

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

**METABOLISMO DO FERRO E LIPOPEROXIDAÇÃO ERITROCITÁRIA  
EM EQUINOS PURO SANGUE ÁRABE SUBMETIDOS AO  
EXERCÍCIO EM ESTEIRA E SUPLEMENTADOS COM VITAMINA E  
(DL-ALFA-TOCOFEROL)**

**LUCIANA PEREIRA MACHADO**

Botucatu - SP  
Agosto – 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**METABOLISMO DO FERRO E LIPOPEROXIDAÇÃO ERITROCITÁRIA  
EM EQUINOS PURO SANGUE ÁRABE SUBMETIDOS AO  
EXERCÍCIO EM ESTEIRA E SUPLEMENTADOS COM VITAMINA E  
(DL-ALFA-TOCOFEROL)**

**LUCIANA PEREIRA MACHADO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aguemí Kohayagawa**

**Botucatu –SP  
Agosto, 2009**

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

Machado, Luciana Pereira.

Metabolismo do ferro e lipoperoxidação eritrocitária em equinos Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício em esteira e suplementados com vitamina E (dl-alfa-tocoferol)./ Luciana Pereira Machado. – Botucatu [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientadora: Aguemí Kohayagawa

Assunto CAPES: 50503006

1. Equino - Exercícios físicos 2. Puro Sangue Árabe (equino) - Aspectos endócrinos 3. Metabolismo

CDD 636.108971

Palavras-chave: Equino; Exercício; Lipoperoxidação eritrocitária; Metabolismo do ferro; Vitamina E.

Nome do Autor: Luciana Pereira Machado

Título: Metabolismo do ferro e lipoperoxidação eritrocitária em equinos Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício em esteira e suplementados com vitamina E (dl-alfa-tocoferol)

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Agumi Kohayagawa  
Presidente e Orientadora  
Departamento de Clínica Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP – Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Kiomi Takahira  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP – Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Regina Stipp Balarin  
Membro  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Paulo Cesar Ciarlini  
Membro  
Departamento de Medicina Veterinária  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Campus de Araçatuba

Data da Defesa: 05 de agosto de 2009.

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Feliciano e

Maria Edelvira.

Pessoas simples que empenharam suas vidas na

formação dos filhos.

Exemplos de abnegação, humildade e amor.

Que eu possa merecer o orgulho de meus pais.

Aos meus irmãos, Osmar e Fabiana,  
e aos meus cunhados Rosenir e Namour,  
pelo amor e apoio constante,  
compreendendo e suprimo minha ausência na  
família.

À Profa. Dra. Aguemí Kohayagawa,  
exemplo de dedicação e sabedoria, presença  
alegre e carinhosa,  
apoio e compreensão nos momentos difíceis.  
Sua conversa amiga sempre me renovou as  
esperanças.



# AGRADECIMENTOS

**Este trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:**

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por possibilitar e execução deste trabalho por meio da Bolsa de Estudos e Taxa de Bancada, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação.*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro por meio do Auxílio à Pesquisa e auxílios extras para concerto de equipamentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.*

*Ao Curso de Pós-Graduação desta Faculdade, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional.*

*À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Agumi Kohayagawa pela confiança depositada permitindo a realização deste trabalho com o qual aprendi muito, mais do que isso agradeço a oportunidade de poder desfrutar da convivência com uma pessoa de tão grandes conhecimentos científicos e sabedoria de vida.*

*Ao Prof. Dr. Armen Thomassian agradeço não apenas por permitir a utilização do Centro de Medicina Esportiva Equina e da esteira para equinos indispensáveis à realização deste experimento, mas principalmente por compartilhar o seu amplo conhecimento em Medicina Esportiva Equina e pelo auxílio nos momentos de dificuldades.*

*Às companheiras de equipe Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mere Erika Saito, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Veridiana Fernandes da Silveira e Letícia Andreza Yonezawa, pilares deste trabalho em todas as fases, com quem aprendi muito, agradeço a amizade, solidariedade e paciência. Este trabalho tem um pouco da característica e suor de cada uma destas brilhantes pesquisadoras.*

*Ao Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe exemplo de profissionalismo, além do auxílio indispensável na utilização da esteira para equinos, agradeço pelos conhecimentos transmitido e companheirismo.*

*Aos residentes e ex-residentes do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária desta Faculdade, Rolf Becker Modesto, Bruno Carvalho Menarim e Lucas H. Alfaia pelos ensinamentos transmitidos durante o projeto de pesquisa, pela ajuda inigualável com o manejo dos equinos.*

*Aos professores de Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina Kiomi Takahira e Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes sempre prontos a colaborar no que fosse preciso.*

*Aos funcionários do Hospital Veterinário desta Faculdade, José Correa, Melissa Ágata Saleme, Antônio G. Donizete, Luiz Souza Pinto, Nadir Silvestre de Almeida, João Borioli Cassetari, Nelson Adriano, pela prontidão e ajuda nos momentos mais inesperados.*

À Maria Luiza Cassetari, responsável pelo Laboratório de Nutrição do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, pela disponibilização do aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e pela auxílio nas dosagens do malondialdeído e vitamina E.

À Sílvia Regina T. Estevam e Neísa Maria Cechinato, funcionárias do Laboratório de Nutrição do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, pelo auxílio nas dosagens do malondialdeído e vitamina E.

À Dra. Adriana Polachini do Valle do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp-Botucatu, pela disponibilização dos analisadores bioquímicos automáticos.

A Profa. Dra. Eunice Oba do Departamento Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, pelo apoio na dosagem de cortisol sérico disponibilizando o aparelho para a leitura das amostras.

Aos Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni pelo apoio como supervisor do Hospital Veterinário desta Faculdade.

Aos professores do Departamento de Estatística do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lídia Raquel de Carvalho pela análise estatística emergencial e ao Prof. Dr. César Augusto Taconeli pelo desenvolvimento do modelo estatístico e pela análise estatística inicial.

À secretária do Departamento de Clínica Veterinária desta Faculdade, Marlene Dias Camargo, pela amizade e apoio durante o doutorado.

À Denise Aparecida Fioravanti Garcia, José Roberto da Lalla Junior e Maria Aparecida D. A. Manuel da Secretaria de Pós-Graduação desta Faculdade, pelo incentivo e auxílio.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP – Botucatu, especialmente a Selma Maria de Jesus pelos serviços prestados com tão bom humor e carinho.

Ao Prof. Dr José Lindenberg Rocha Sarmiento diretor do campus Prof<sup>a</sup> Cinobelina Elvas, da Universidade Federal do Piauí, e ao Prof Dr. Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira, coordenador do curso de medicina veterinária, pela compreensão e apoio nos momentos em que precisei me ausentar para cumprir o projeto de doutorado.

À amiga Valeria de Oliveira pela sua torcida e por ceder seu dom artístico na arte gráfica da tese.

Aos queridos amigos, Mere Erika Saito, Rafael Torres Neto, Aruaque Lotufo Ferraz de Oliveira, Perez Ramos Badial, Emiliano Cisnero e Nicole Ruas de Souza, por compartilharem comigo o mesmo teto, quantos momentos inesquecíveis, apoio na

*difficuldade, até nas desavenças um aprendizado, alegria de voltar para casa após um dia cansativo de trabalho, uma verdadeira família.*

*Ao querido amigo Luciano Santos da Fonseca, que me acompanhou desde a chegada a Botucatu para estágio, que sempre me apoiou e divertiu. Obrigada por sua presença alegre em minha vida e pela ajuda imprescindível com a impressão dos bonecos da tese.*

*A amiga Sílvia Maria Almeida e sua família, que me adotaram desde o mestrado, por me doarem a alegria de seu ambiente familiar e seu primo Ricardo Almeida Machado meu adorador namorado, que foi minha energia nesse final de doutorado.*

*Aos queridos amigos que fiz em Botucatu, Adriano Rubini, Catharine Ferrazoli, Edicarlos, Edna, Flávia Quaresma e família, José Maria Russo Junior, José Paes Filho, Lívia, Ligia, Maria do Carmo Vaillati, Satie Katagiri, Wolff, e aos que não foram mencionados, mas foram todos muito importantes, me renovando as energias com sua amizade.*

*As queridas amigas e companheiras de Bom Jesus, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leilane Rocha Barros Dourado e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Cristina Mancin, que muito me apoiaram nestes últimos e cruciais momentos.*

*A querida amiga Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karina Rodrigues dos Santos, que me orientou no estágio, foi minha vizinha no mestrado, amiga no doutorado, companheira de concurso e agora parceira de trabalho. Obrigada pelo apoio e amizade em todos os momentos.*

*E principalmente, a Deus que com sua sabedoria e bondade infinita guiou-me em todos os momentos para o melhor caminho.*

Todo mundo ama um dia  
Todo mundo chora  
Um dia a gente chega  
Um outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história  
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
De ser feliz...

(Almir Sater, Renato Teixeira)

LISTA DE SIGLAS E  
ABREVIATURAS

## SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>µg/dL</b>	- Micro grama por decilitro
<b>µg/L</b>	- Micro grama por litro
<b>µmol/L</b>	- Micro mol por litro
<b>ANOVA</b>	- Análise de variância
<b>BHT</b>	- Hidroxitolueno butilado
<b>CLLF</b>	- Capacidade latente de ligação do ferro
<b>CTLF</b>	- Capacidade total de ligação do ferro
<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetracético
<b>ERO</b>	- Espécies reativas de oxigênio
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	- Ferro ferroso
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	- Ferro férrico
<b>GC</b>	- Grupo controle
<b>GE</b>	- Grupo suplementado com vitamina E
<b>H<sup>+</sup></b>	- Íon hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	- Peróxido de hidrogênio
<b>HCl</b>	- Ácido clorídrico
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	- Radical hidroperoxila
<b>HPLC</b>	- Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IL-6</b>	- Interleucina 6
<b>IST</b>	- Índice de saturação da transferrina
<b>L<sup>•</sup></b>	- Radical lipídico
<b>LOO<sup>•</sup></b>	- Radical peroxila
<b>m/s</b>	- Metros por segundo
<b>M0</b>	- Momento antes do exercício, no repouso
<b>MDA</b>	- Malondialdeído
<b>MDA-Erit-basal</b>	- Malondialdeído eritrocitário basal

<b>MDA-Erit-estimulado</b>	- Malondialdeído eritrocitário após estímulo oxidativo
<b>NaCl</b>	- Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	- Hidróxido de sódio
<b>ng/mL</b>	- Nanograma por mililitro
<b>nmol/mL</b>	- Nanomol por mililitro
<b>nM / gHb</b>	- Nanomol por grama de hemoglobina
<b>O<sub>2</sub></b>	- Oxigênio molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	- Ânion superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	- Radical hidroxila
<b>P1</b>	- Prova de exercício progressivo 1 (antes do treinamento)
<b>P2</b>	- Prova de exercício progressivo 2 (após o treinamento)
<b>PBS</b>	- Solução salina tamponada com fosfato
<b>PE</b>	- Momento imediatamente após o exercício
<b>pH</b>	- Potencial hidrogeniônico
<b>PSA</b>	- Puro sangue árabe
<b>R</b>	- R <i>Development Core Team</i>
<b>RP-18</b>	- Coluna para HPLC de fase reversa com carbono 18
<b>SAS</b>	- <i>Statistical analysis system</i>
<b>sTfr</b>	- Receptor solúvel de transferrina
<b>TBA</b>	- Ácido tiobarbitúrico
<b>VG</b>	- Volume globular



# SUMÁRIO

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	
<b>RESUMO.....</b>	1
<b>ABSTRACT.....</b>	2
<b>CAPÍTULO I</b>	
1 Introdução Geral.....	3
2 Revisão de Literatura.....	5
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Artigo: Metabolismo do ferro em equinos - efeito do exercício e do         treinamento em esteira e da suplementação com vitamina         E .....</b>	15
Resumo.....	16
1 Introdução.....	17
2 Material e Métodos.....	19
3 Resultados.....	23
4 Discussão.....	26
5 Agradecimentos.....	31
6 Referências.....	31
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Artigo: Malondialdeído eritrocitário e sérico na avaliação da         lipoperoxidação induzida pelo exercício em         equinos.....</b>	36
Resumo.....	37
1 Introdução.....	38
2 Material e Métodos.....	40
3 Resultados.....	43
4 Discussão.....	45
5 Agradecimentos.....	48
6 Referências.....	49
<b>CAPÍTULO IV</b>	
1 Considerações finais.....	52
2 Referências.....	54
<b>ANEXOS</b>	61

RESUMO E ABSTRACT

MACHADO, L.P. **Metabolismo do ferro e lipoperoxidação eritrocitária em equinos Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício em esteira e suplementados com vitamina E (dl-alfa-tocoferol)**. Botucatu, 2009. 71p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício progressivo em esteira de alta velocidade, do treinamento e da suplementação com vitamina E no metabolismo do ferro e na lipoperoxidação eritrocitária em equinos Puro Sangue Árabe. Foram utilizados 16 animais, distribuídos em dois grupos: controle (GC=8) e suplementado com vitamina E (GE=8) (1.000 U/animal/dia). Os equinos não treinados foram submetidos a uma prova de exercício progressivo (P1). Em seguida, foram treinados por 20 dias e submetidos a uma segunda prova de exercício (P2). O protocolo de exercício para as duas provas iniciou-se a 1,8m/s por 5 min, 4m/s por 3min, 6m/s por 2min seguido de fases de 1min em velocidades crescentes até que os animais conseguissem manter-se em exercício, com a esteira inclinada a +7%. Não houve influência da suplementação com vitamina E ou do treinamento no metabolismo do ferro. O ferro sérico aumentou imediatamente após o exercício por hemoconcentração e houve redução por sequestro após 6h, retornando aos valores basais em 24h. O exercício induziu “pseudoanemia” entre 6 a 120h após o exercício nos animais não treinados. Não houve alteração na concentração de ferritina sérica. O MDA eritrocitário basal foi maior nos animais treinados e houve maior produção *in vitro* de MDA eritrocitário nos animais suplementados. O MDA sérico aumentou 30min após o exercício e a concentração de vitamina E sérica não se alterou. Conclui-se que este protocolo de exercício promove alteração da dinâmica de distribuição do ferro, mas não altera o conteúdo total de ferro do organismo. A mensuração do MDA sérico é sensível para avaliar o estresse oxidativo induzido pelo exercício, porém o MDA eritrocitário basal é mais eficiente para avaliar o estresse do treinamento. A suplementação com vitamina E não impediu o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** Cavalo, exercício, estresse oxidativo, metabolismo do ferro, tocoferol.

MACHADO, L.P. **Iron metabolism and erythrocyte lipoperoxidation in Arabian horses submitted to exercise in treadmill and supplemented with vitamin E (dl-alpha-tocopherol)**. Botucatu, 2009. 71p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the effects of incremental exercise in high-speed treadmill, training and vitamin E supplementation on iron metabolism and erythrocyte lipoperoxidation in Arabian horses. Sixteen animals were distributed into two groups: control (GC=8) and supplemented with vitamin E (GE=8) (1,000 U/animal/day). The untrained horses were submitted to an incremental exercise trial (P1). Then, they were submitted to a 20 day training period and to a second incremental exercise trial (P2). Exercise protocol for two tests was started with 1.8m/s for 5 min, 4m/s for 3 min, 6m/s for 2 min and right after, periods of 1 min and challenging the equines with increasing speeds until the animals hasn't no condition to prolong the exercise. There was no influence of vitamin E supplementation or training on iron metabolism. Serum iron levels increased immediately after exercise due to hemoconcentration and there was a reduction by sequestration after 6 h, which returned to basal values in 24 h. The exercise induced a "pseud anemia" 6 to 120 h after the exercise in untrained animals. There was no alteration in serum ferritin concentration. Basal erythrocyte MDA was higher in trained animals and there was major *in vitro* erythrocyte MDA production in supplemented animals. Serum MDA elevated 30 min after exercise and vitamin E concentration did not change. In conclusion, this exercise protocol promotes changes in iron distribution dynamic, but do not change the total iron containing in the organism. Serum MDA measurement is sensitive to evaluate the oxidative stress induced by exercise, however basal erythrocyte MDA is more efficient to evaluate training stress. Vitamin E supplementation not avoids oxidative stress.

**Key words:** horse, exercise, oxidative stress, iron metabolism, tocopherol.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

Os eritrócitos possuem funções vitais de transporte de oxigênio ( $O_2$ ) e dióxido de carbono, e tamponamento de íons hidrogênio ( $H^+$ ) (HARVEY, 1997). Particularmente nos equinos, o baço armazena grande quantidade de eritrócitos, quando liberados para a circulação, por contração esplênica, aumentam a capacidade de transporte de  $O_2$  (BOUCHER et al., 1981; MASINI et al., 2000).

O transporte de  $O_2$  nos eritrócitos é realizado pela hemoglobina e depende da presença do ferro nesta molécula. O ferro está presente em várias proteínas e enzimas, sendo essencial para a síntese do ácido desoxirribonucléico, transporte de elétrons na respiração celular e várias outras reações metabólicas (ALENCAR et al., 2002; ALMEIDA et al., 2007; DUNN et al., 2007). O metabolismo do ferro depende da sua disponibilidade na dieta, da digestão e absorção intestinal, do transporte plasmático, da captação pelas células-alvo e dos mecanismos de estoque, reciclagem e excreção (ALENCAR et al., 2002; ATANASIU et al., 2006; DUNN et al., 2007).

Em sportistas humanos, a deficiência de ferro é frequente e está relacionada à redução do desempenho atlético (SCHUMACHER et al., 2002). Possivelmente influenciados por esses conceitos, criadores e veterinários de cavalos de esporte demonstram grande preocupação com a deficiência de ferro, evidenciada pela ampla utilização de suplementos (SMITH et al., 1986; SNOW e HARRIS, 1989; HYYPPA et al., 2002). A suplementação em equinos não deficientes induz o acúmulo excessivo de ferro no organismo (SMITH et al., 1986; EDENS et al., 1993). O ferro livre pode ser deletério, promovendo a formação de radicais livres (PEELING et al., 2008).

A eficiente distribuição e liberação do  $O_2$  para os músculos durante o exercício é indispensável para o desempenho atlético máximo (SMITH et al., 1995), contudo, o maior consumo de  $O_2$  implica em produção de metabólitos de alta reatividade, denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). A contínua exposição ao  $O_2$  e a presença de ferro e lipídios insaturados tornam os eritrócitos particularmente susceptíveis à lesão oxidativa (HEBBEL, 1986; HATHERILL et al., 1991).

Em condições fisiológicas, as ERO são consequência natural do metabolismo oxidativo e participam da regulação de vários eventos celulares, sendo produzidas em níveis compatíveis com a capacidade de defesa do sistema antioxidante

(HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001; KINNUNEN et al., 2005). Durante o exercício ocorre um aumento no consumo de O<sub>2</sub> e produção de ERO além da capacidade de defesa promovendo estresse oxidativo (SJÖDIN et al., 1990; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001).

As lesões oxidativas eritrocitárias ocorrem como resultado da oxidação e desnaturação da hemoglobina e das alterações causadas pelas ERO aos lipídios e proteínas de membrana (HATHERILL et al., 1991). A oxidação dos lipídios, lipoperoxidação, tem importância particular por ser uma reação em cadeia devido à formação dos peróxidos lipídicos, com poder de oxidar outros lipídios e propagar a reação (BURTON e TRABER, 1990; HALLIWELL, 1994). Vários estudos em equinos evidenciam o aumento da produção de ERO pelo exercício (AVELLINI et al., 1999; BALOHG et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004).

Ao contrário da maioria das células, os eritrócitos não têm capacidade de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados e a manutenção de níveis adequados de antioxidantes é extremamente importante (CARRELL et al., 1975; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Um potente antioxidante natural é a vitamina E, cuja principal função é interromper a propagação da reação de lipoperoxidação (BURTON e TRABER, 1990; HALLIWELL, 1994). A vitamina E é incorporada a bicamada lipídica da membrana eritrocitária por uma proteína de membrana (DUTTA-ROY et al., 1994) e mantém a estabilidade das membranas, tendo papel importante na prevenção da hemólise (HATHERILL et al., 1991; MEYDANI, 1995). Segundo Yur et al. (2008) a suplementação com vitamina E também exerce efeito sobre a concentração sérica de ferro.

