%	42,6%	44,1%	53,7%	47,1%	40,6%	30,8%
	S (n=6)	31	31	33,5	49,5	47	33,5	33,5	31
		(15 - 68)	(15 - 68)	(15 - 73)	(20 - 314)	(20 - 240)	(20 - 99)	(15 - 110)	(20 - 62)
		41,1%	41,1%	41,3%	104,6%	83,2%	57,1%	61,1%	40,2%
CK-MB (U/L)	T (n=6)	99	100	138,5	150,5	99,5	124	89	105
		(84 - 131)	(67 - 134)	(102 - 236)	(84 - 251)	(79 - 216)	(101 - 152)	(47 - 129)	(99 - 163)
		16,8%	19,1%	25,1%	33,6%	36,1%	12,6%	24,9%	16,8%
	NT (n=5)	117	118	160,5	155,5	113	131	148,5	118
		(94 - 170)	(90 - 132)	(107 - 223)	(119 - 250)	(80 - 150)	(113 - 156)	(88 - 214)	(89 - 141)
		22,7%	11,3%	20,5%	25,2%	18,9%	10,9%	26,1%	11,7%
	S (n=6)	105	105	103	108	112	111	121	115
		(83 - 112)	(83 - 122)	(80 - 167)	(78 - 169)	(69 - 182)	(82 - 155)	(79 - 165)	(78 - 174)
		12,2%	12,2%	22,9%	24,7%	26,8%	22,4%	21,4%	22,5%