Na última década, mais de 100 estudos abordaram o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em equinos, porém poucos avaliaram o efeito da suplementação oral com antioxidantes (KIRSCHVINK et al., 2008). Silveira (2008) utilizou a suplementação oral com vitamina E constando que esta foi eficiente para evitar a propagação das ERO e amenizar o estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do exercício, do treinamento e da suplementação oral com vitamina E sobre o metabolismo do ferro e sobre a susceptibilidade dos eritrócitos a lipoperoxidação.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A molécula de hemoglobina representa o maior conteúdo de ferro no organismo e possui a função vital de transportar o O<sub>2</sub> para as células. Mioglobina, citocromos, peroxidases, ribonucleotídeo redutase e desidrogenase succínica também possuem ferro na sua constituição (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002; ALMEIDA et al., 2007).

O ferro existe em duas formas químicas: Fe<sup>3+</sup> ou forma férrica e o Fe<sup>2+</sup> ou forma ferrosa. Para ser absorvido, o Fe<sup>3+</sup> precisa ser reduzido a Fe<sup>2+</sup>. Isto ocorre na superfície apical dos enterócitos e é facilitada pela ação da enzima citocromo-b duodeno ferro redutase (DUNN et al., 2007). O conteúdo de ferro corporal também influencia a sua absorção intestinal, a absorção aumenta quando ocorre perda de ferro e diminui quando há grandes estoques no organismo (ALENCAR et al., 2002). O processo de absorção do ferro ocorre em várias etapas. Primeiro há a captação pela superfície apical dos enterócitos, seguida do seu transporte transcelular e finalmente o efluxo para os capilares pela membrana basolateral do enterócito (ATANASIU et al., 2006).

A transferrina, proteína sintetizada principalmente nos hepatócitos e macrófagos, é responsável pelo transporte do ferro no plasma e líquidos extracelulares (ALENCAR et al., 2002). O ferro livre possui atividade oxido-redutora, podendo promover a formação de radicais livres pelas reações de Fenton e de Harber-Weiss, com grande potencial lesivo para os tecidos. A transferrina mantém o ferro em uma forma solúvel e não tóxica, evitando a formação de radicais livres (PEELING et al., 2008).

A entrada do ferro nas células também depende da transferrina, principalmente nos precursores eritróides da medula óssea, hepatócitos e monócitos (SMITH, 1997; PEELING et al., 2008). Nestes locais ele é estocado na forma de ferritina ou hemossiderina. A ferritina garante uma reserva solúvel, difusa e prontamente disponível, enquanto a hemossiderina possui maior teor de ferro, porém na forma de agregados insolúveis de baixa disponibilidade (SMITH, 1997).

Os estudos sobre o metabolismo do ferro progrediram muito nos últimos anos com a descoberta do peptídeo hepcidina, um hormônio regulador deste metabolismo, produzido pelos hepatócitos (PEELING et al., 2008), cujo gene que codifica sua expressão foi recentemente sequenciado em equinos (BORGES et al., 2008). A hepcididna bloqueia os canais de passagem de ferro na membrana celular

dos enterócitos, hepatócitos e macrófagos reticuloendoteliais, inibindo a absorção de ferro nos enterócitos e aumentando a sua retenção nos macrófagos e hepatócitos (PEELING et al., 2008).

A hipóxia e a anemia são estímulos negativos para a síntese de hepcidina, induzindo maior absorção de ferro pelos enterócitos e liberação do mesmo dos macrófagos, o que propicia maior aporte de ferro para a medula óssea e maior taxa de eritropoiese (ATANASIU et al., 2006). A síntese e liberação da hepcidina aumentam na sobrecarga de ferro e nos processos inflamatórios. O sequestro de ferro, induzido pela resposta inflamatória, constitui um mecanismo de defesa do organismo à infecção, pois a maioria dos microorganismos necessita do ferro para seu desenvolvimento (FALLON, 2004). A interleucina IL-6 estimula a produção de hepcidina que promove rápida queda nos teores de ferro sanguíneos, estabelecendo um obstáculo à síntese de hemoglobina que pode resultar em anemia (PEELING et al., 2008).

Os precursores eritróides são as células que possuem maior exigência de ferro, para a síntese da hemoglobina. Em condições normais, o organismo consegue suprir a maior parte dessa demanda por meio da reciclagem do ferro, proveniente da fagocitose de eritrócitos velhos pelos macrófagos (SMITH, 1997; DUNN et al., 2007). Os equinos não possuem mecanismos ativos de excreção de ferro (LEWIS, 2000). Ocorrem mínimas perdas diárias pelas fezes, proveniente da descamação de células da mucosa intestinal e do ferro biliar não absorvido, o restante é perdido pela descamação cutânea e excreção urinária em concentrações muito baixas (ALENCAR et al., 2002). Esta perda diária é compensada pela absorção intestinal, mantendo em equilíbrio o teor de ferro do organismo (DUNN et al., 2007).

Nos equinos a deficiência de ferro é rara, ocorrendo quase que exclusivamente em potros, pela baixa quantidade de ferro no leite (HARVEY et al., 1987). Nos adultos o alto teor de ferro nas forragens e grãos aliado à maior capacidade de estocar o ferro são suficientes para manter as necessidades e evitar a deficiência (SMITH et al., 1986; SNOW e HARRIS, 1989). A administração de suplementos de ferro com o objetivo de melhorar o desempenho atlético é uma prática frequente, tanto por via oral como injetável. Contudo, a suplementação só melhora o desempenho se houver uma deficiência do mineral. Não existindo deficiência, a administração extra de ferro não trará nenhum incremento ao desempenho do animal, podendo ainda ser prejudicial. A sobrecarga por ferro é

mais comum nos equinos que a sua deficiência (LEWIS, 2000).

A pseudodeficiência de ferro representa a alteração mais frequente deste metabolismo nos equinos, sendo caracterizada por redução das concentrações séricas de ferro com estoque adequado, o ferro encontra-se sequestrado principalmente em resposta aos processos inflamatórios (SMITH et al., 1986; BORGES et al., 2007). Os efeitos do exercício no metabolismo do ferro ocorrem como reações de fase aguda semelhantes às observadas na resposta inflamatória (SCHUMACHER et al., 2002). A hepcidina é responsável pelo sequestro do ferro, sendo que o tipo, a intensidade e a duração do exercício influenciam a magnitude do aumento de hepcidina, que atinge um pico seis horas após o estímulo. Uma avaliação adequada do metabolismo do ferro deve contemplar o período de seis a 24 horas pós-exercício (PEELING et al., 2008).

As alterações do metabolismo do ferro podem ser avaliadas por várias provas laboratoriais, o hemograma, a determinação sérica do ferro, a capacidade total da ligação do ferro (CTLF), o índice de saturação da transferrina (IST), a concentração de ferritina e a avaliação do conteúdo de ferro medular são as mais utilizadas (ALENCAR et al., 2002).

A mensuração de variáveis eritrocitárias, como o hematócrito e a concentração de hemoglobina são comumente utilizadas para avaliar o *status* de ferro, apesar de não constituírem indicadores confiáveis para este fim. Anemia não é sinônimo de deficiência de ferro e a diminuição da síntese de hemoglobina ocorre apenas nas deficiências severas (SMITH et al., 1986). Os parâmetros eritrocitários estão geralmente normais durante os estágios iniciais da deficiência de ferro, enquanto a deficiência crônica é caracterizada por anemia microcítica hipocrômica (HARVEY, 2000).

O compartimento de transporte pode ser avaliado pela concentração sérica de ferro e por índices que avaliam indiretamente a transferrina. Quando a transferrina é saturada com uma concentração conhecida de ferro, a quantidade total deste mineral ligado a ela representa a CTLF. Como a transferrina sérica normalmente não se encontra saturada, a CTLF é maior do que a concentração de ferro sérica, sendo a diferença entre eles denominada capacidade latente de ligação do ferro (CLLF). O índice de saturação da transferrina (IST) é obtido pela divisão da concentração de ferro pela CTLF (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002).

A concentração de ferro sérica não reflete os estoques do organismo

(HARVEY et al., 1987). Um bom parâmetro para a avaliação do ferro estocado é a dosagem da ferritina sérica, que possui forte correlação com o conteúdo de ferro hepático e esplênico (SMITH et al., 1984; HYYPPA et al., 2002). A diminuição da ferritina é um indicativo confiável de deficiência de ferro, porém resultados normais e elevados devem ser avaliados com cautela. A ferritina é uma proteína de fase aguda, aumentando em resposta à inflamação, infecções, hepatopatias, neoplasias e exercício físico (SCHUMACHER et al., 2002). Nos equinos, deve ser instituído um período mínimo de dois dias sem realização de atividade física intensa para a avaliação de estoques de ferro por meio da ferritina (HYYPPA et al., 2002).

Uma alternativa à determinação da ferritina é a dosagem sérica do receptor solúvel de transferrina (sTfr), que aumenta na deficiência de ferro e não sofre influência de processos inflamatórios, porém também eleva-se em resposta ao aumento da eritropoiese (SCHUMACHER et al., 2002). Na medicina equina ainda não existem estudos utilizando o sTfr na avaliação dos estoques de ferro.

A determinação da haptoglobina plasmática pode ser associada à avaliação do metabolismo do ferro em equinos atletas, por ser um bom indicador de hemólise intravascular durante o exercício, lembrando que esta também é uma proteína de fase aguda e aumenta na presença de processos inflamatórios (HANZAWA et al., 2002).

O ferro tecidual pode ser avaliado por biópsia ou punção aspirativa de fígado ou medula óssea. A avaliação do ferro medular, por método histoquímico com corante azul-da-Prússia, tem bom valor diagnóstico para a deficiência e para a diferenciação entre deficiência e pseudodeficiência de ferro. Na deficiência ocorre depleção dos estoques medulares, enquanto que na pseudodeficiência o ferro medular apresenta-se de normal a aumentado (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002). A determinação química da concentração de ferro hepático é mais aplicada para o diagnóstico da sobrecarga (WORWOOD, 1997).

O exercício intenso e regular promove aumento da síntese de mioglobina e enzimas que contêm ferro, que associado à elevação da taxa de eritropoiese e às perdas pelo trato digestivo, urinário e suor, aumentam a demanda de ferro do organismo. Em humanos, a dieta geralmente não consegue suprir o aumento da exigência, principalmente em atletas jovens, acarretando em deficiência deste mineral (SZYGULA, 1990). Inoue e colaboradores (2005) avaliaram as perdas de ferro pelo suor e urina em equinos submetidos a exercícios de diferentes

intensidades, não observando aumento das perdas em nenhum tipo de exercício.

A queda de desempenho atlético nos humanos é documentada principalmente nas categorias mais graves de deficiência de ferro, nas quais a anemia justifica o pior rendimento. Ainda são necessários mais estudos para esclarecer o real efeito da deficiência de ferro sem anemia no desempenho atlético (PEELING et al., 2008).

Nos equinos, especula-se que as exigências de ferro também aumentem com o exercício físico, porém algumas particularidades da espécie evitam a deficiência (LEWIS, 2000). As reservas de ferro depositadas no fígado, baço e medula óssea são bem maiores nos equinos quando comparados aos humanos (FRANKEN et al., 1981). Além disso, o exercício aumenta a exigência energética dietética, induzindo maior consumo de alimento e conseqüentemente de ferro (LEWIS, 2000; INOUE et al., 2005).

O aumento do ferro sérico e da saturação da transferrina após o exercício reflete a sua mobilização do sistema reticuloendotelial para a medula óssea (MILLS et al., 1996). A hemoconcentração também pode elevar a concentração sérica durante o exercício em equinos (INOUE et al., 2002). Mills e colaboradores (1996) submeteram equinos ao exercício em esteira simulando tanto uma prova de corrida de alta velocidade, como o exercício de enduro. Observaram aumento discreto do ferro plasmático nas primeiras 24 horas pós-exercício, atribuindo a uma mobilização dos estoques para a medula, possivelmente para suprir uma elevação na taxa de eritropoiese.

A administração exógena de corticóides aumenta a concentração de ferro 48 a 72 h após o tratamento, sem alterações na concentração de ferritina (SMITH et al., 1986b). O exercício progressivo em esteira induz aumento do cortisol endógeno em equinos (SILVEIRA, 2008), possivelmente o cortisol endógeno promove o mesmo efeito sobre o metabolismo do ferro.

A síntese de ferritina aumenta como resposta de fase aguda, além disso, no exercício ocorrem lesões nas membranas celulares em órgãos responsáveis pelo estoque de ferro, como o fígado, causando liberação de ferritina tecidual para a circulação. Alterações hemodinâmicas, como a hemoconcentração e o aumento do volume plasmático, também influenciam as concentrações séricas de ferritina (SCHUMACHER et al., 2002).

Em atletas humanos relata-se a presença da chamada “anemia do esporte”,

podendo ser uma anemia verdadeira devido à deficiência de ferro ou hemólise, ou uma falsa anemia, “pseudoanemia”, causada pela diluição dos eritrócitos resultante do aumento do volume plasmático induzido pelo exercício (SCHUMACHER et al., 2002; MARTINEZ et al., 2006). A “anemia do esporte” já foi sugerida em equinos devido à hemólise induzida pelo exercício (BOUCHER et al., 1981; MASINI et al., 2003) ou ao aumento do volume plasmático como resposta fisiológica ao exercício (MCKEEVER et al., 1987; MACHADO et al., 2007b). Porém, nenhum estudo comprovou que o exercício promova deficiência de ferro em equinos.

Vários eventos que ocorrem no exercício induzem lesões nos eritrócitos como: o aumento da temperatura corporal e da velocidade de circulação do sangue (WILMORE e COSTILL, 2001); maior fragilidade dos eritrócitos liberados pelo baço (HANZAWA et al., 2002); diminuição do potencial hidrogeniônico (pH) com consequente tumefação dos eritrócitos (HANZAWA e WATANABE, 2000; MACHADO et al., 2007a) e oxidação de fosfolipídios de membrana (MATSUKI et al., 1991).

O exercício anaeróbico, de curta duração e alta intensidade, provoca um aumento transitório da susceptibilidade dos eritrócitos ao estresse osmótico em equinos pela redução do pH, independente do treinamento ou suplementação com vitamina E. Contudo, devido ao caráter transitório apenas uma pequena porção dos eritrócitos sofre lise, não excedendo a taxa de produção pela medula óssea. Caracterizando uma resposta benéfica e adaptativa, visto que, as células jovens são mais eficientes no transporte de oxigênio (MACHADO et al., 2007a).

No metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente na mitocôndria, com consequente formação de água e produção de energia, nesse processo são formados intermediários reativos, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais livres superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), coletivamente designados como ERO (CARRELL et al., 1975; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Além disso, é relatada a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pela auto-oxidação da hemoglobina (THOMAS, 2000).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam vida livre e número ímpar de elétrons na camada de valência que lhe conferem alta reatividade e instabilidade (HALLIWELL, 1994). Possuem meia-vida curta, podendo reagir com qualquer biomolécula, sendo necessário apenas que estas existam na proximidade do local de sua formação (THOMAS, 2000). Ao redor de 5% do total de  $O_2$  é

convertido em ERO (JI, 1995; AVELLINI et al., 1999), durante o exercício ocorre um aumento de 10 a 20 vezes no consumo de  $O_2$ , produzindo proporcionalmente mais ERO (SJÖDIN et al., 1990; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001).

O desequilíbrio entre os eventos oxidantes e antioxidantes caracteriza a condição de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Metais de transição, principalmente o ferro e o cobre, colaboram para o estresse oxidativo por catalisar a formação de radicais livres (CLEMENS e WALLER, 1987; HALLIWELL, 1994; HARVEY, 1997). As lesões oxidativas eritrocitárias ocorrem como resultado da oxidação e desnaturação da hemoglobina e das alterações causadas pelas ERO aos lipídios e proteínas de membrana (HATHERILL et al., 1991).

A lipoperoxidação tem início quando qualquer espécie reativa abstrai um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado na membrana celular, formando um radical lipídico ( $L^\bullet$ ). O  $L^\bullet$  reage rapidamente com o  $O_2$  resultando em radical peroxila ( $LOO^\bullet$ ). Os radicais  $L^\bullet$  e  $LOO^\bullet$  têm poder de sequestrar mais moléculas de hidrogênio e amplificar o processo como uma reação em cadeia. Os radicais  $OH^\bullet$  e  $LOO^\bullet$  são os principais envolvidos na indução da lipoperoxidação (HALLIWELL, 1994). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da reação sendo utilizado como índice de intensidade da mesma. Observam-se aumento na concentração de MDA em equinos submetidos ao exercício (CHIARADIA et al., 1998; AVELLINI et al., 1999). Segundo Leaf et al. (1997) o exercício induz lipoperoxidação transitória em humanos saudáveis e os produtos da lipoperoxidação são removidos no período recuperação do exercício.

Vários estudos em equinos evidenciam o aumento da produção de ERO pelo exercício (AVELLINI et al., 1999; ONO, et al., 1990; BALOHG et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004). Weight et al., (1991), observaram menor vida média eritrocitária em indivíduos atletas comparados a um grupo de pessoas sedentárias. Segundo Christian (2000), quanto maior a taxa metabólica do animal, maior o estresse oxidativo acumulado e menor a vida média dos eritrócitos. Hanzawa e Watanabe (2000) concluíram que em equinos a maior destruição de eritrócitos pelo exercício não excede a taxa de produção e não compromete o desempenho atlético, ao contrário, pode ser vantajoso visto que as células jovens são mais eficientes no transporte de oxigênio.

A lesão oxidativa eritrocitária manifesta-se pela formação de corpúsculos de Heinz, metahemoglobina e hemólise (HARVEY e KANEKO, 1977; HARVEY, 1997). A lesão oxidativa da membrana altera o equilíbrio osmótico intracelular e facilita a desidratação celular (SNYDER et al., 1985). A atividade das enzimas glicolíticas eritrocitárias também é alterada pela interação com oxidantes (TAVAZZI et al., 2000; OZTURK et al., 2003).

A hemoglobina pode ser oxidada na porção heme, com oxidação do ferro e formação de metahemoglobina, incapaz de transportar oxigênio (CARRELL et al., 1975; PRCHALL e GREGG, 2000). A oxidação da fração protéica desestrutura a molécula e pode culminar com a formação de corpúsculos de Heinz, que representam o estado final da degradação oxidativa da hemoglobina e diminuem a deformabilidade das células. A característica de deformabilidade permite que os eritrócitos normais circulem por capilares de diâmetro inferiores ao seu, tendo relação direta com a vida média eritrocitária (HARVEY, 1997; CHRISTIAN, 2000).

Os lipídios e as proteínas que constituem a membrana eritrocitária podem sofrer degradação oxidativa por lipoperoxidação, oxidação de grupos sulfidril das proteínas de membrana, formação de ligações ou aglomerados entre proteínas oxidadas, além de inibição de enzimas e sistemas de transporte de membrana (HARVEY, 1997). A membrana das células é uma bicamada lipídica na forma de um mosaico fluido com receptores e proteínas de transporte. A propriedade de fluidez da membrana está relacionada com ácidos graxos poliinsaturados e a viabilidade da célula com esta flexibilidade. A lipoperoxidação causa aumento da permeabilidade e perda da fluidez da membrana (SJÖDIN et al., 1990), diminuindo conseqüentemente a deformabilidade e aumentando a destruição dos eritrócitos (SNYDER et al., 1985; CHRISTIAN, 2000).

O organismo possui um mecanismo de proteção, os antioxidantes, que são elementos ou um conjunto de processos que diminuem ou cessam a oxidação pelas ERO (THOMAS, 2000). Outras funções dos antioxidantes incluem o sequestro de metais de transição, redução enzimática de peróxidos (HALLIWELL, 1994; THOMAS, 2000) e mecanismos de reparo de lesões (HEBBEL, 1986; GUTTERIDGE, 1995).

Um potente antioxidante natural é a vitamina E, o d- $\alpha$ -tocoferol representa a forma natural da vitamina e o dl- $\alpha$ -tocoferol sua forma sintética (ROCK et al., 1996; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003). Ela é transportada por



lipoproteínas de baixa densidade produzidas pelo fígado, sendo a principal responsável por manter as concentrações normais de vitamina E no plasma (TRABER e PARKER, 1995; ROCK et al., 1996).

Sua principal função é interromper a propagação da reação de lipoperoxidação, por ser mais susceptível à oxidação que os lipídios de membrana e pela transformação dos peróxidos em formas menos reativas (BURTON e TRABER, 1990; HALLIWELL, 1994). A vitamina E oxidada é reduzida à sua forma ativa por outros antioxidantes, como a glutathiona reduzida (SEN, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001) e a vitamina C (CLEMENS e WALLER, 1987; HALLIWELL, 1994).

Estudos, em humanos verificaram redução de lipoperoxidação com a suplementação de vitamina E por duas semanas (KASIE et al., 2000). Várias pesquisas foram desenvolvidas em equinos atletas objetivando diminuir o estresse oxidativo causado pelo exercício, envolvendo a suplementação de vitamina E exclusivamente (JI et al., 1990; CHIARADIA et al., 1998) ou associada a outros antioxidantes (ONO et al., 1990; MOFFARTS et al., 2005). Os níveis de vitamina E muscular e hepático estão reduzidos durante o exercício, enquanto os níveis no plasma e eritrócitos estão elevados, provavelmente por mobilização (AVELLINI et al., 1995).

Atualmente, há uma preocupação geral quanto à importância dos antioxidantes na prevenção do desenvolvimento de doenças. O conhecimento da interação entre mecanismos antioxidantes e o exercício é importante na avaliação da eficácia da suplementação da dieta com antioxidantes (JI, 1999). A suplementação com antioxidantes pode ser necessária em situações de estresse oxidativo, seja por ineficiência dos sistemas antioxidantes ou por aumento dos eventos pró-oxidantes (KIRSCHVINK et al., 2008).

Segundo Smith et al. (1995) um único episódio de exercício intenso pode aumentar a susceptibilidade dos eritrócitos ao estresse oxidativo e o treinamento de resistência regular confere efeito protetor. Contrariamente, Moffarts e colaboradores (2005), observaram redução de alguns antioxidantes em equinos submetidos ao treinamento de três meses. Segundo Sacke et al. (2001), o incremento das defesas antioxidantes no treinamento pode não ser proporcional às necessidades criadas pelos eventos pró-oxidantes e afetar o requerimento de antioxidantes na

dieta, que depende da duração e da intensidade do exercício, do programa de treinamento, idade, dieta e estado de saúde do animal.

## CAPÍTULO II

**Metabolismo do ferro em equinos - efeito do exercício e do treinamento em esteira e da suplementação com vitamina E**

A ser encaminhado para o periódico *Journal of Equine Veterinary Science*

ISSN: 0737-0806

Normas para publicação disponível em:

[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/636592/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/636592/authorinstructions)

## **Metabolismo do ferro em equinos - efeito do exercício e do treinamento em esteira e da suplementação com vitamina E.**

### **RESUMO**

O ferro é essencial para o transporte de oxigênio para as células e o seu metabolismo depende de vários fatores, que quando alterados podem promover deficiência, sequestro ou sobrecarga. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício progressivo em esteira de alta velocidade, do treinamento e da suplementação com vitamina E no metabolismo do ferro em equinos Puro Sangue Árabe. Foram utilizados 16 equinos, adultos, machos e fêmeas, distribuídos em dois grupos: controle (GC, n=8) e suplementado com vitamina E (1000 U/animal/dia) (GE, n=8). Os equinos não treinados foram submetidos a uma prova de exercício progressivo (P1). Em seguida, foram treinados por 20 dias e submetidos a uma segunda prova de exercício (P2). O protocolo de exercício para as duas provas iniciou-se a 1,8m/s por 5 min, 4m/s por 3min, 6m/s por 2min seguido de fases de 1min em velocidades crescentes até que os animais conseguissem manter-se em exercício, com a esteira inclinada a +7%. Em ambas as provas foram colhidas amostras de sangue venoso no M0, imediatamente após e aos 30min, 2h, 6h, 24h, 72h e 120h do término do exercício. Não foi verificada influência da suplementação com vitamina E ou do treinamento no metabolismo do ferro. O protocolo de exercício promoveu aumento do ferro sérico por hemoconcentração imediatamente após o exercício e hipoferrêmia por sequestro após 6h, que retornou aos valores basais em 24h. Observou-se que o exercício induziu “pseudoanemia” provavelmente por aumento do volume plasmático, 6 a 120h após o exercício nos animais não treinados. Não houve alteração na concentração de ferritina em nenhum momento. Conclui-se que este protocolo de exercício promove alteração da dinâmica de distribuição do ferro, mas não altera o conteúdo total de ferro do organismo. Deste modo, desaconselhamos o uso de suplementação extra de ferro em equinos atletas da raça Puro Sangue Árabe.

Palavras-chave: **cavalo atleta, metabolismo do ferro, ferritina, tocoferol.**

## 1. INTRODUÇÃO

A molécula de hemoglobina contém a maior concentração de ferro do organismo, com função vital de transportar o oxigênio para as células. Mioglobina, citocromos, peroxidases, ribonucleotídeo redutase e desidrogenase succínica também possuem ferro na sua constituição (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002; ALMEIDA et al., 2007), indicando que esse elemento é essencial para a síntese do DNA, transporte de elétrons e várias outras reações (DUNN et al., 2007).

O metabolismo do ferro depende da sua disponibilidade na dieta, digestão e absorção intestinal, transporte plasmático, captação pelas células alvo e dos mecanismos de estoque, reciclagem e excreção (ALENCAR et al., 2002). Ocorre pequena perda diária que é compensada pela absorção intestinal, mantendo em equilíbrio o teor de ferro do organismo (DUNN et al., 2007). O ferro é estocado em todos os tecidos em duas formas principais, ferritina e hemossiderina. A ferritina garante uma reserva solúvel e difusa de ferro, prontamente disponível (SMITH, 1997). A concentração de ferro sérica não reflete adequadamente o teor de ferro do organismo (HARVEY et al., 1987), entretanto, a ferritina sérica possui forte correlação com o conteúdo de ferro hepático e esplênico, sendo um bom parâmetro para avaliar seus estoques (SMITH et al., 1984; HYYPPA et al., 2002).

Os estudos sobre o metabolismo do ferro progrediram nos últimos anos com a descoberta do hormônio regulador hepcidina (PEELING et al., 2008) e o gene que codifica a sua expressão foi recentemente sequenciado em equinos (BORGES et al., 2008). A hepcidina inibe a absorção de ferro nos enterócitos e provoca a sua retenção nos macrófagos e hepatócitos. Sua síntese aumenta na sobrecarga de ferro e nos processos inflamatórios e causa rápida queda do ferro sanguíneo, estabelecendo um obstáculo à síntese de hemoglobina (PEELING et al., 2008). Em condições normais, o organismo consegue suprir a demanda de ferro para a síntese de hemoglobina por meio da reciclagem do ferro, proveniente da fagocitose de eritrócitos velhos pelos macrófagos (DUNN et al., 2007).

Desequilíbrios do metabolismo do ferro estão relacionados à deficiência ou sobrecarga de ferro, sendo nos equinos mais frequente a sobrecarga (LEWIS, 2000). Processos inflamatórios induzem sequestro ou "pseudodeficiência" de ferro, condição na qual se observa redução das concentrações séricas de ferro, apesar do estoque estar adequado (SMITH et al., 1986a; BORGES et al., 2007). O sequestro do ferro atua como mecanismo de defesa do organismo à infecção, pois a maioria

dos microorganismos necessita do ferro para seu desenvolvimento. Ocorre rápida e intensa hipoferremia, nas primeiras 24 h, associada ao aumento na síntese de proteínas de fase aguda como a ferritina, haptoglobina e ceruloplasmina (SMITH, 1997). Ao contrário, a concentração e a saturação da transferrina diminuem (FALLON, 2004).

Os efeitos do exercício no metabolismo do ferro ocorrem como reações semelhantes às observadas na resposta inflamatória (SCHUMACHER et al., 2002). Sendo que o tipo, a intensidade e a duração do exercício influenciam a magnitude do aumento de hepcidina (PEELING et al., 2008).

A deficiência de ferro é rara nos equinos, ocorrendo quase que exclusivamente em potros, devido à baixa quantidade de ferro no leite (HARVEY et al., 1987). Nos animais adultos o alto teor de ferro nas forragens e grãos aliado à maior capacidade de estocar o ferro são suficientes para manter as necessidades minerais e evitar a deficiência (SMITH et al., 1986a; SNOW e HARRIS, 1989).

Em esportistas humanos, a deficiência de ferro é uma condição frequente e está relacionada à “anemia do esporte” e à diminuição do desempenho atlético (SCHUMACHER et al., 2002). Influenciados por esses conceitos, criadores e veterinários de cavalos de esporte utilizam amplamente a suplementação de ferro (SMITH et al., 1986a; SNOW e HARRIS, 1989; HYYPPA et al., 2002). Porém, a suplementação em equinos não deficientes é desaconselhável, pois induz o acúmulo excessivo de ferro no organismo (SMITH et al., 1986a; EDENS et al., 1993). A “anemia do esporte” já foi sugerida em equinos devido à hemólise (BOUCHER et al., 1981; MASINI et al., 2003) ou ao aumento fisiológico do volume plasmático (MCKEEVER et al., 1987; MACHADO et al., 2007b), entretanto, nenhum estudo comprovou que o exercício promove deficiência de ferro em equinos.

As exigências de ferro nos equinos também aumentam com o exercício, porém algumas particularidades da espécie evitam o desenvolvimento de deficiência (LEWIS, 2000). As reservas de ferro no fígado, baço e medula óssea são maiores quando comparados aos humanos (FRANKEN et al., 1981). O exercício aumenta a exigência energética dietética, induzindo maior consumo de alimento e conseqüentemente de ferro (LEWIS, 2000).

O ferro livre possui atividade oxidorrredutora, podendo promover a formação de radicais livres pelas reações de Fenton e de Harber-Weiss, com grande potencial lesivo para os tecidos. A transferrina é responsável pelo transporte do ferro no

plasma e líquidos extracelulares (ALENCAR et al., 2002) e mantém o ferro em uma forma solúvel e não tóxica, evitando a formação de radicais livres (PEELING et al., 2008). A suplementação com dietas antioxidantes visa diminuir a produção de radicais livres e as lesões celulares (CLAYCOMBE e MEYDANI, 2001). Segundo Yur et al. (2008) a suplementação com vitamina E e selênio pode influenciar o efeito do exercício na concentração de ferro sérico.

Em humanos existem muitos estudos sobre a relação entre o exercício e o metabolismo do ferro (TAYLOR et al., 1987; BEARD e TOBIN, 2000; SCHUMACHER et al., 2002; MARTINEZ et al., 2006). Raros trabalhos na literatura avaliaram esta relação nos equinos, a maioria estudando somente alguns parâmetros do metabolismo do ferro (MILLS et al., 1996; INOUE et al., 2002; HYYPPA et al., 2002; YUR et al., 2008). Os estudos mais completos em equinos foram conduzidos por Fernandes et al. (1999) e Abramovitch et al. (2008), avaliando o efeito do exercício antes e após 30 min e por Inoue et al. (2005) que estudaram o metabolismo do ferro em três diferentes tipos de treinamento em esteira.

Existem poucos estudos sobre o metabolismo do ferro em equinos atletas, portanto o objetivo deste trabalho foi elucidar os efeitos do exercício neste metabolismo, comparando animais treinados e sedentários e avaliando também o efeito da suplementação com vitamina E.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe (PSA), 13 fêmeas e três machos castrados, com idade variando de 3,5 a 10 anos e peso médio de 362,3 ±25,6 kg. Todos estavam sem treinamento há pelo menos seis meses e clinicamente sadios. Os animais foram acomodados na proporção de dois a três animais por piquete de 50 m<sup>2</sup>, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, localizada a 48°52' de longitude oeste, 22°52' de latitude sul, a 756 metros acima do nível do mar. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Câmara de Ética e Experimentação Animal da FMVZ- Unesp -Botucatu, protocolo nº 21/2006-CEEA.

O manejo nutricional consistiu de feno de capim *coast-cross* (*Cynodon dactylon*) à vontade, 2 kg/animal/dia de ração comercial para equinos (Proequi 13,



Guabi - Mogiana Alimentos S/A, Campinas, Brasil) e 30 g/animal/dia de suplemento mineral (Sal Mineral Guabiphos Centauro 80, Mogiana Alimentos S/A) e água *ad libitum*.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos de oito animais: grupo controle (GC) e grupo suplementado com vitamina E (GE). A suplementação foi iniciada 15 dias antes da primeira prova de exercício com a dose de 1.000 U/animal/dia de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferol (E-Tabs, Sigma Pharma–EMS, Hortolândia, Brasil) e foi mantida até o término do experimento. As cápsulas de vitamina E foram oferecidas individualmente em mistura de melão de cana e rapadura picada antes do fornecimento do alimento.

## 2.2 Protocolo de exercício

Foram realizadas duas provas de exercício progressivo, a primeira antes do treinamento (P1) e uma segunda prova após o treinamento (P2), em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) no Centro de Medicina Esportiva Equina do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ- Unesp - Botucatu. Em ambas as provas utilizou-se o protocolo de exercício de Watanabe et al. (2006) modificado com +7 % de inclinação, nas velocidades de 1,8 m/s (passo) por 5 min, seguindo a 4,0 m/s (trote) por 3 min, 6,0 m/s (cânter) por 2 min e posteriormente 8,0 m/s, 9,0 m/s, 10,0 m/s, 11,0 m/s e 12 m/s (galope) por 1 min em cada velocidade, ou até quando o animal não mais conseguisse manter-se em galope mesmo sendo estimulado. Todas as provas de exercício foram realizadas entre 6h e 8h, com temperatura ambiente média de  $20,3 \pm 1,8$  e umidade relativa do ar média de  $73,4 \pm 4,8$  (Termohigrômetro digital - Minipa MT 241 – China).

Após P1 e término das colheitas, os animais foram submetidos ao treinamento em esteira, seis vezes por semana até totalizarem 20 dias de treinamento. O protocolo de treinamento foi adaptado de Watanabe et al. (2006) e consistiu de 1,8 m/s (passo) por 5 min; 4,0 m/s (trote) por 3 min; 6,2 m/s (cânter) por 2 min; 8,0 m/s (galope) por 1 min e 10 m/s (galope) por 1 min; seguidos de desaquecimento a 3 m/s (trote) por 2 min e 1,6 m/s (passo) por 2 min, sempre com a esteira em posição horizontal. Após o término do período de treinamento, os animais não foram submetidos à atividade física por 48 h antes a P2.

## 2.3 Colheita de amostras e análises laboratoriais

Nas duas provas foram colhidas amostras de sangue venoso antes do exercício (M0), imediatamente após (PE) e 30 min, 2 h, 6 h, 24 h, 72 h e 120 h após o exercício. Para a obtenção do volume globular (VG) utilizou-se tubos a vácuo contendo EDTA (Vacuum II, Labnew, São Paulo, Brasil). Para a obtenção de soro, utilizaram-se tubos a vácuo contendo ativador de coagulação e gel separador (BD Vacutainer-SST™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA). O soro obtido foi armazenado a -80 °C até a análise. Os animais foram mantidos nos piquetes durante todo o período de obtenção das amostras e não foram submetidos a nenhum exercício controlado.

A dosagem do ferro sérico foi realizada por “kit” comercial (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, Amersham, UK), por metodologia de química seca e analisador automático (Vitros 750 - Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson).

As capacidades total (CTLF) e latente (CLLF) de ligação do ferro sérico foram determinadas por colorimetria utilizando-se “kits” comerciais (Capacidade Ligadora de Ferro, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) e as absorbâncias foram determinadas a 560nm (Espectrofotômetro-FEMTO 600 Plus, Femto, São Paulo, Brasil). O índice de saturação da transferrina (IST), que indica a saturação da transferrina por ferro, foi obtido a partir da divisão da concentração de ferro sérico pelo resultado da CTLF.

A ferritina sérica foi mensurada em sistema fotométrico por imunoturbidometria, utilizando-se “kits” comerciais (Ferritina K081, Bioclin) e leitura das absorbâncias a 550 nm em analisador automático (Cobas Miras, Roche, Rotkreuz, Suíça) sendo o resultado expresso em µg/L.

O volume globular (VG) foi obtido pela técnica de microhematócrito (JAIN, 1986).

As dosagens séricas de cortisol foram determinadas por meio da técnica de Radioimunoensaio (IRMA), em fase sólida, utilizando-se kit comercial (Cortisol Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA) previamente validado para uso em equinos por Freestone et al. (1991). As contagens de radioatividade foram obtidas por meio do contador gama automático (Cobra II, KineticCount 48. Vitek Systems, Missouri, EUA). Os coeficientes de variação intra e inter ensaio foram calculados segundo Rodbard (1974).

## 2.4 Análise estatística

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade do conjunto de dados. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) no delineamento em parcelas sub-subdivididas para a avaliação do efeito da suplementação, treinamento e exercício.

Nos casos em que se detectaram diferenças entre os diferentes momentos avaliados, executou-se o teste de Tukey para as variáveis ferro, CTLF, CLLF, IST e ferritina por meio do programa SAS (SAS versão 9.1, suport.sas.) e o teste de comparações múltiplas de Dunnett para as variáveis cortisol e VG, em que utilizou o programa estatístico R (R Development Core Team, versão 2.3.1, 2006), ambos com objetivo de testar se os valores das variáveis após o exercício diferem do M0, com nível de significância de 5 % (PIMENTEL-GOMES, 1987). Foram realizadas correlações entre diferentes variáveis utilizando-se teste  $r$  para correlação de Pearson.

## 3. RESULTADOS

Verificou-se efeito do exercício ( $p < 0,001$ ) sobre a concentração sérica de ferro, CTLF, CLLF, IST e cortisol sérico, o mesmo não ocorreu com a ferritina. Não houve efeito do treinamento ou da suplementação com vitamina E em nenhum dos parâmetros acima, de modo que o efeito do exercício foi avaliado para todo o conjunto de dados (Figura 1).

A média da concentração sérica de ferro no M0 foi de  $153 \pm 34,5$   $\mu\text{g/dL}$ , variando de 87 a 221  $\mu\text{g/dL}$ . Comparando com os resultados do M0, o ferro sérico aumentou no PE ( $p < 0,05$ ) com média, desvio padrão e variação de  $186,6 \pm 33,7$  (109 a 249  $\mu\text{g/dL}$ ), e reduziu-se em 6 h pós-exercício ( $p < 0,05$ ), média de  $123,7 \pm 25,1$   $\mu\text{g/dL}$  e variação de 59 a 187  $\mu\text{g/dL}$ . Houve forte correlação positiva entre ferro sérico e IST ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,001$ ) e mais fraca com a CTLF ( $r = 0,36$ ,  $p < 0,001$ ), VG ( $r = 0,35$ ,  $p < 0,001$ ) e o cortisol ( $r = 0,24$ ,  $p < 0,001$ ), assim como correlação moderada negativa com a CLLF ( $r = -0,44$ ,  $p < 0,001$ ).

A CTLF aumentou no PE ( $p < 0,05$ ) com média de  $465 \pm 42,9$   $\mu\text{g/dL}$  (360 a 584,7  $\mu\text{g/dL}$ ), comparando-se ao M0, que teve média de  $392,3 \pm 42,7$   $\mu\text{g/dL}$  e variou de 319,9 a 498,9  $\mu\text{g/dL}$ . A CTLF apresentou correlação positiva moderada com a CLLF ( $r = 0,68$ ,  $p < 0,001$ ) e com o VG ( $r = 0,51$ ,  $p < 0,001$ ) e correlação positiva fraca

com o cortisol sérico ( $r=0,30$ ,  $p<0,001$ ).

A CLLF elevou-se em relação ao M0 nos momentos PE, 2 h e 6 h após o exercício ( $p<0,05$ ). A média e variação no M0 foram de  $239,3\pm 47,8$   $\mu\text{g/dL}$  (139,9 a 318,7  $\mu\text{g/dL}$ ) e a maior média foi observada imediatamente após o exercício  $278,4\pm 49,6$   $\mu\text{g/dL}$  (151 a 369,7  $\mu\text{g/dL}$ ). Observou-se correlação positiva fraca entre a CLLF e o VG ( $r=0,21$ ,  $p<0,001$ ).

A saturação da transferrina no repouso variou de 22,4 a 58,8 % com média de  $39,2\pm 9$  %. Após o exercício ocorreu uma queda progressiva do IST que foi significativa em 2 h e 6 h ( $p<0,05$ ), os menores valores ocorreram em 6 h com média de  $31,5\pm 6,6$  %, a partir deste momento observa-se uma tendência de recuperação dos valores. Apesar de não haver diferença entre grupos, ocorreu efeito da interação momento:prova:grupo ( $p<0,04$ ). No GC a variação entre momentos não foi a mesma para as duas provas, apenas para a prova P1 deste grupo observou-se aumento significativo do IST em 72 h ( $p<0,05$ ), com média de  $48,3\pm 10,3$  %, comparado ao M0 da mesma prova e grupo que apresentou média de  $37,5\pm 10$  %. Houve forte correlação negativa entre IST e CLLF ( $r=-0,80$ ,  $p<0,001$ ).

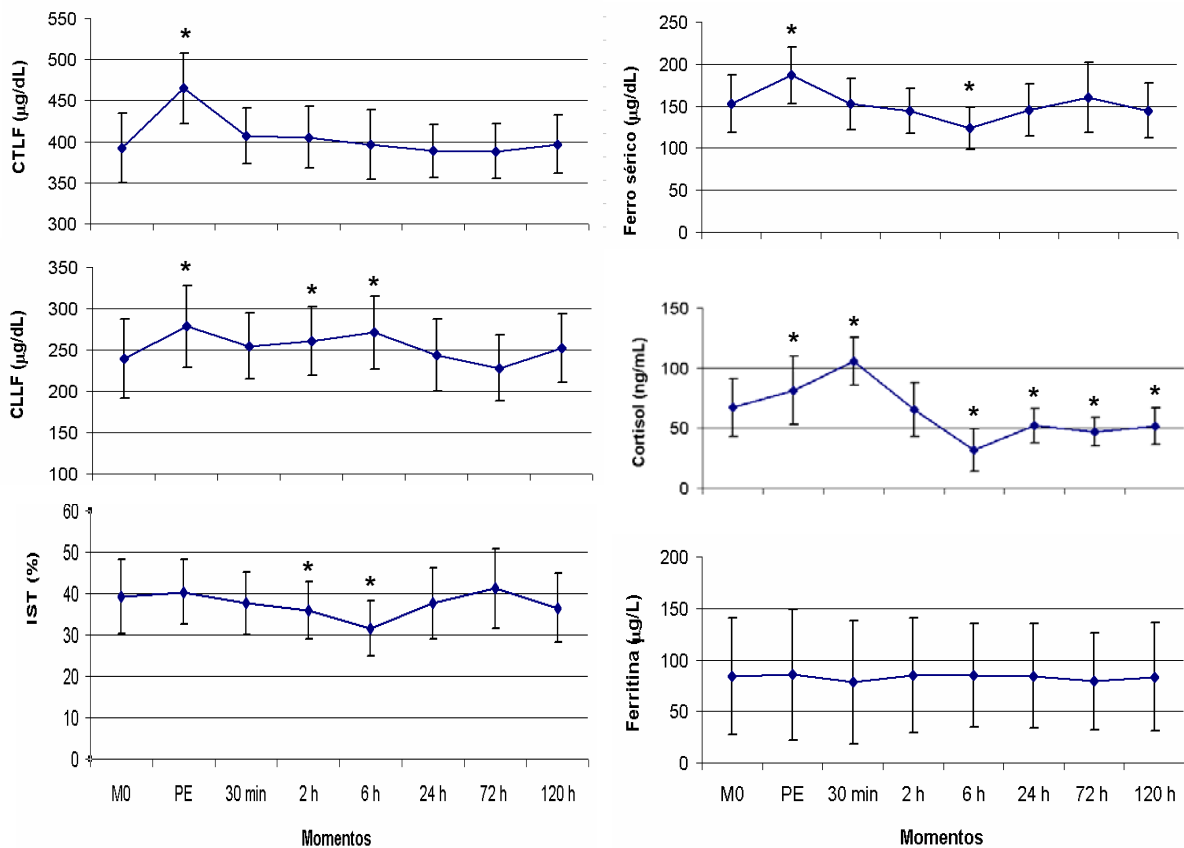
A concentração de ferritina sérica média ao M0 foi de  $84,2\pm 56,5$   $\mu\text{g/L}$ , variando de 24 a 234,6  $\mu\text{g/L}$ , dois animais apresentaram concentração  $< 30$   $\mu\text{g/L}$  apenas na P1 do GE, valor mínimo de referência para equinos (LEWIS, 2000). Não houve efeito do exercício, treinamento ou da suplementação com vitamina E. Embora de forma não significativa, os maiores valores médios foram observados no PE com média de  $85,6\pm 63,5$   $\mu\text{g/L}$ . Foram observadas correlações negativas fracas entre ferritina e CLLF ( $r=-0,21$ ,  $p<0,001$ ) e positiva entre ferritina e IST ( $r=0,20$ ,  $p<0,001$ ).

A concentração sérica de cortisol apresentou aumento no PE e 30 min ( $p<0,05$ ) em relação ao M0 ( $67,1\pm 24,2$  ng/mL), com pico em 30 min ( $105,8\pm 19,8$  ng/mL). A partir de 6 h até 120 h após o exercício observou-se redução ( $p<0,05$ ) em relação ao M0. Ocorreu correlação positiva entre o cortisol e o VG ( $r=0,43$ ,  $p<0,001$ ). Os coeficientes de variação intra e inter ensaio foram 1,9 e 6,5 %, respectivamente. A sensibilidade do ensaio foi de 5,0 ng/mL.

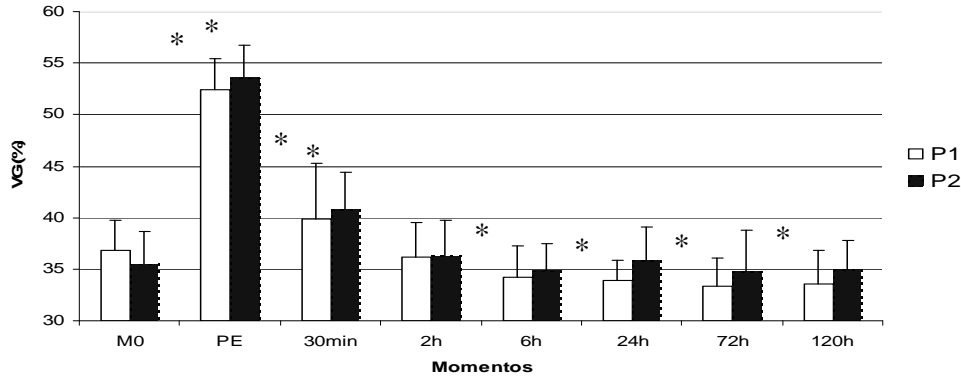
Para o VG não se observou efeito da suplementação ou do treinamento, porém houve efeito do exercício ( $p<0,05$ ) e da interação momento:prova ( $p<0,05$ ), indicando que a variação entre momentos não foi a mesma para as duas provas de

exercício (Figura 02).

O VG aumentou nos momentos PE ( $53 \pm 3,1$  %) e 30 min ( $40,3 \pm 4,5$  %), em relação ao M0 ( $36,2 \pm 3$  %), em ambos os grupos e provas. A diferença entre as provas ocorre após 6 h da conclusão do exercício. A partir desse período apenas na prova P1 verificou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) do VG nos momentos 6 h ( $34,3 \pm 3$  %), 24 h ( $33,9 \pm 1,9$  %) 72 h ( $33,3 \pm 2,7$  %) e 120 h ( $33,6 \pm 3,2$  %), em relação ao M0 ( $36,9 \pm 2,8$  %). Analisando-se os animais individualmente, em 44 % destes (7/16) a redução do VG na P1 atingiu valores inferiores a 32 %.



**Figura 1.** Média e desvio-padrão da capacidade total de ligação do ferro (CTLF), capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), índice de saturação da transferrina (IST), concentração sérica de ferro, de cortisol e da ferritina, em 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, dos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), mensurados antes (M0), imediatamente após (PE), 30min, 2h, 6h, 24h, 72h e 120h pós-exercício. GC=GE; P1=P2 ( $p > 0,05$ ). \*Difere do M0 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Média e desvio-padrão do volume globular (VG) (%) em 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, dos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), mensurados antes (M0), imediatamente após (PE), 30min, 2h, 6h, 24h, 72h e 120h pós-exercício. GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ); interação momento:prova ( $p<0,05$ ). \*Difere do M0 na mesma prova ( $p<0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Antes do exercício, os resultados da concentração de ferro sérico, CTLF, CLLF e o do IST foram semelhantes aos citados por outros autores para equinos adultos (HARVEY et al., 1987; LEWIS, 2000; INOUE et al., 2005). Em 45 equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) a média da concentração de ferro sérico foi de  $158,4 \pm 29 \mu\text{g/dL}$  com variação de 101,6 a  $237,3 \mu\text{g/dL}$  (HEERDEN et al., 1990), semelhante ao observado no presente estudo.

Resultados divergentes também podem ser encontrados tanto em equinos de outras raças (SMITH et al., 1986b; ABRAMOVITC et al., 2008) como em equinos PSA e meio-sangue Árabe, nos quais observaram-se valores de ferro sérico ( $194,7 \pm 43,7 \mu\text{g/dL}$ ) e CTLF ( $848,1 \pm 188,9 \mu\text{g/dL}$ ) mais elevados e menor IST ( $23,7 \pm 6,3 \%$ ). Porém, os próprios autores supõem que os resultados da CTLF e IST possam ter sido influenciados pelo longo período de armazenamento da amostra (FERNANDES et al., 1999). Esses parâmetros avaliam o compartimento de transporte do ferro (SMITH, 1997) e analisando os dados do presente estudo e da literatura verificou-se uma ampla faixa de variação entre equinos normais (SMITH et al., 1986a; FERNANDES et al., 1999; ABRAMOVITC et al., 2008). Devido a essa variação, Lewis (2000) realizou uma análise dos resultados de vários trabalhos e sugere como valores de referência, para equinos de 120 a  $210 \mu\text{g/dL}$  para a concentração sérica de ferro, 370 a  $470 \mu\text{g/dL}$  para a CTLF, 200 a  $300 \mu\text{g/dL}$  para CLLF e 30 a 50 % para o IST.

Existem poucos trabalhos envolvendo a determinação da concentração de ferritina em equinos. Lewis (2000) sugere que valores de ferritina de 30 a 250 µg/L indicam estoque de ferro adequado, resultados inferiores poderiam indicar deficiência e superiores sobrecarga. Hyypa et al. (2002) observaram resultados basais de ferritina inferiores, inclusive com valores abaixo de 20 µg/L, porém foi avaliada a concentração de ferritina plasmática. A ferritina plasmática é 24% menor em média que a ferritina sérica (ORINO et al., 1993).

Os resultados no M0 indicam estoque adequado de ferro nos animais estudados, exceto para dois equinos que apresentaram valores um pouco inferiores a 30 µg/L, apenas na P1. Durante o período de treinamento estes normalizaram naturalmente o seu estoque de ferro, no M0 da P2 a ferritina foi superior a 30 µg/L em todos os animais. O exercício aumenta a exigência energética dietética, induzindo maior consumo de alimento e conseqüentemente maior ingestão de ferro, visto que as forragens e grãos que constituem a alimentação equina possuem alto teor de ferro (LEWIS, 2000).

Não houve efeito da suplementação com vitamina E ou do treinamento em nenhum parâmetro avaliado. Yur et al. (2008) estudaram o efeito do exercício na concentração sérica de ferro em equinos suplementados com vitamina E e selênio. Observaram aumento da concentração sérica de ferro logo após o exercício nos animais suplementados, porém nos animais não suplementados também houve aumento, mas não significativo. Ainda são necessários mais estudos avaliando o efeito de diferentes protocolos de exercício e de suplementação.

Nenhum estudo anterior avaliou o efeito de um único episódio de exercício pelo período de cinco dias, sobre parâmetros que avaliam tanto o transporte quanto o estoque de ferro. Hyypa et al. (2002) foi o único a avaliar o efeito do exercício na concentração de ferritina, porém sem a associação de outros parâmetros do metabolismo do ferro. O completo entendimento do efeito do exercício no metabolismo do ferro depende de uma análise das particularidades de cada tipo de exercício.

Em equinos que realizaram uma prova de corrida de curto período e moderada intensidade, a ferritina aumentou imediatamente após o exercício e retornou aos valores basais em seis horas (HYYPPIA et al., 2002). No presente estudo os valores mais elevados de ferritina também foram observados neste

momento, embora de modo não significativo, o que pode ser justificado pela hemoconcentração. A redução da ferritina é um indicativo confiável de deficiência de ferro, porém resultados normais e elevados devem ser avaliados com cautela. No exercício ocorrem lesões nas membranas celulares em órgãos responsáveis pelo estoque de ferro, como o fígado, causando liberação de ferritina tecidual para a circulação. Alterações hemodinâmicas, como a hemoconcentração e o aumento do volume plasmático, também influenciam as concentrações séricas de ferritina (SCHUMACHER et al., 2002).

Imediatamente após o exercício observa-se aumento do ferro sérico, da CTLF e da CLLF, porém o IST permanece inalterado. Esta condição possivelmente está relacionada apenas à hemoconcentração, visto que um aumento real de ferro sérico causaria aumento do IST, que pode ser comprovado pela forte correlação entre as duas variáveis ( $r=0,88$ ,  $p<0,001$ ). Segundo Inoue et al. (2002) a hemoconcentração eleva a concentração sérica de ferro durante o exercício em equinos.

Em humanos, o exercício induziu uma resposta de fase aguda análoga à resposta induzida pela inflamação, com consequente hipoferremia, aumento de lactoferrina e de ferritina, imediatamente após a realização de uma prova de triatlon de 13 h de duração (TAYLOR et al., 1987). No presente estudo, o exercício foi de curta duração e a hipoferremia ocorreu 6 h após o exercício e retornou aos valores basais em 24 h. Concomitantemente, ocorreu redução do IST e aumento da CLLF, sem alteração da ferritina, indicando uma diminuição real do teor sérico de ferro, sem alteração do ferro do organismo, confirmando a condição de sequestro ou "pseudodeficiência" de ferro (SMITH et al., 1986a; BORGES et al., 2007).

Em uma prova de competição de trote classificada como exercício máximo, a ferritina foi avaliada apenas 24 h após o exercício e apresentou-se elevada. Os pesquisadores concluíram que existe relação direta entre o grau de elevação da ferritina e a intensidade e duração do exercício (HYPPA et al., 2002). No presente estudo provavelmente a intensidade e/ou duração do exercício não foi suficiente para provocar aumento de ferritina. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo sobre o efeito do exercício na concentração de ferritina em equinos PSA.

Em contrapartida, 72 h após o exercício ocorreu aumento do ferro sérico e do IST, embora significativo apenas para o IST da P1 no GC, que pode estar relacionado a maior mobilização de ferro do sistema mononuclear fagocitário para a medula óssea. Mills e colaboradores (1996) submeteram equinos ao exercício em



esteira simulando tanto uma prova de corrida de alta velocidade como o exercício de enduro e observaram aumento discreto do ferro plasmático nas primeiras 24 h pós-exercício, atribuindo-o a uma mobilização dos estoques para a medula, possivelmente para suprir a elevação na taxa de eritropoiese.

O aumento de ferro neste período pode ser consequência da maior produção de cortisol induzida pelo exercício, que apresentou pico 30 min após o exercício. O aumento do cortisol aos 30 min é compatível com a literatura, correspondendo ao período necessário entre a estimulação do hormônio adrenocorticotrópico e a resposta da adrenal (MCKEEVER, 2002; GORDON et al., 2007). A administração exógena de corticóides aumenta a concentração de ferro 48 a 72 h após o tratamento, sem alterações na concentração de ferritina (SMITH et al., 1986b). Possivelmente, o aumento do cortisol endógeno promove o mesmo efeito, sendo observada correlação positiva entre os dois parâmetros ( $r=0,24$ ,  $p<0,001$ ). A hiperferremia torna os animais mais susceptíveis a infecções bacterianas (SMITH et al., 1986b).

Houve aumento do VG logo após o exercício compatível com a hemoconcentração por mobilização de eritrócitos do baço (BOUCHER et al., 1981; MASINI et al., 2000), assim como, redução do volume plasmático causada por perdas de líquidos pelo suor e respiração aliadas ao movimento para o espaço extracelular (ARAUJO et al., 2004).

A partir de 6 h ocorreu redução no VG apenas para os animais não treinados. Em sete equinos esta queda foi inferior ao limite de referência para a espécie (KRAMER, 2000). O efeito do exercício sobre os eritrócitos já foi alvo de diversos estudos em equinos, porém, limitados ao efeito imediato do exercício (BOUCHER et al., 1981; HAMBITZER, 1987; SMITH et al., 1995). Essa redução é compatível com a “anemia do esporte” e pode estar relacionada a um aumento do volume plasmático, baseado em estudos humanos que relatam elevação de 10 % no volume plasmático 24 h após um único episódio de exercício intenso (GILLEN et al., 1991). O mesmo não foi observado na prova P2, após o treinamento, possivelmente por ocorrer de maneira gradativa durante o período de treinamento, como uma adaptação ao exercício. Segundo Wilmore e Costill (2001), o aumento do volume plasmático é uma resposta adaptativa fisiológica à hemoconcentração que ocorre durante o exercício, com objetivo de reduzir a viscosidade sanguínea e facilitar a circulação do sangue pelos capilares.

Em equinos, estudos com diferentes tipos de exercício foram relacionados à hemólise (BOUCHER et al., 1981; HAMBITZER, 1987; MATSUKI et al., 1991; HANZAWA e WATANABE, 2000). Não se pode excluir a hemólise, porém, neste caso a diminuição do VG ocorreria tanto nos animais sedentários como treinados, visto que o treinamento em si é relatado como causador de hemólise (BOUCHER et al., 1981).

O exercício anaeróbico, de curta duração e alta intensidade, provoca um aumento transitório da susceptibilidade dos eritrócitos ao estresse osmótico em equinos pela redução do pH, independente do treinamento ou suplementação com vitamina E. Contudo, devido ao caráter transitório apenas uma pequena porção dos eritrócitos sofre lise, não excedendo a taxa de produção pela medula óssea. Caracterizando uma resposta benéfica e adaptativa, visto que, as células jovens são mais eficientes no transporte de oxigênio (MACHADO et al., 2007a).

Mesmo ocorrendo hemólise, a exigência de ferro não aumenta, pois o ferro proveniente destas células é reutilizado na produção de novos eritrócitos (SMITH, 1997; LEWIS, 2000). Considerando-se que os animais apresentavam estoque de ferro adequado e que a anemia ocorreu de maneira aguda, descarta-se a possibilidade de uma anemia por deficiência de ferro. A produção da hemoglobina tem preferência em relação a outras proteínas constituídas por ferro, sendo que a redução da sua síntese ocorre apenas nas deficiências graves (SMITH et al., 1986a). Desta forma, sugerimos que um único episódio de exercício de curta duração e alta intensidade induz “pseudoanemia” por aumento do volume plasmático, no período de 6 a 120 h após o exercício em equinos não treinados da raça PSA. Porém, são necessários mais estudos avaliando o efeito do exercício neste período para verificar se o mesmo evento ocorre em outros protocolos de exercício.

Os achados do presente estudo reforçam a idéia de que não há necessidade de suplementação de ferro em equinos atletas que recebem dieta adequada. As alterações do ferro sérico e dos índices que avaliam a ligação do mesmo à transferrina não foram acompanhadas por alteração da concentração de ferritina, deste modo podemos concluir que este protocolo de exercício promove alteração da dinâmica de distribuição do ferro, mas não altera o conteúdo de ferro do organismo equino.

## **5. AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro por meio do Auxílio à Pesquisa (processo 03/12077-6).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Estudos e Taxa de Bancada (processo 141836/2006-07).

À Dr<sup>a</sup>. Adriana Polachini do Valle do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp-Botucatu, pela disponibilização dos analisadores bioquímicos automáticos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Oba, pelo apoio na dosagem de cortisol sérico disponibilizando o Laboratório de Endocrinologia Veterinária do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ / Unesp – Botucatu.

## **6. REFERÊNCIAS**

Abramovitch G, Parra AC, Fernandes WR. Influência do exercício físico sobre os níveis de ferro, da capacidade total de ligação do ferro e da saturação da transferrina em equinos de corrida. In: Anais do IV Congresso Internacional de Medicina Equina. Anais... São Paulo: 2008.

Alencar NX, Kohayagawa A, Campos, KCH. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. Rev Educ Contin CRMV-SP 2002;5:192-205.

Almeida RF, Lopes EL, Nunes RC, Matos MPC, Sobestiansky J, Fioravanti MCS, Oliveira APA, Rufino LM. Metabolismo do ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento micromineral e vitamínico. Cienc Rural 2007;37:1097-1103.

Araujo CF, Moraes MS, Diniz APS, Cosendey AE. Pseudoanemia dilucional e os atletas olímpicos. RBAC 2004;36:197-200.

Beard J, Tobin B. Iron status and exercise. Am J Clin Nutr 2000;72:594S-597S.

Borges AS, Divers TJ, Stokol T, Mohammed, OH. Serum iron and plasma fibrinogen concentration as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. J Vet Intern Med 2007;21:489-494.

Borges AS, Winand NJ, Divers TJ, Araújo JP, Cunha PHJ, Oliveira JP. "Equine hepcidin: mRNA sequence and expression in liver tissue". In: Annals of 10th International Congress of the World Equine Veterinary Association. Anais... Moscow: 2008.

Boucher JH, Ferguson EW, Wilhelmsen CL, Statham N, Mcmeekin RR. Erythrocyte alterations during endurance exercise in horses. *J Appl Physiol* 1981;51:131-134.

Claycombe KJ, Meydani SN. Vitamin E and genome stability. *Mutat Res* 2001;475:37-44.

Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2007;17:93-100.

Edens LM, Robertson JL, Feldman BF. Cholestatic hepatopathy, thrombocytopenia and lymphopenia associated with iron toxicity in a thoroughbred gelding. *Equine Vet J* 1993;25:81-84.

Fallon KE. Utility of hematological and iron-related screening in elite athletes. *Clin J Sport Med* 2004;14:145-152.

Fernandes WR, Souza MCC, Fava CD, Mon E, Lisbôa JAN, Roncati NV, Hagiwara MK. Influência do exercício físico sobre os níveis séricos de ferro e de capacidade total de ligação do ferro em equinos de enduro. *Vet Not* 1999;5:79-82.

Franken P, Wensing T, Schotman AJH. The concentration of iron in the liver, spleen and plasma, and the amount of iron in bone marrow of horses. *Zbl Vet Med* 1981;28:381-389.

Freestone JF, Wolfsheimer KJ, Kamerling SG, Church G, Hamra J, Bagwell C. Exercise induced hormonal and metabolic changes in Thoroughbred horses: effects of conditioning and acepromazine. *Equine Vet J* 1991;23:219-223.

Gillen CM, Lee R, Mack GW, Tomaselli CM, Nishiyasu T, Nadel ER. Plasma volume expansion in humans after a single intense exercise protocol. *J Appl Physiol* 1991;71:1914-1920.

Gordon ME, Mckeever KH, Betros CI, Manso Filho HC. Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. *Vet J* 2007;173:532-540.

Hambitzer R. Changes in equine red blood cells during endurance exercise. *Isr J Vet Med* 1987;43:91-95.

Hanzawa K, Watanabe S. Changes in osmotic fragility of erythrocytes during exercise in athletic horses. *J Equine Sci* 2000;11:51-61.

Harvey JW, Asquith RL, Sussman WA, Kivipelto J. Serum ferritin, serum iron, and erythrocyte value in foals. *Am J Vet Res* 1987;48:1348-1352.

Heerden JV, Dauth J, Dreyer MJ, Nichas E, Marshal C, Waal DT. Selected laboratory parameters of thoroughbreds. *J S Afr Vet Assoc* 1990;61:155-158.

Hyypä S, Höyhty M, Nevalainen M, Pösö AR. Effect of exercise on plasma ferritin concentrations: implication for the measurement of iron status. *Equine Vet J*

2002;34:186-190, 2002.

Inoue Y, Matsui A, Asai Y, Aoki F, Matsui T, Yano H. Effect of exercise on iron metabolism in horses. *Biol Trace Elem Res* 2005;107:33-42.

Inoue Y, Osawa T, Matsui A, Asai Y, Murakami Y, Matsui T, Yano H. Changes of serum mineral concentrations in horses during exercise. *Asian-australas J Anim Sci* 2002;15:531-536.

Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.

Kramer JW. Normal hematology of the horse. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, chap.165, 2000 pp.1069-1074.

Lewis LD. Minerais para os equinos. In: *Nutrição clínica equina – alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, chap.2, 2000, pp.29-73.

Machado LP, Saito ME, Silveira VF, Yonezawa LA, Taconeli CA, Kohayagawa A. Susceptibilidade eritrocitária ao estresse osmótico em eqüinos da raça Árabe: efeito do exercício, treinamento e suplementação com vitamina E. *Rev Univ Rural Sér Ci Vida* 2007a;27:134-136.

Machado LP, Silveira VF, Saito ME, Yonezawa LA, Watanabe MJ, Kohayagawa A. Exercício progressivo em esteira induzindo redução do número de eritrócitos em equinos sedentários da raça Árabe (Dados preliminares). *Rev Univ Rural Sér Ci Vida* 2007b;27:116-118.

Martinez AC, Villa G, Aguilo A, Tur JA, Pons A. Hand strike-induced hemolysis and adaptations in iron metabolism in Basque ball players. *Ann Nutr Metab* 2006;50:206-213.

Masini AP, Baragli P, Tedeschi D, Lubas G, Martinelli F, Gavassa A, Sighieri C. Behaviour of mean erythrocyte volume during submaximal treadmill exercise in the horse. *Comp Haematol Int* 2000;10:38-42.

Masini AP, Tedeschi D, Baragli P, Sighieri C, Lubas G. Exercise-induced intravascular haemolysis in standarbred horses. *Comp Clin Path* 2003;12:45-48.

Matsuki N, Tamura S, Ono K, Watari T, Goitsuka R, Yamanobe A, Hiraga A, Kubo K, Takagi S, Hasegawa A, Suzuki N. Exercise-induced phospholipid degradation in equine skeletal muscle and erythrocytes. *J Vet Med Sci* 1991;53:1001-1007.

Mckeever KH. The endocrine system and the challenge of exercise. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2002;18:321-353.

Mckeever KH, Schurg WA, Jarrett SH, Convertino VA. Exercise training-induced hypervolemia in the horse. *Med Sci Sports Exerc* 1987;19:21-27.

Mills PC, Smith NC, Casas I, Harris P, Harris RC, Marlin DJ. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur J Appl Physiol* 1996;74:60-66.

Orino R, Yamamoto S, Watanabe K. Fibrinogen as a ferritin-binding protein in horse plasma. *J vet Med Sci* 1993;55:785-787.

Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur J Appl Physiol* 2008;103:381-391.

Pimentel-Gomes F. Curso de estatística experimental, São Paulo: Nobel, 1987, 466p.

Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem* 1974;20:1255-1270.

Schumacher YO, Schmid A, König D, Berg A. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. *Br J Sports Med* 2002;36:195-200.

Smith JE. Iron metabolism and its disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic Press, 1997. chap.97, p.223-239.

Smith JE, Cipriano JE, DeBowes RM, Moore K. Iron deficiency and pseudo-iron deficiency in hospitalized horses. *J Am Vet Med Assoc* 1986a;188:285-287.

Smith JE, DeBowes RM, Cipriano JE. Exogenous corticosteroids increase serum iron concentration in mature horses and ponies. *J Am Vet Med Assoc* 1986b;188:1296-1298.

Smith JE, Kolbuch-Braddon M, Gillam I, Telford RD, Weidemann MJ. Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol* 1995;70:427-436.

Smith JE, Moore K, Cipriano JE, Morris PG. Serum ferritin as a measure of stored iron in horses. *J Nutr* 1984;114:677-681.

Snow DH, Harris RC. The use of conventional and unconventional supplements in the thoroughbred horse. *Proc Nutr Soc* 1989;48:135-139.

Taylor C, Rogers G, Goodman C, Baynes RD, Bothwell TH, Bezwoda WR, Kramer F, Hattingh J. Hematologic, iron-related, and acute-phase protein responses to sustained strenuous exercise. *J Appl Physiol* 1987;62:464-469.

Watanabe MJ, Thomassian A, Teixeira-Neto FJ, Alves ALG, Hussni CA, Nicoletti JLM. Alterações do pH, da pO<sub>2</sub> e da pCO<sub>2</sub> arteriais e da concentração de lactato sanguíneo de cavalos da raça Árabe durante exercício em esteira de alta velocidade. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006;58:320-326.

Wilmore JH, Costill DL. Fisiologia do esporte e do exercício. 2.ed. São Paulo: Manole, 2001. 709p.

Yur F, Dede S, Deger Y, Kilicalp D. Effects of vitamin E and selenium on serum trace and major elements in horses. Biol Trace Elem Res 2008;125:223-228.

# CAPÍTULO III



**Malondialdeído eritrocitário e sérico na avaliação da lipoperoxidação induzida pelo exercício em equinos**

A ser encaminhado para o periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*

ISSN: 0275-6382

Normas para publicação disponível em:

<http://jvdi.org/misc/ifora.dtl>

## **Malondialdeído eritrocitário e sérico na avaliação da lipoperoxidação induzida pelo exercício em equinos**

### **RESUMO**

O exercício pode induzir estresse oxidativo e promover lipoperoxidação, principalmente nos eritrócitos por circularem em todo o organismo e serem mais susceptíveis a estas lesões. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício progressivo em esteira de alta velocidade, do treinamento e da suplementação com vitamina E na susceptibilidade dos eritrócitos a lipoperoxidação em eqüinos Puro Sangue Árabe. Foram utilizados 16 equinos, adultos, machos e fêmeas, distribuídos em dois grupos: controle (GC, n=8) e suplementado com vitamina E (1000 U/animal/dia) (GE, n=8). Os equinos não treinados foram submetidos a uma prova de exercício progressivo (P1). Em seguida, foram treinados por 20 dias e submetidos a uma segunda prova de exercício (P2). O protocolo de exercício para as duas provas iniciou-se a 1,8m/s por 5 min, 4m/s por 3min, 6m/s por 2min seguido de fases de 1min em velocidades crescentes até que os animais conseguissem manter-se em exercício, com a esteira inclinada a +7%. Em ambas as provas foram colhidas amostras de sangue venoso no M0, ao trote, ao galope, imediatamente após e aos 15min, 30min, 2h, 6h, 24h, 72h e 120h após o término do exercício. Foram avaliados o malondialdeído (MDA) eritrocitário basal e induzido por oxidação *in vitro* e a concentração sérica de MDA e vitamina E. O MDA eritrocitário basal foi maior nos animais treinados e houve maior produção *in vitro* de MDA eritrocitário nos animais suplementados. O MDA sérico aumentou 30min após o exercício e a concentração de vitamina E sérica não se alterou. Concluí-se que a mensuração do MDA sérico é sensível para avaliar o estresse oxidativo induzido por um único episódio de exercício em equinos, porém o MDA eritrocitário basal é mais eficiente para avaliar o estresse cumulativo do treinamento. A suplementação com vitamina E não impediu o estresse oxidativo induzido pelo exercício e pelo treinamento.

Palavras-chave: **eritrócitos, cavalo, exercício, estresse oxidativo, tocoferol.**

## 1. INTRODUÇÃO

No metabolismo celular aeróbio, o oxigênio ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente na mitocôndria, com conseqüente formação de água e produção de energia. Durante esse processo, são formados intermediários reativos como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais livres superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), coletivamente designados como espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001; KIRSCHVINK et al., 2008).

Em condições de repouso 5 % do total de oxigênio são convertidos em ERO (AVELLINI et al., 1999), o exercício pode aumentar em até 30 vezes o consumo de  $O_2$  nos equinos, aumentando a produção de ERO (MILLS et al., 1996). O desequilíbrio entre os eventos oxidantes e antioxidantes caracteriza a condição de estresse oxidativo. A atividade física estressante é conhecida por induzir estresse oxidativo e promover lipoperoxidação (KINNUNEN et al., 2005a; KIRSCHVINK et al., 2008).

A lipoperoxidação tem início quando qualquer espécie reativa abstrai um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado na membrana celular, formando um radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ). O  $L^{\bullet}$  reage rapidamente com o  $O_2$  resultando em radical peroxila ( $LOO^{\bullet}$ ). Os radicais  $L^{\bullet}$  e  $LOO^{\bullet}$  têm poder de sequestrar mais moléculas de hidrogênio e amplificar o processo como uma reação em cadeia. Os radicais  $OH^{\bullet}$  e  $LOO^{\bullet}$  são os principais envolvidos na indução da lipoperoxidação (HALLIWELL, 1994). Segundo Leaf et al. (1997) o exercício induz lipoperoxidação transitória em humanos saudáveis e os produtos da reação são removidos durante a recuperação do exercício.

O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais desta reação sendo um indicador de intensidade da mesma. Observam-se aumento na concentração de MDA em eqüinos submetidos ao exercício (CHIARADIA et al., 1998; AVELLINI et al., 1999). Como os eritrócitos circulam por todo o organismo, a mensuração do MDA eritrocitário pode ser utilizada como um índice de estresse oxidativo (MACHADO et al., 2007).

Os eritrócitos são altamente vulneráveis aos efeitos danosos do  $O_2$ , a presença do ferro e do  $O_2$  na molécula de hemoglobina contribuem para a formação de ERO, além disso, os lipídios insaturados da membrana são fortemente susceptíveis a oxidação (HATHERILL et al., 1991; MACHADO et al., 2009). A

lipoperoxidação provoca redução da fluidez e do potencial de membrana e aumento da permeabilidade para íons hidrogênio e outros íons (GUTTERIDGE, 1995), estando relacionada com menor deformabilidade e maior destruição dos eritrócitos (CHRISTIAN, 2000). A utilização dos eritrócitos em modelos de estudos do metabolismo oxidativo sustenta-se na abundância destas células, simplicidade e facilidade de obtenção, sendo alvos constantes de lesões metabólicas (STEINBERG e BENZ JR, 2000).

Ao contrário da maioria das células, os eritrócitos não têm capacidade de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados e a manutenção de níveis adequados de antioxidantes é extremamente importante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). A vitamina E tem importância primordial por estar ligada na membrana como antioxidante natural (DUTTA-ROY et al., 1994), protegendo as membranas celulares da lipoperoxidação (CYNAMON, et al., 1985).

A suplementação com antioxidantes pode ser necessária em situações de estresse oxidativo, seja por ineficiência dos sistemas antioxidantes ou por aumento dos eventos oxidantes (KIRSCHVINK et al., 2008; MACHADO et al., 2009). Vários estudos em equinos evidenciam o aumento da produção de ERO pelo exercício (AVELLINI et al., 1999; BALOHG et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004). Os equinos são atletas natos e devido à grande massa muscular, consomem mais O<sub>2</sub> durante o exercício do que as outras espécies, o que os tornam bons modelos para o estudo do estresse oxidativo (ART e LEKEUX, 2005).

Na última década mais de 100 estudos abordaram o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em equinos, porém poucos avaliaram o efeito da suplementação oral com antioxidantes (KIRSCHVINK et al., 2008). Silveira (2008) utilizou a suplementação oral com vitamina E constando que esta foi eficiente para evitar a propagação das ERO e amenizar o estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do exercício, do treinamento e da suplementação oral com vitamina E sobre a susceptibilidade dos eritrócitos a lipoperoxidação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe (PSA), 13 fêmeas e três machos castrados, com idade variando de 3,5 a 10 anos e peso médio de 362,3 ±25,6 kg. Todos estavam sem treinamento há pelo menos seis meses e clinicamente

sadios. Os animais foram acomodados na proporção de dois a três animais por piquete de 50 m<sup>2</sup>, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, localizada a 48°52' de longitude oeste, 22°52' de latitude sul, a 756 metros acima do nível do mar. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Câmara de Ética e Experimentação Animal da FMVZ- Unesp -Botucatu, protocolo nº 21/2006-CEEA.

O manejo nutricional consistiu de feno de capim *coast-cross* (*Cynodon dactylon*) à vontade, 2 kg/animal/dia de ração comercial para equinos (Proequi 13, Guabi - Mogiana Alimentos S/A, Campinas, Brasil) e 30 g/animal/dia de suplemento mineral (Sal Mineral Guabiphos Centauro 80, Mogiana Alimentos S/A) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de oito animais: grupo controle (GC) e grupo suplementado com vitamina E (GE). A suplementação foi iniciada 15 dias antes da primeira prova de exercício com a dose de 1.000 U/animal/dia de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferol (E-Tabs, Sigma Pharma-EMS, Hortolândia, Brasil) e foi mantida até o término do experimento. As cápsulas de vitamina E foram oferecidas individualmente em mistura de melão de cana e rapadura picada antes do fornecimento da ração.

## 2.2 Protocolo de exercício

Foram realizadas duas provas de exercício progressivo, P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento), em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) no Centro de Medicina Esportiva Eqüina do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ- Unesp -Botucatu. Em ambas as provas utilizou-se o protocolo de exercício de Watanabe et al. (2006) modificado com +7 % de inclinação, nas velocidades de 1,8 m/s (passo) por 5 min, seguindo a 4,0 m/s (trote) por 3 min, 6,0 m/s (cânter) por 2 min e posteriormente 8,0 m/s, 9,0 m/s, 10,0 m/s, 11,0 m/s e 12 m/s (galope) por 1 min em cada velocidade, ou até quando o animal não mais conseguisse manter-se em galope mesmo sendo estimulado. Todas as provas de exercício foram realizadas entre 6h e 8h, com temperatura ambiente média de 20,3 $\pm$ 1,8 e umidade relativa do ar média de 73,4 $\pm$ 4,8 (Termohigrômetro digital - Minipa MT 241 – China).

Após P1 e término das colheitas, os animais foram submetidos ao treinamento em esteira, seis vezes por semana até totalizarem 20 dias. O protocolo de treinamento foi adaptado de Watanabe et al. (2006) e consistiu de 1,8 m/s

(passo) por 5 min; 4,0 m/s (trote) por 3 min; 6,2 m/s (cânter) por 2 min; 8,0 m/s (galope) por 1 min e 10 m/s (galope) por 1 min; seguidos de desaquecimento a 3 m/s por 2 min e 1,6 m/s por 2 min, sempre com a esteira em posição horizontal. Após o término do período de treinamento, os animais não foram submetidos à atividade física por 48 h antes de realizarem a P2.

### *2.3 Colheita de amostras e análises laboratoriais*

Nas duas provas, foram colhidas amostras de sangue venoso antes do exercício (M0), durante o exercício ao trote (4m/s) e ao galope (8m/s), imediatamente após (PE) e 15 min, 30 min, 2 h, 6 h, 24 h, 72 h e 120 h após o exercício. Para as colheitas durante o exercício foi realizada a cateterização da veia jugular, adaptando-se um circuito extensor contendo solução de NaCl 0,9% (JP-Indústria Farmacêutica Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) heparinizada com 4 U de heparina sódica/mL (Heparin, Cristália, Itapirica, Brasil).

Após o exercício, com o animal em repouso, as amostras foram colhidas por punção da veia jugular com o auxílio de agulha de calibre 25x8 (B.D., Vacutainer - Brand Blood Collection Needles, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA) acoplada a tubos a vácuo contendo heparina sódica (Vacuum II, Labnew, São Paulo, Brasil) para a determinação do MDA eritrocitário e tubos a vácuo contendo ativador de coagulação e gel separador (BD Vacutainer-SST™) para a obtenção de soro, que foi aliqotado e armazenado à -80 °C até análise. As amostras destinadas a dosagem de vitamina E foram colhidas, armazenadas e processadas ao abrigo da luz.

A concentração de MDA eritrocitária foi avaliada indiretamente pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), na sua concentração basal (MDA-Erit-basal) e após estímulo oxidativo (MDA-Erit-estimulado), segundo Machado et al. (2007). Amostras de 10 mL de sangue contendo heparina sódica foram centrifugadas a 1000 g por 10 min, descartou-se o plasma e a camada de leucócitos obtendo-se o concentrado de eritrócitos. Realizaram-se três lavagens com solução PBS gelada e pH=7,4.

Para a determinação da concentração basal de MDA, 100 µL de papa de eritrócitos foram adicionados em 900 µL de PBS. Para avaliar o MDA formado após a indução da lipoperoxidação utilizaram-se 100 µL de eritrócitos, 800 µL de PBS e 100 µL de hidroperóxido de terc-butíla (10 mM) e incubados a 37 °C por 60 min. Em ambos, foi mensurada a concentração de hemoglobina, antes da incubação para o

MDA estimulado (JAIN, 1986). Em seguida, 1 mL de ácido tricloroacético a 28 % foi adicionado a cada tubo de ambos os testes, agitou-se e centrifugou-se a 1000 g por 15 min. Do sobrenadante obtido, retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi acrescida de 100 µL de hidroxitolueno butilado (BHT), 500 µL de TBA a 1 % em solução de NaOH 0,05 M e 500 µL de HCl a 25 % e incubados a 95 °C por 15 min. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção do branco e do padrão, porém nestes, a amostra foi substituída por água deionizada e 1 µM de MDA, respectivamente. Após resfriamento em banho de gelo adicionaram-se 2 mL de n-butanol, agitou-se e centrifugou-se a 1000 g por 15 min. Procedeu-se a leitura das densidades ópticas dos sobrenadantes a 532 nm, sendo o resultado expresso em nM MDA/gHb.

As dosagens de MDA sérico foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão), em fluoroscopia de acordo com Karatas et al. (2002). A coluna de fase reversa utilizada foi Lichrospher 100 RP-18, com respectiva pré-coluna (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para a curva padrão utilizou-se o 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP – Sigma, Saint Louis, EUA). Os cromatogramas foram monitorados a 254 nm com o volume de injeção da amostra de 20 µL e com o tempo de retenção do MDA de aproximadamente 2,60 min.

A vitamina E sérica foi determinada por HPLC (Shimadzu Corporation), em fluoroscopia de acordo com Arnaud et al. (1991). A coluna utilizada foi Nucleosil C18, com respectiva pré-coluna (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Alemanha) e acetato de alfa tocoferol (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) como padrão interno. Os cromatogramas foram monitorados a 285 nm com o volume de injeção da amostra de 50 µL e com o tempo de retenção da vitamina E de aproximadamente 8 min.

#### *2.4 Análise estatística*

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade do conjunto de dados. Para as variáveis paramétricas os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) no delineamento em parcelas sub-subdivididas para a avaliação do efeito da suplementação, treinamento e exercício.

Nos casos em que se detectaram diferenças entre os diferentes momentos avaliados, executou-se o teste de Tukey para as variáveis MDA-Erit-basal, MDA sérico e vitamina E pelo programa SAS (SAS versão 9.1, suport.sas.) e o teste de comparações múltiplas de Dunnett para o MDA-Erit-estimulado, onde se utilizou o programa estatístico R (R Development Core Team, versão 2.3.1, 2006), ambos com

objetivo de testar se os valores das variáveis durante o exercício ou após seu término diferem do M0, com nível de significância de 5 % (PIMENTEL-GOMES, 1987). Foram realizadas correlações entre diferentes variáveis utilizando-se teste  $r$  para correlação de Pearson.

### 3. RESULTADOS

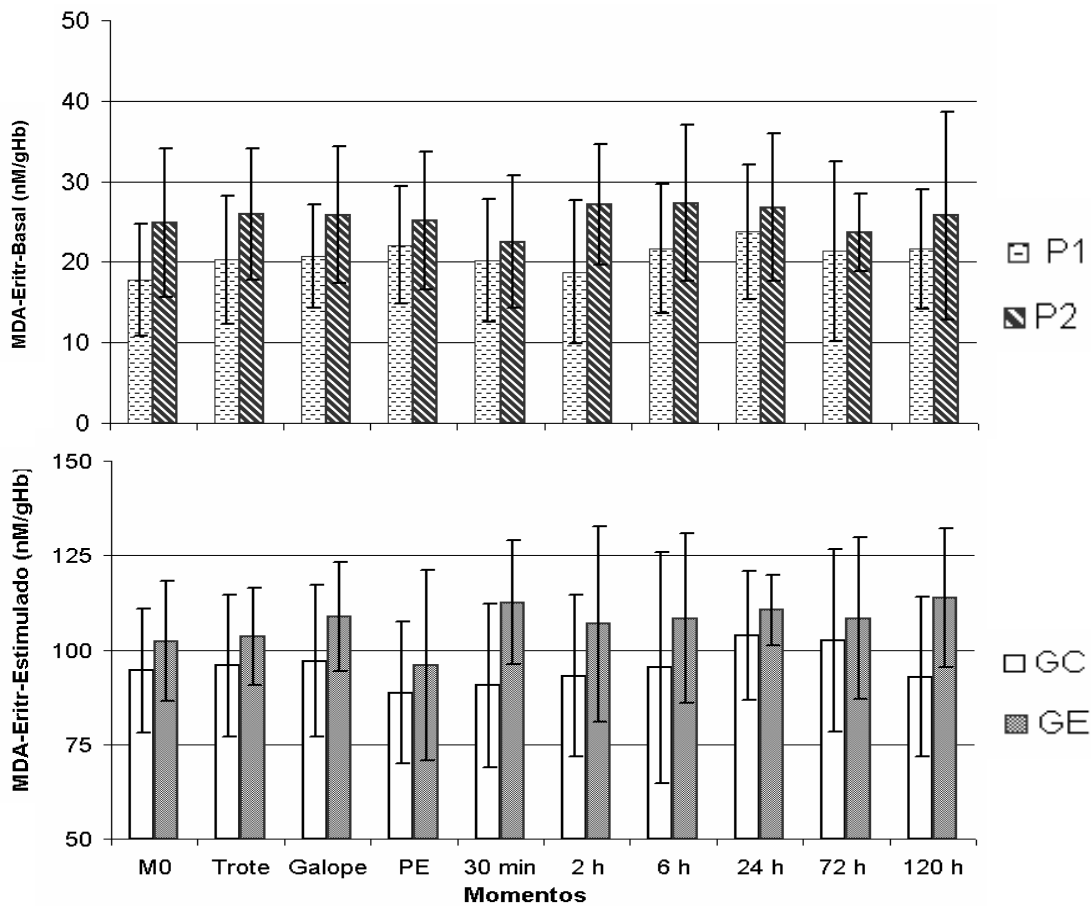
Verificou-se efeito do treinamento na concentração de MDA eritrocitário basal ( $p<0,03$ ), que foi superior na P2 em relação a P1 (Figura 01). Para este parâmetro não houve efeito do exercício ou suplementação.

Houve efeito da suplementação na concentração de MDA eritrocitário após estímulo oxidativo *in vitro*, com maior concentração de MDA no grupo suplementado ( $p<0,04$ ) (Figura 01). Ocorreu efeito do exercício ( $p<0,05$ ), contudo, nenhum momento diferiu significativamente do M0. Não houve efeito do treinamento neste parâmetro.

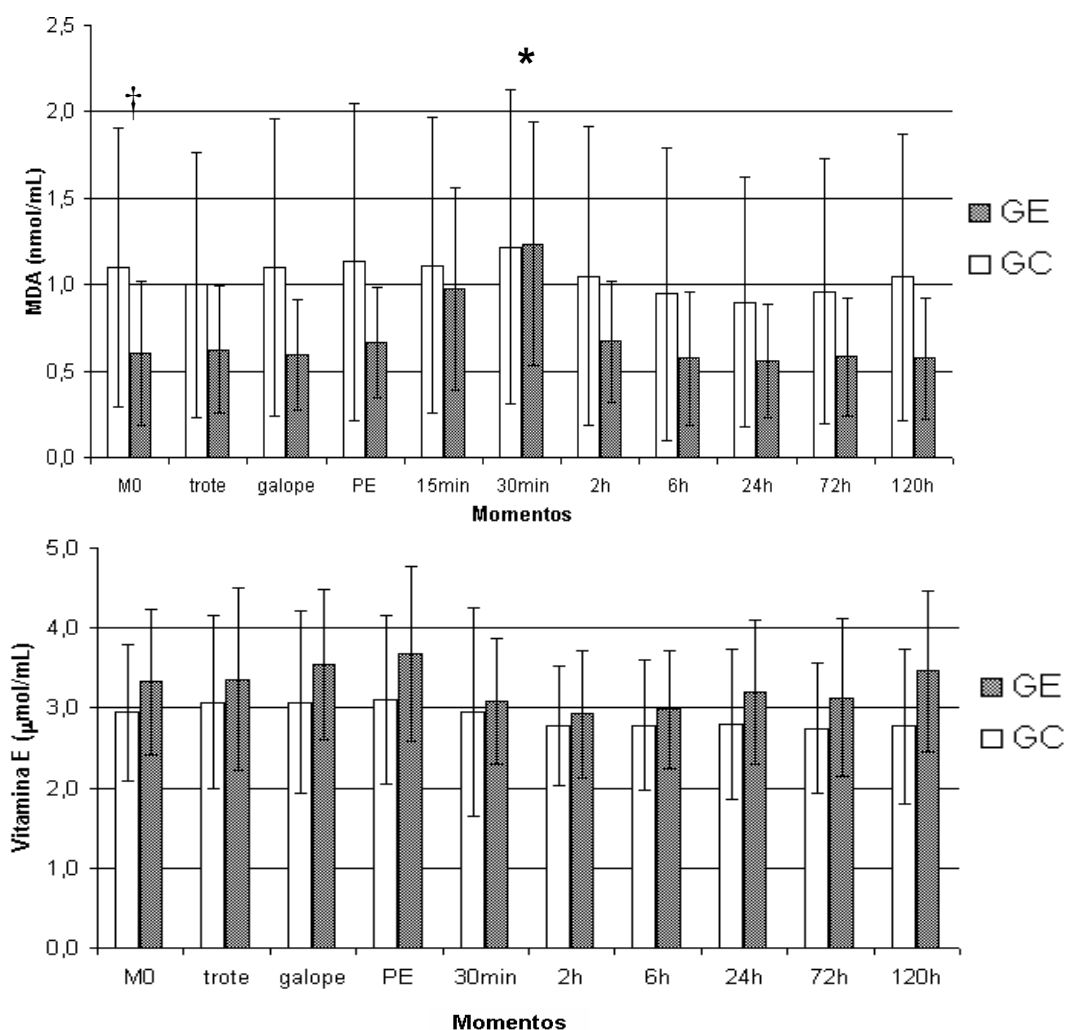
O exercício promoveu aumento na concentração sérica de MDA aos 30 min ( $p<0,001$ ), em relação ao M0 (Figura 02). Não houve diferença entre grupos, porém ocorreu efeito da interação grupo:momento ( $p<0,001$ ), indicando que a variação entre grupos não foi a mesma para todos os momentos. Apenas no M0 observou-se diferença significativa entre grupos ( $p<0,05$ ), com maior MDA para o GC. Não houve efeito do treinamento na concentração de MDA sérico.

A concentração média de vitamina E sérica no GE foi superior a média do GC em todos os momentos, porém não significativa (Figura 02). Ocorreu efeito do exercício sobre concentração de vitamina E, verificado pela diferença significativa entre os momentos ( $p<0,001$ ), contudo, nenhum momento diferiu significativamente do M0. Não houve efeito do treinamento. Foram observadas apenas correlações fracas entre as variáveis, as mais evidentes foram correlações negativas entre o MDA eritrocitário basal e a vitamina E ( $r=-0,33$ ;  $p<0,001$ ), e entre MDA e vitamina E séricos ( $r=-0,25$ ;  $p<0,001$ ).





**Figura 1.** Média e desvio padrão do malondialdeído eritrocitário, nas suas concentrações basal (MDA-Eritr-Basal) e após estímulo oxidativo *in vitro* (MDA-Eritr-Estimulado), em 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe dos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0), durante (trote e galope), imediatamente após (PE), 30min, 2h, 6h, 24h, 72h e 120h pós-exercício. MDA-Eritr-Basal: GE=GC ( $p>0,05$ ); P2>P1, ( $p<0,03$ ). MDA-Eritr-Estimulado: GE>GC ( $p<0,04$ ); P1=P2 ( $p>0,05$ ).



**Figura 2.** Média e desvio-padrão das concentrações séricas de malondialdeído (MDA) e vitamina E em 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, dos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira. Mensurados antes (M0), durante (trote e galope), imediatamente após (PE), 15min, 30min, 2h, 6h, 24h, 72h e 120h pós-exercício. MDA: P1=P2 ( $p>0,05$ ); \*30min geral>M0 geral e 30min GE>M0 GE ( $p<0,05$ ). † GC>GE no mesmo momento ( $p<0,05$ ). Vitamina E: GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

O protocolo de treinamento utilizado induziu estresse oxidativo, verificado pelo maior MDA-Eritr-Basal na prova realizada após o treinamento. Os efeitos do exercício e do treinamento são controversos, há relatos de melhora da capacidade antioxidante pela associação de treinamento e suplementação (AVELLINI et al., 1999; MOFFARTS et al., 2005). Outros autores sugeriram que o treinamento pode induzir estresse oxidativo (AVELLINI et al., 1995; KINNUNEN et al., 2005b). Segundo Sacke et al. (2001), o incremento das defesas antioxidantes no treinamento pode não ser proporcional às necessidades criadas pelos eventos pró-oxidantes e afetar o requerimento de antioxidantes na dieta.

O aumento do MDA-Eritr-Basal pode indicar que os animais estavam sendo submetidos a um estresse repetitivo, devido a lesões oxidativas acumulativas que ocorrem durante o período de treinamento. Avellini et al. (1995) observaram maior estresse oxidativo eritrocitário em equinos treinados. Os eritrócitos circulam por todo o organismo sendo alvos constantes de lesões metabólicas (STEINBERG e BENZ JR, 2000). Weight et al. (1991) observaram menor vida média eritrocitária em atletas humanos comparados a um grupo de indivíduos sedentários. Quanto maior a taxa metabólica do animal, maior o estresse oxidativo acumulado e menor a vida média dos eritrócitos (CHRISTIAN, 2000).

Cynamon et al. (1985) mensuraram a formação *in vitro* de MDA eritrocitário, após estímulo oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em humanos. Observaram maior formação de MDA nos indivíduos deficientes em vitamina E e concluíram que a determinação do MDA formado *in vitro* seria um método sensível e funcional para avaliar se os teores da vitamina no organismo estão adequados. No presente estudo, verificamos que esta conclusão não se aplica para equinos, visto que houve maior produção *in vitro* de MDA eritrocitário nos animais suplementados com vitamina E. Contudo, o MDA eritrocitário basal e MDA sérico podem ser utilizados para avaliar a capacidade antioxidante, pois apresentaram correlação inversa com a concentração de vitamina E sérica.

A maior produção de MDA eritrocitário no GE também pode indicar um efeito pró-oxidante da vitamina E *in vitro*. Uma das funções da vitamina E é transformar uma ERO potencialmente nociva em compostos menos reativos, por exemplo, transformar o radical HO<sub>2</sub><sup>•</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nesta reação, a vitamina E é oxidada, podendo ser novamente reduzida para vitamina E ativa e originar mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este atravessa livremente as membranas lipídicas e apesar de menos deletério que o HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, em grande concentração pode ultrapassar a capacidade de depuração da catalase e da glutathiona peroxidase promovendo maior lesão (SETIADI et al., 2003; YEUM et al., 2004).

O protocolo de exercício utilizado promoveu estresse oxidativo, constatado pelo aumento progressivo de MDA sérico, que atingiu um pico significativo aos 30 min após o exercício. Estudos anteriores observaram este aumento nos primeiros minutos seguintes ao exercício (CHIARADIA et al., 1998; AVELLINI et al., 1999). Contudo, o MDA-Erit-Basal não se elevou com o exercício, concordando com outros autores que também não observaram aumento da lipoperoxidação eritrocitária após

exercício em equinos (BALOGH et al., 2001).

O MDA sérico detectou o estresse promovido por um único episódio e exercício, que pode ser classificado como um evento estressante agudo, com pico significativo em 30min e retornou aos valores basais 2h após o exercício. Mills et al. (1996) observaram resultados semelhantes, com aumento de hidroperóxidos lipídicos aos 5 e 30 min e tendência de eliminação deste produto da lipoperoxidação 2 h após o exercício, tanto no exercício em esteira de curto período e alta intensidade como no exercício prolongado semelhante ao enduro. Diferindo de outros autores, que estimam a eliminação destes produtos da lipoperoxidação de modo lento, em um período superior a 18 h (CHIARADIA et al., 1998; KINNUNEN et al., 2005b). No presente estudo, o rápido retorno do MDA aos valores basais pode indicar que o estresse oxidativo foi leve, pois a intensidade do exercício influencia a produção de MDA (CHIARADIA et al., 1998), ou que os animais apresentavam teor adequado de vitamina E, evitando a propagação da reação.

O grupo controle apresentou maior concentração de MDA sérico em quase todos os momentos, comparado aos animais suplementados, porém esta diferença só foi significativa no momento M0. A suplementação com vitamina E não impediu a lipoperoxidação induzida pelo exercício. Em estudo realizado com dieta basal de 120 U/dia e suplementação de 5.000 U e 10.000 U/dia de vitamina E por três semanas também não se observou redução do estresse oxidativo induzido pelo exercício nos equinos (WILLIAMS e CARLUCCI, 2006). Porém, a correlação negativa moderada entre vitamina E sérica e MDA-Eritr-Basal e o rápido retorno dos valores de MDA sérico aos níveis pré-exercício no GE, indicam que a vitamina E impediu a propagação da reação de lipoperoxidação, concordando com Avellini et al. (1999).

Observou-se maior concentração de vitamina E sérica nos animais suplementados, embora não significativo, indicando que houve absorção da vitamina E na forma como foi administrada. Os valores basais da vitamina E no grupo controle apresentaram-se adequados, semelhantes aos observados em equinos da raça Puro Sangue Inglês (MOFFARTS et al., 2005).

Não houve efeito do exercício em relação à concentração de vitamina E comparado ao M0, concordando com outros estudos em equinos que também não constataram alterações significativas na concentração da vitamina E em provas de trote em esteira (KINNUNEN et al., 2005b) e em provas de enduro em animais suplementados com vitamina E (MARLIN et al., 2002) e não suplementados

(KINNUNEN et al., 2005a). Também é relatada a redução da concentração de vitamina E após o exercício de galope máximo (AVELLINI et al., 1999) ou após um período de treinamento de 30 e 60 dias (AVELLINI et al., 1995).

Humanos com deficiência de vitamina E apresentaram maior produção de MDA eritrocitário, após estímulo oxidativo *in vitro* (CYNAMON, et al., 1985). Segundo Kirschvink et al., (2008) a suplementação com vitamina E é importante para evitar uma deficiência induzida pelo exercício, porém não possui efeito benéfico em indivíduos não deficientes e não aumenta a performance atlética dos equinos.

Concluimos que a suplementação com vitamina E não impede o estresse oxidativo induzido pelo exercício e pelo treinamento. A mensuração do MDA sérico é mais sensível para avaliar o estresse oxidativo induzido por um único episódio de exercício. Enquanto a avaliação da lipoperoxidação eritrocitária é mais eficiente que a dosagem do MDA sérico nos casos de estresse acumulativo como o promovido pelo treinamento.

## **5. AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro por meio do Auxílio à Pesquisa (processo 03/12077-6).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Estudos e Taxa de Bancada (processo 141836/2006-07).

## **6. REFERÊNCIAS**

Arnaud J, Fortis I, Lachier D, et al.: 1991, Simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 572:103-116.

Art T, Lekeux P: 2005, Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. *Livest Prod Sc* 72:101-111.

Avellini L, Chiaradia E, Gaiti A: 1999, Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comp Biochem Physiol B* 123:147-154.

Avellini L, Silvestrelli M, Gaiti A: 1995, Training-induced modifications in some biochemical defenses against free radicals in equine erythrocytes. *Vet Res Commun* 19:179-184.

Balogh N, Gáal T, Ribiczeyné OS, et al.: 2001, Biochemical and antioxidant changes

in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. *Vet Clin Pathol* 30:214-218.

Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, et al.: 1998, Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp Biochem Physiol B* 119:833-836.

Christian JA: 2000, Red blood cell survival and destruction. *In: Schalm's veterinary hematology*, ed. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, 6th ed., pp.117-124. Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia, USA.

Cynamon HA, Isenberg JN, Nguyen CH: 1985, Erythrocyte malondialdehyde release in vitro: a functional measure of vitamin E status. *Clin Chim Acta* 151:169-176.

Dutta-Roy AK, Gordon MJ, Campbell FM, et al.: 1994, Vitamin E requirements, transport, and metabolism: role of  $\alpha$ -tocopherol binding proteins. *J Nutr Biochem* 5 (12):562-570.

Gutteridge JMC: 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41(12):1819-1828.

Halliwell B: 1994, Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52:253-265.

Halliwell B, Gutteridge JMC: 2001, Free radicals in biology and medicine, ed. Halliwell B, Gutteridge JMC, 3th ed., 936p. Oxford University Press, New York, USA.

Hatherill JR, Till GO, Ward PA: 1991, Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents Actions* 32:351-358.

Jain NC: 1986, Hematologic techniques. *In: Schalm's veterinary hematology*, ed. Jain NC, 4th ed., pp.20-8. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.

Karatas F, Karatepe M, Baysar A: 2002, Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 311:76-79.

Kinnunen S, Atalay M, Hyypä S, et al.: 2005a, Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. *J Sports Sci Med* 4:415-421.

Kinnunen S, Hyypä S, Lehmuskero A, et al.: 2005b, Oxygen radicals absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *J Sports Sci Med* 95:550-556.

Kirschvink N, Moffarts B, Lekeux P: 2008, The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J* 177:178-191.

Machado LP, Kohayagawa A, Saito ME, et al.: 2009, Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na medicina veterinária. [Erythrocyte oxidative damage and antioxidant mechanisms in veterinary medicine]. *Rev Cienc Agrovet* 8: 84-94.

Machado LP, Saito ME, Silveira VF, et al.: 2007, Malondialdeído eritrocitário como índice de estresse oxidativo em equinos da raça Árabe. [Erythrocyte malondialdehyde as oxidative stress status in Arabian horses]. Rev Br Hematol Hemoter 29: 237.

Marlin DJ, Fenn K, Smith N, et al.: 2002, Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. J Nutr 132:S1622-1627.

Mills PC, Smith NC, Casas I, et al.: 1996, Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. Eur J Appl Physiol 74:60-66.

Moffarts B, Kirschvink N, Art T, et al.: 2005, Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. Vet J 169:65-74.

Pimentel-Gomes F: 1987, Curso de estatística experimental, ed. Pimentel-Gomes F, 12th ed., 430p. Nobel, São Paulo, Brasil.

Sacheck JM, Blumberg JB: 2001, Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. Nutr 17:809-814.

Setiadi DH, Chass GA, Torday LL, et al.: 2003, Vitamin E models. Can the antioxidant and pro-oxidant dichotomy of  $\alpha$ -tocopherol be related to ionic ring closing and radical ring opening redox reactions? Theochem 620:93-106.

Steinberg MH, Benz Jr EJ: 2000, Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. *In*: Hematology, ed. Hoffman R, Benz E, Shattil S, et al., 3th ed., pp. 356 – 367. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA.

Watanabe MJ, Thomassian A, Teixeira-Neto FJ, et al.: 2006, Alterações do pH, da  $pO_2$  e da  $pCO_2$  arteriais e da concentração de lactato sanguíneo de cavalos da raça Árabe durante exercício em esteira de alta velocidade. [Changes in arterial pH,  $PO_2$ ,  $PCO_2$  and blood lactate concentration in Arabian horses during exercise on a high-speed treadmill]. Arq Bras Med Vet Zootec 58:320-326.

Weight LM, Byrne MJ, Jacobs P: 1991, Haemolytic effects of exercise. Clin Sci 81:147-152.

Williams CA, Carlucci SA: 2006, Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin e antioxidant status in intensely exercised horses. Equine Vet J 36:617-621.

Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, et al.: 2004, Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. J Anim Sci 82: 588-594.

Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, et al.: 2004, Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. Arch Biochem Biophys 430:97-103.

# CAPÍTULO IV



## 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os equinos são atletas natos, adaptados à prática de exercício físico, porém mesmo nesta espécie o exercício produz alterações metabólicas, sendo necessários mais estudos para definir quais constituem mecanismos adaptativos fisiológicos ou quando estas podem ser deletérias ao organismo.

Muitos proprietários e médicos veterinários de cavalos de esporte acreditam que estes animais necessitam de suplementação extra de ferro para evitar uma deficiência e aumentar o desempenho, entretanto este é um conceito erroneamente adaptado da medicina humana. Em equinos adequadamente nutridos, o exercício de curta duração promove apenas alterações na dinâmica de distribuição do ferro sem comprometer seus estoques, deste modo a suplementação é desaconselhável.

Este estudo indica que o aumento do cortisol pelo exercício pode causar hiperferremia. Estudos futuros são necessários para melhor esclarecer os mecanismos pelos quais o aumento de cortisol altera o metabolismo do ferro, visto que, a maior mobilização de ferro contribui para o surgimento de doenças após provas de exercício.

Verificou-se que a “pseudoanemia” ocorre de 6 a 120h pós-exercício, portanto, estudos futuros devem ser concentrados neste período, principalmente com o intuito de verificar se outros protocolos de exercício induzem o mesmo efeito.

O estresse oxidativo induzido pelo exercício pode ter um efeito menor em curto prazo, mas pouco se sabe sobre seus efeitos na saúde dos equinos à longo prazo, visto a diversidade de doenças associadas à produção de radicais livres na medicina humana.

Os eritrócitos circulam por todo o organismo e vivem em média 140 a 145 dias nos eqüinos sendo alvos constantes de lesões metabólicas (CHRISTIAN, 2000) e deste modo possibilitam a avaliação do efeito crônico do estresse oxidativo, que ocorre durante um período de treinamento pelo somatório do estresse promovido por cada episódio de exercício.

A suplementação com vitamina E não evitou o estresse oxidativo induzido pelo treinamento, mas atenuou o estresse induzido por um único episódio de exercício progressivo em esteira, impedindo a propagação da reação de lipoperoxidação. Ela propiciou um rápido retorno dos níveis de MDA sérico aos valores de repouso nos animais suplementados.

Porém, *in vitro*, a vitamina E apresentou característica pró-oxidante. Outros autores também observaram efeito pró-oxidante da vitamina E *in vitro* (SAITO, 2007) e na lesão de DNA *in vivo* (SILVEIRA, 2008). Acreditamos que esse efeito pró-oxidante ocorra em pequena proporção e não tenha características deletérias ao organismo, promovendo um estímulo para adaptação dos animais a eventos oxidativos subsequentes.

O exercício está relacionado à maior produção de radicais livres e os eritrócitos por serem células abundantes, relativamente simples e de fácil obtenção proporcionam um excelente modelo para estudar o balanço entre mecanismos oxidativos e antioxidantes nos sistemas biológicos.

## 2. BIBLIOGRAFIA<sup>1</sup>(Capítulos I e IV)

ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. *Rev. Educ. Contin. CRMV/SP*, v.5, p.192-205, 2002.

ALMEIDA, R.F.; LOPES, E.L.; NUNES, R.C.; MATOS, M.P.C.; SOBESTIANSKY, J.; FIORAVANTI, M.C.S.; OLIVEIRA, A.P.A.; RUFINO, L.M. Metabolismo do ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento micromineral e vitamínico. *Ciênc. Rural*, v.37, p.1097-1103, 2007.

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B.; STOIAN, I. Hcpidin – central regulador of iron metabolism. *Eur. J. Haematol.*, v.78, p.1-10, 2006.

AVELLINI, L.; CHIARADIA, E.; GAITI, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, v.123, p.147-154, 1999.

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

BALOGH, N.; GAÁL, T.; RIBICZEYNÉ, P.S.; PETRI, Á. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of Pentathlon horses before and after exercise. *Vet. Clin. Pathol.*, v.30, n.4, p.214-218, 2001.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina E. In: PENTEADO, M.V.C. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. São Paulo: Manole, 2003. p.122-164.

BORGES, A.S.; DIVERS, T.J.; STOKOL, T.; MOHAMMED, O.H. Serum iron and plasma fibrinogen concentration as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v.21, p.489-494, 2007.

BORGES, A.S.; WINAND, N.J.; DIVERS, T.J.; ARAÚJO, J.P.; CUNHA, P.H.J.; OLIVEIRA, J.P. Equine hepcidin: mRNA sequence and expression in liver tissue. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 10., 2008, Moscow. Anais... Moscow, 2008.

BOUCHER, J.H.; FERGUSON, E.W.; WILHELMSSEN, C.L.; STATHAM, N. McMEEKIN, R.R. Erythrocyte alterations during endurance exercise in horses. *J. Appl. Physiol.*, v.51, n.1, p.131-134, 1981.

BURTON, G.W.; TRABER, M.G. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Ann. Rev. Nutr.*, v.10, p.357-382, 1990.

CARRELL, R.W.; WINTERBOURN, C.C.; RACHMILEWITZ, E.A. Activated oxygen

---

<sup>1</sup>ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**:informação e documentação- Referências- Elaboração.Rio de Janeiro, 2002. 24p.  
BIOSIS.Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 2002. 468p.

and haemolysis. *Br. J. Haematol.*, v.30, p.259-265, 1975.

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

CHRISTIAN, J.A. Red blood cell survival and destruction. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. chap.20, p.117-124.

CLEMENS, M.R., WALLER, H.D. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids*, v.45, p.251-268, 1987.

DUNN, L.L.; RAHMANTO, Y.S.; RICHARDSON, D.R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol.*, v.17, p.93-100, 2007.

DUTTA-ROY, A.K.; GORDON, M.J.; CAMPBELL, F.M.; DUTHIE, G.G.; JAMES, W.P.T. Vitamin E requirements, transport, and metabolism: role of  $\alpha$ -tocopherol-binding proteins. *J. Nutr. Biochem.*, v.5, n.12, p.562-570, 1994.

EDENS, L.M.; ROBERTSON, J.L.; FELDMAN, B.F. Cholestatic hepatopathy, thrombocytopenia and lymphopenia associated with iron toxicity in a thoroughbred gelding. *Equine Vet. J.*, v.25, p.81-84, 1993.

FALLON, K.E. Utility of hematological and iron-related screening in elite athletes. *Clin. J. Sport Med.*, v.14, p.145-152, 2004.

FRANKEN, P.; WENSING, T.; SCHOTMAN, A.J.H. The concentration of iron in the liver, spleen and plasma, and the amount of iron in bone marrow of horses. *Zbl. Vet. Med.*, v.28, p.381-389, 1981.

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, v.41, n.12, p.1819-1828, 1995.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press, 2001. 936p.

HANZAWA, K.; HIRAGA, A.; YOSHIDA, Y.; HARA, H.; KAI, M.; KUBO, K.; WATANABE, S. Effects of exercise on plasma haptoglobin composition in control and splenectomized Thoroughbred horses. *J. Equine Sci.*, v.13, n.3, p.89-92, 2002.

HANZAWA, K.; WATANABE, S. Changes in osmotic fragility of erythrocytes during exercise in athletic horses. *J. Equine Sci.*, v.11, n.3, p.51-61, 2000.

HARVEY, J.W. Erythrocyte metabolism. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams &

Wilkins, 2000. p. 125-128.

HARVEY, J.W. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic Press, 1997. chap.7, p.157-203.

HARVEY, J.W.; ASQUITH, R.L.; SUSSMAN, W.A.; KIVIPELTO, J. Serum ferritin, serum iron, and erythrocyte value in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.48, p.1348-1352, 1987.

HARVEY, J.W.; KANEKO, J.J. Mammalian erythrocyte metabolism and oxidant drugs. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, v.42, p.253-261, 1977.

HATHERILL, J.R.; TILL, G.O.; WARD, P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents Actions*, v.32, p.351-358, 1991.

HEBBEL, R.P. Erythrocytes antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.*, v.107, n.5, p.401-404, 1986.

HYYPPÄ, S.; HÖYHTYÄ, M.; NEVALAINEN, M.; PÖSÖ, A.R. Effect of exercise on plasma ferritin concentrations: implication for the measurement of iron status. *Equine Vet. J.*, suppl.34, p.186-190, 2002.

INOUE, Y.; MATSUI, A.; ASAI, Y.; AOKI, F.; MATSUI, T.; YANO, H. Effect of exercise on iron metabolism in horses. *Biol. Trace Elem. Res.*, v.107, p. 33-42, 2005.

INOUE, Y.; OSAWA, T.; MATSUI, A.; ASAI, Y.; MURAKAMI, Y.; MATSUI, T.; YANO, H. Changes of serum mineral concentrations in horses during exercise. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, v.15, p. 531-536, 2002.

Jl, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.222, n.3, p.283-292, 1999.

Jl, L.L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrient. *Free Radic. Biol. Med.*, v.18, n.6, p.1079-1986, 1995.

Jl, L.L.; DILLON, D.A.; BUMP, M.S.; LAWRENCE, L.M. Antioxidant enzyme response to exercise in equine erythrocytes. *J. Equine Vet. Sci.*, v.10, n.5, p.380-383, 1990.

KASIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel eletrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, v.463, p.13-31, 2000.

KINNUNEN, S.; HYYPPÄ, S.; LEHMUSKERO, A.; OKSALA, N.; MÄENPÄÄ, P.; HÄNNINEN, O.; ATALAY, M. Oxigen radicals absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *J. Sports Sci. Med.*, v.95, p.550-556, 2005.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet. J.*, v.177, p.178-191, 2008.

LEAF, D.A.; KLEINMAN, M.T.; HAMILTON, M.; BARSTOW, T.J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.29, p.1036-1039, 1997.

LEWIS, L.D. Minerais para os equinos. In: *Nutrição clínica equina – alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, 2000. Chap.2, p.29-73.

MACHADO LP, SAITO ME, SILVEIRA VF, YONEZAWA LA, TACONELI CA, KOHAYAGAWA A. Susceptibilidade eritrocitária ao estresse osmótico em eqüinos da raça Árabe: efeito do exercício, treinamento e suplementação com vitamina E. *Rev. Univ. Rural Ser. Ci. Vida*, v.27, supl., p.134-136, 2007a.

MACHADO, L.P.; SILVEIRA, V.F.; SAITO, M.E.; YONEZAWA, L.A.; WATANABE, M.J.; KOHAYAGAWA, A. Exercício progressivo em esteira induzindo redução do número de eritrócitos em equinos sedentários da raça Árabe (Dados preliminares). *Rev. Univ. Rural Ser. Ci. Vida*, v.27, supl., p.116-118, 2007b.

MARTINEZ, A.C.; VILLA, G.; AGUILO, A.; TUR, J.A.; PONS, A. Hand strike-induced hemolysis and adaptations in iron metabolism in Basque ball players. *Ann. Nutr. Metab.*, v.50, p.206-213, 2006.

MASINI, A.P.; BARAGLI, P.; TEDESCHI, D.; LUBAS, G.; MARTINELLI, F.; GAVASSA, A.; SIGHIERI, C. Behaviour of mean erythrocyte volume during submaximal treadmill exercise in the horse. *Comp. Haematol. Int.*, v.10, p.38-42, 2000.

MASINI, A.P.; TEDESCHI, D.; BARAGLI, P.; SIGHIERI, C.; LUBAS, G. Exercise-induced intravascular haemolysis in standarbred horses. *Comp. Clin. Path.*, v.12, p.45-48, 2003.

MATSUKI, N.; TAMURA, S.; ONO, K.; WATARI, T.; GOITSUKA, R.; YAMANOBÉ, A.; HIRAGA, A.; KUBO, K.; TAKAGI, S.; HASEGAWA, A.; SUZUKI, N. Exercise-induced phospholipid degradation in equine skeletal muscle and erythrocytes. *J. Vet. Med. Sci.*, v.53, p.1001-1007, 1991

MCKEEVER, K.H.; SCHURG, W.A.; JARRETT, S.H.; CONVERTINO, V.A. Exercise training-induced hypervolemia in the horse. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.19, p.21-27, 1987.

MEYDANI, M. Vitamin E. *Lancet*, v.345, p.170-175, 1995.

MILLS, P.C.; SMITH, N.C.; CASAS, I.; HARRIS, P.; HARRIS, R.C.; MARLIN, D.J. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v.74, p.60-66, 1996.

MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidants status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.*, v.169, n.1, p.7-9, 2005.

ONO, K.; INUI, K.; HASEGAWA, T.; MATSUKI, N.; WATANABE, H.; TAKAGI, S.; HASEGAWA, A.; TOMODA, I. The changes of antioxidative enzyme activities in equine erythrocytes following exercise. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.52, n.4, p.759-765, 1990.

OZTURK, L.; MANSOUR, B.; YÜKSEL, M.; YALÇIN, A.S.; ÇELIKOGLU, F.; GÓKHAN, N. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clin. Chim. Acta.*, v.332, p.83-88, 2003.

PEELING, P.; DAWSON, B.; GOODMAN, C.; LANDERS, G.; TRINDER, D. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 103, p. 381-391, 2008.

PRCHALL, J.T.; GREGG, X.T. Red cell enzymopathies. In: HOFMAN, R.; BENZ JR., E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; SILBERSTEIN, L.E.; MCGLAVE, P. *Hematology*. 3.ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, chap.32, p.561-576.

ROCK, C.L.; JACOB, R.A.; BOWEN, P.E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.96, n.7, p.693-703, 1996.

SAITO, M.E. *Influência da suplementação com vitamina E (dl- $\alpha$  tocoferol) nas funções de monócitos e polimorfonucleares de eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício físico*. 2007. 48f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SACHECK, J.M.; BLUMBERG, J.B. Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutr.*, v.17, p.809-814, 2001.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v.10, p.314-318, 2004.

SCHUMACHER, Y.O.; SCHMID, A.; KÖNIG, D.; BERG, A. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. *Br. J. Sports Med.*, v.36, p.195-200, 2002.

SEN, C.K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *J. Nutr. Biochem.*, v.8, p.660-672, 1997.

SILVEIRA, V.F. *Efeito do exercício progressivo em esteira de alta velocidade em eqüinos da raça Árabe suplementados com vitamina E (dl- $\alpha$ -tocoferol) sobre o leucograma, cortisol, lipoperoxidação e lesão no DNA de leucócitos periféricos*. Botucatu, 2008. 107f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SJÖDIN, B.; WESTING, Y.H.; APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.*, v.10, n.4, p.236-254, 1990.

SMITH, J.A.; KOLBUCH-BRANDDON, M.; GILLAN, I.; TELFORD, R.D.; WEIDEMAN, M.J. Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and

osmotic stress following submaximal exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 70, p.427-436, 1995.

SMITH, J.E.; CIPRIANO, J.E.; DEBOWES, R.M.; MOORE, K. Iron deficiency and pseudo-iron deficiency in hospitalized horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.188, p.285-287, 1986.

SMITH, J.E.; MOORE, K.; CIPRIANO, J.E.; MORRIS, P.G. Serum ferritin as a measure of stored iron in horses. *J. Nutr.*, v.114, p.677-681, 1984.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic Press, 1997. chap.97, p.223-239.

SNOW, D.H.; HARRIS, R.C. The use of conventional and unconventional supplements in the thoroughbred horse. *Proc. Nutr. Soc.*, v.48, p.135-139, 1989.

SNYDER, L.M.; FORTIER, N.L.; TRAINOR, J.; Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J. Clin. Invest.*, v.76, p.1971-1977, 1985.

SZYGULA, Z. Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training. *Sports Med.*, v.10, p.181-197, 1990.

TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; AMORINI, A.M.; FAZZINA, G.; TUTTOBENE, M.; GIARDINA, B.; LAZZARINO, G. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur. J. Biochem.*, v.267, p.684-689, 2000.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutr.*, v.16, n.7/8, p.716-718, 2000.

TRABER, M.G.; PARKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.62, suppl., p.1501-1509, 1995.

WEIGHT, L.M.; BYRNE, M.J.; JACOBS, P. Haemolytic effects of exercise. *Clin. Sci.*, v. 81, p.147-152, 1991.

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

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. *Fisiologia do esporte e do exercício*. 2.ed. São Paulo: Manole, 2001. 709p.

WORWOOD, M. The laboratory assessment of iron status – an update. *Clin. Chim. Acta*, v.259, p.3-23, 1997.



ANEXOS

**ANEXO 1** . Média  $\pm$  desvio-padrão da concentração sérica de ferro ( $\mu\text{g/dL}$ ) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		Média geral
	P1	P2	P1	P2	
<b>M0</b>	150,3 $\pm$ 39,1	170,0 $\pm$ 26,8	150,4 $\pm$ 35,9	141,3 $\pm$ 34,9	<b>153,0 <math>\pm</math> 34,5</b>
<b>PE</b>	179,9 $\pm$ 34,7	208,8 $\pm$ 22,2	183,0 $\pm$ 34,9	174,8 $\pm$ 36,3	<b>186,6 <math>\pm</math> 33,7*</b>
<b>30 min</b>	143,3 $\pm$ 29,5	171,5 $\pm$ 27,4	149,3 $\pm$ 28,1	146,1 $\pm$ 33,6	<b>152,5 <math>\pm</math> 30,4</b>
<b>2 h</b>	135,8 $\pm$ 30,5	161,5 $\pm$ 23,4	145,5 $\pm$ 27,2	134,5 $\pm$ 20,3	<b>144,3 <math>\pm</math> 26,7</b>
<b>6 h</b>	117,3 $\pm$ 32,3	138,3 $\pm$ 24,9	121,6 $\pm$ 23,0	117,6 $\pm$ 16,0	<b>123,7 <math>\pm</math> 25,1*</b>
<b>24h</b>	146,9 $\pm$ 25,1	143,0 $\pm$ 47,0	159,8 $\pm$ 17,8	131,0 $\pm$ 23,9	<b>145,2 <math>\pm</math> 30,8</b>
<b>72h</b>	193,9 $\pm$ 46,0	170,9 $\pm$ 23,6	135,8 $\pm$ 28,7	140,9 $\pm$ 40,2	<b>153,0 <math>\pm</math> 41,6</b>
<b>120h</b>	143,6 $\pm$ 42,0	151,8 $\pm$ 26,0	135,3 $\pm$ 26,3	147,0 $\pm$ 36,9	<b>144,4 <math>\pm</math> 32,5</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos e entre provas, GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).

\* Difere do M0 ( $p<0,05$ ) na mesma coluna.

**ANEXO 2 .** Média  $\pm$  desvio-padrão da capacidade total de ligação do ferro ( $\mu\text{g/dL}$ ) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		Média geral
	P1	P2	P1	P2	
<b>M0</b>	401,1 $\pm$ 21,0	371,4 $\pm$ 46,8	410,8 $\pm$ 59,2	385,8 $\pm$ 30,0	<b>392,3 <math>\pm</math> 42,7</b>
<b>PE</b>	453,9 $\pm$ 26,7	440,3 $\pm$ 42,9	489,4 $\pm$ 55,6	476,2 $\pm$ 29,0	<b>465,0 <math>\pm</math> 42,9*</b>
<b>30 min</b>	394,8 $\pm$ 31,0	392,9 $\pm$ 35,2	431,6 $\pm$ 35,6	408,8 $\pm$ 23,4	<b>407,0 <math>\pm</math> 34,0</b>
<b>2 h</b>	397,2 $\pm$ 19,4	396,1 $\pm$ 49,4	424,6 $\pm$ 44,3	403,5 $\pm$ 27,6	<b>405,3 <math>\pm</math> 37,2</b>
<b>6 h</b>	389,8 $\pm$ 17,3	380,0 $\pm$ 43,7	418,4 $\pm$ 65,2	389,9 $\pm$ 22,3	<b>396,0 <math>\pm</math> 42,2</b>
<b>24h</b>	376,3 $\pm$ 26,2	381,4 $\pm$ 38,0	401,1 $\pm$ 43,2	396,2 $\pm$ 14,7	<b>388,7 <math>\pm</math> 32,5</b>
<b>72h</b>	400,0 $\pm$ 37,4	374,5 $\pm$ 42,6	404,3 $\pm$ 23,8	374,9 $\pm$ 16,1	<b>388,4 <math>\pm</math> 33,3</b>
<b>120h</b>	387,8 $\pm$ 32,9	393,6 $\pm$ 35,5	409,9 $\pm$ 50,2	394,5 $\pm$ 20,5	<b>396,4 <math>\pm</math> 35,5</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos e entre provas, GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).

\* Difere do M0 ( $p<0,05$ ) na mesma coluna.

**ANEXO 3** . Média  $\pm$  desvio-padrão da capacidade latente de ligação do ferro ( $\mu\text{g/dL}$ ) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		Média geral
	P1	P2	P1	P2	
<b>M0</b>	250,9 $\pm$ 44,0	221,0 $\pm$ 55,7	240,8 $\pm$ 48,7	244,5 $\pm$ 46,1	<b>239,3 <math>\pm</math> 47,8</b>
<b>PE</b>	274,1 $\pm$ 50,2	257,3 $\pm$ 50,8	280,6 $\pm$ 49,7	301,5 $\pm$ 46,8	<b>278,4 <math>\pm</math> 49,6*</b>
<b>30 min</b>	251,6 $\pm$ 39,8	243,6 $\pm$ 39,2	260,1 $\pm$ 45,0	262,6 $\pm$ 41,1	<b>254,5 <math>\pm</math> 40,0</b>
<b>2 h</b>	261,4 $\pm$ 46,8	250,6 $\pm$ 47,2	263,1 $\pm$ 42,2	269,0 $\pm$ 34,2	<b>261,0 <math>\pm</math> 41,4*</b>
<b>6 h</b>	272,5 $\pm$ 34,1	258,4 $\pm$ 40,3	280,1 $\pm$ 70,5	272,3 $\pm$ 25,1	<b>270,8 <math>\pm</math> 44,2*</b>
<b>24h</b>	229,4 $\pm$ 36,5	221,6 $\pm$ 33,6	258,1 $\pm$ 55,2	265,2 $\pm$ 37,2	<b>243,6 <math>\pm</math> 43,7</b>
<b>72h</b>	206,2 $\pm$ 47,1	238,8 $\pm$ 29,3	233,4 $\pm$ 31,8	234,0 $\pm$ 47,8	<b>228,1 <math>\pm</math> 40,1</b>
<b>120h</b>	244,2 $\pm$ 27,0	258,4 $\pm$ 21,9	258,1 $\pm$ 57,1	247,5 $\pm$ 54,2	<b>252,0 <math>\pm</math> 41,4</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos e entre provas, GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).

\* Difere do M0 ( $p<0,05$ ) na mesma coluna.

**ANEXO 4 .** Média  $\pm$  desvio-padrão do índice de saturação da transferrina (%) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		Média geral
	P1	P2	P1	P2	
<b>M0</b>	37,5 $\pm$ 10,0	40,9 $\pm$ 11,1	41,6 $\pm$ 5,6	36,8 $\pm$ 9,3	<b>39,2 <math>\pm</math> 9,0</b>
<b>PE</b>	39,9 $\pm$ 8,7	41,9 $\pm$ 8,8	42,9 $\pm$ 5,2	36,8 $\pm$ 8,0	<b>40,4 <math>\pm</math> 7,8</b>
<b>30 min</b>	36,4 $\pm$ 7,9	38,1 $\pm$ 7,4	40,0 $\pm$ 7,1	35,8 $\pm$ 8,5	<b>37,6 <math>\pm</math> 7,5</b>
<b>2 h</b>	34,5 $\pm$ 8,9	37,0 $\pm$ 7,5	38,2 $\pm$ 5,4	33,5 $\pm$ 5,6	<b>35,8 <math>\pm</math> 6,9*</b>
<b>6 h</b>	30,1 $\pm$ 8,3	32,2 $\pm$ 6,2	33,7 $\pm$ 7,8	30,2 $\pm$ 4,1	<b>31,5 <math>\pm</math> 6,6*</b>
<b>24h</b>	39,2 $\pm$ 7,2	42,1 $\pm$ 4,6	35,7 $\pm$ 12,0	33,3 $\pm$ 7,2	<b>37,6 <math>\pm</math> 8,5</b>
<b>72h</b>	48,5 $\pm$ 10,3*	36,1 $\pm$ 5,4	42,4 $\pm$ 6,1	37,8 $\pm$ 11,3	<b>41,2 <math>\pm</math> 9,6</b>
<b>120h</b>	36,6 $\pm$ 9,1	34,2 $\pm$ 4,5	37,5 $\pm$ 7,9	37,7 $\pm$ 11,4	<b>36,5 <math>\pm</math> 8,3</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos e entre provas, GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).

\* Difere do M0 ( $p<0,05$ ) na mesma coluna.

**ANEXO 5 .** Média  $\pm$  desvio-padrão da concentração sérica de ferritina ( $\mu\text{g/L}$ ) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		Média geral
	P1	P2	P1	P2	
<b>M0</b>	102,9 $\pm$ 58,4	95,6 $\pm$ 42,0	73,5 $\pm$ 69,7	64,9 $\pm$ 54,6	<b>84,2 <math>\pm</math> 56,5</b>
<b>PE</b>	105,9 $\pm$ 67,6	112,9 $\pm$ 71,7	64,5 $\pm$ 60,2	58,9 $\pm$ 43,1	<b>85,6 <math>\pm</math> 63,5</b>
<b>30 min</b>	91,3 $\pm$ 52,8	99,0 $\pm$ 61,4	61,2 $\pm$ 60,4	61,3 $\pm$ 66,7	<b>78,2 <math>\pm</math> 60,1</b>
<b>2 h</b>	100,6 $\pm$ 55,7	107,2 $\pm$ 61,8	66,9 $\pm$ 56,3	64,0 $\pm$ 43,1	<b>84,7 <math>\pm</math> 55,6</b>
<b>6 h</b>	103,4 $\pm$ 52,2	101,7 $\pm$ 46,4	73,7 $\pm$ 58,0	60,5 $\pm$ 39,1	<b>84,8 <math>\pm</math> 50,5</b>
<b>24h</b>	102,3 $\pm$ 55,2	107,0 $\pm$ 64,6	65,8 $\pm$ 38,0	62,7 $\pm$ 31,5	<b>84,5 <math>\pm</math> 51,1</b>
<b>72h</b>	94,2 $\pm$ 52,7	94,3 $\pm$ 50,0	66,3 $\pm$ 44,3	62,4 $\pm$ 39,9	<b>79,3 <math>\pm</math> 47,2</b>
<b>120h</b>	106,0 $\pm$ 57,3	96,7 $\pm$ 55,0	64,7 $\pm$ 47,2	66,2 $\pm$ 46,9	<b>83,4 <math>\pm</math> 52,6</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos, entre provas e entre momentos ( $p>0,05$ ).

**ANEXO 6** . Média  $\pm$  desvio-padrão da concentração sérica de cortisol (ng/mL) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		Média geral
	P1	P2	P1	P2	
<b>M0</b>	69,5 $\pm$ 21,6	61,3 $\pm$ 24,2	78,7 $\pm$ 32,6	59,0 $\pm$ 14,2	<b>67,1 <math>\pm</math> 24,2</b>
<b>PE</b>	73,9 $\pm$ 15,4	81,5 $\pm$ 33,3	91,7 $\pm$ 39,3	78,4 $\pm$ 21,5	<b>81,4 <math>\pm</math> 28,3*</b>
<b>30 min</b>	107,8 $\pm$ 21,9	101,6 $\pm$ 21,0	109,5 $\pm$ 23,9	104,4 $\pm$ 14,2	<b>105,8 <math>\pm</math> 19,8*</b>
<b>2 h</b>	70,3 $\pm$ 31,2	60,9 $\pm$ 17,4	64,5 $\pm$ 21,0	66,7 $\pm$ 21,2	<b>65,6 <math>\pm</math> 22,4</b>
<b>6 h</b>	39,5 $\pm$ 17,0	26,4 $\pm$ 14,6	26,4 $\pm$ 15,8	34,5 $\pm$ 23,1	<b>31,7 <math>\pm</math> 18,0*</b>
<b>24h</b>	50,0 $\pm$ 7,3	47,3 $\pm$ 9,5	52,6 $\pm$ 17,2	58,0 $\pm$ 19,8	<b>52,0 <math>\pm</math> 14,3*</b>
<b>72h</b>	46,9 $\pm$ 9,0	43,0 $\pm$ 10,4	52,9 $\pm$ 18,0	45,0 $\pm$ 6,6	<b>46,9 <math>\pm</math> 11,8*</b>
<b>120h</b>	57,3 $\pm$ 17,7	49,2 $\pm$ 17,0	49,4 $\pm$ 12,2	49,6 $\pm$ 15,4	<b>51,4 <math>\pm</math> 15,3*</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos e entre provas, GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).

\* Difere do M0 ( $p<0,05$ ) na mesma coluna.

**ANEXO 7** . Média  $\pm$  desvio-padrão do volume globular (%) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		P1	P2	Média geral
	P1	P2	P1	P2	GC+GE	GC+GE	
<b>M0</b>	38,1 $\pm$ 3,1	36,9 $\pm$ 2,9	35,6 $\pm$ 2,0	34,3 $\pm$ 3,0	<b>36,9 <math>\pm</math> 2,8</b>	<b>35,6 <math>\pm</math> 3,1</b>	<b>36,2 <math>\pm</math> 3,0</b>
<b>PE</b>	52,6 $\pm$ 3,7	54,3 $\pm$ 3,6	52,3 $\pm$ 2,3	52,9 $\pm$ 2,8	<b>52,4 <math>\pm</math> 3,0*</b>	<b>53,6 <math>\pm</math> 3,2*</b>	<b>53,0 <math>\pm</math> 3,1*</b>
<b>30 min</b>	40,8 $\pm$ 6,8	40,9 $\pm$ 4,1	39,0 $\pm$ 3,8	40,8 $\pm$ 3,2	<b>39,9 <math>\pm</math> 5,4*</b>	<b>40,8 <math>\pm</math> 3,6*</b>	<b>40,3 <math>\pm</math> 4,5*</b>
<b>2 h</b>	36,5 $\pm$ 4,2	37,1 $\pm$ 4,2	35,8 $\pm$ 2,6	35,5 $\pm$ 2,4	<b>36,1 <math>\pm</math> 3,4</b>	<b>36,3 <math>\pm</math> 3,4</b>	<b>36,2 <math>\pm</math> 3,4</b>
<b>6 h</b>	34,4 $\pm$ 3,7	36,1 $\pm$ 1,7	34,1 $\pm$ 2,4	33,6 $\pm$ 2,7	<b>34,3 <math>\pm</math> 3,0*</b>	<b>34,9 <math>\pm</math> 2,6</b>	<b>34,6 <math>\pm</math> 2,8</b>
<b>24h</b>	33,6 $\pm$ 1,8	36,8 $\pm$ 3,7	34,3 $\pm$ 2,1	35,0 $\pm$ 2,5	<b>33,9 <math>\pm</math> 1,9*</b>	<b>35,9 <math>\pm</math> 3,2</b>	<b>34,9 <math>\pm</math> 2,8</b>
<b>72h</b>	33,3 $\pm$ 2,9	35,5 $\pm$ 3,9	33,5 $\pm$ 2,7	34,1 $\pm$ 4,2	<b>33,4 <math>\pm</math> 2,7*</b>	<b>34,8 <math>\pm</math> 4,0</b>	<b>34,1 <math>\pm</math> 3,4</b>
<b>120h</b>	35,1 $\pm$ 3,8	35,9 $\pm$ 2,8	32,1 $\pm$ 1,8	34,1 $\pm$ 2,8	<b>33,6 <math>\pm</math> 3,2*</b>	<b>35,0 <math>\pm</math> 2,9</b>	<b>34,3 <math>\pm</math> 3,1</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos e entre provas, GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).

\* Difere do M0 ( $p<0,05$ ) na mesma coluna.



**ANEXO 8.** Média  $\pm$  desvio-padrão do malondialdeído eritrocitário basal (nM/gHb) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0), durante (trote e galope) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		P1	P2*
	P1	P2	P1	P2	GC+GE	GC+GE
<b>M0</b>	15,7 $\pm$ 7,8	25,7 $\pm$ 12,9	19,9 $\pm$ 5,6	24,1 $\pm$ 5,2	17,8 $\pm$ 6,9	<b>24,9 <math>\pm</math> 9,2</b>
<b>trote</b>	19,5 $\pm$ 10,0	26,0 $\pm$ 11,3	21,1 $\pm$ 5,9	25,9 $\pm$ 5,0	<b>20,3 <math>\pm</math> 8,0</b>	<b>25,9 <math>\pm</math> 8,2</b>
<b>galope</b>	19,0 $\pm$ 7,2	24,5 $\pm$ 10,5	22,4 $\pm$ 5,5	27,1 $\pm$ 6,7	<b>20,7 <math>\pm</math> 6,4</b>	<b>25,9 <math>\pm</math> 8,5</b>
<b>PE</b>	22,1 $\pm$ 8,3	23,6 $\pm$ 10,3	22,1 $\pm$ 6,7	26,6 $\pm$ 7,1	<b>22,1 <math>\pm</math> 7,3</b>	<b>25,2 <math>\pm</math> 8,5</b>
<b>30 min</b>	17,0 $\pm$ 7,6	22,6 $\pm$ 10,5	23,4 $\pm$ 6,8	22,4 $\pm$ 6,4	<b>20,2 <math>\pm</math> 7,7</b>	<b>22,5 <math>\pm</math> 8,2</b>
<b>2 h</b>	18,1 $\pm$ 8,7	28,7 $\pm$ 6,3	19,4 $\pm$ 9,6	26,0 $\pm$ 8,4	<b>18,8 <math>\pm</math> 8,9</b>	<b>27,2 <math>\pm</math> 7,4</b>
<b>6 h</b>	19,5 $\pm$ 5,8	29,8 $\pm$ 7,5	23,6 $\pm$ 9,5	25,5 $\pm$ 11,2	<b>21,7 <math>\pm</math> 8,0</b>	<b>27,3 <math>\pm</math> 9,7</b>
<b>24h</b>	23,1 $\pm$ 10,5	25,1 $\pm$ 6,7	24,4 $\pm$ 6,3	27,8 $\pm$ 10,7	<b>23,7 <math>\pm</math> 8,4</b>	<b>26,8 <math>\pm</math> 9,2</b>
<b>72h</b>	24,4 $\pm$ 13,3	20,5 $\pm$ 4,2	18,7 $\pm$ 9,0	25,6 $\pm$ 4,3	<b>21,4 <math>\pm</math> 11,2</b>	<b>23,6 <math>\pm</math> 4,8</b>
<b>120h</b>	21,6 $\pm$ 9,4	28,5 $\pm$ 17,1	21,6 $\pm$ 7,4	23,4 $\pm$ 8,3	<b>21,6 <math>\pm</math> 7,4</b>	<b>25,8 <math>\pm</math> 12,9</b>

PE = imediatamente após o exercício.

\* P2>P1,  $p < 0,03$ .

**ANEXO 9.** Média  $\pm$  desvio-padrão do malondialdeído eritrocitário após estímulo oxidativo *in vitro* (nM/gHb) em 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0), durante (trote e galope) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		GC	GE*
	P1	P2	P1	P2	P1+P2	P1+P2
<b>M0</b>	97,4 $\pm$ 17,3	91,6 $\pm$ 16,2	97,0 $\pm$ 13,2	107,7 $\pm$ 17,6	<b>94,5 <math>\pm</math> 16,5</b>	<b>102,4 <math>\pm</math> 16,0</b>
<b>trote</b>	99,1 $\pm$ 16,6	92,6 $\pm$ 21,3	108,1 $\pm$ 10,3	98,9 $\pm$ 14,1	<b>95,8 <math>\pm</math> 18,8</b>	<b>103,5 <math>\pm</math> 12,9</b>
<b>galope</b>	102,8 $\pm$ 19,4	91,2 $\pm$ 20,3	104,8 $\pm$ 13,6	113,0 $\pm$ 14,9	<b>97,0 <math>\pm</math> 20,1</b>	<b>108,9 <math>\pm</math> 14,5</b>
<b>PE</b>	88,0 $\pm$ 19,2	89,4 $\pm$ 19,5	100,2 $\pm$ 19,6	91,5 $\pm$ 30,6	<b>88,7 <math>\pm</math> 18,7</b>	<b>95,9 <math>\pm</math> 25,2</b>
<b>30 min</b>	96,5 $\pm$ 18,0	84,8 $\pm$ 24,5	108,1 $\pm$ 19,7	117,0 $\pm$ 11,9	<b>90,6 <math>\pm</math> 21,6</b>	<b>112,6 <math>\pm</math> 16,4</b>
<b>2 h</b>	96,9 $\pm$ 12,6	89,3 $\pm$ 28,1	115,1 $\pm$ 21,6	98,7 $\pm$ 28,4	<b>93,1 <math>\pm</math> 21,4</b>	<b>106,9 <math>\pm</math> 25,8</b>
<b>6 h</b>	101,2 $\pm$ 21,9	89,4 $\pm$ 38,0	106,1 $\pm$ 12,5	110,6 $\pm$ 30,3	<b>95,3 <math>\pm</math> 30,6</b>	<b>108,4 <math>\pm</math> 22,5</b>
<b>24h</b>	104,5 $\pm$ 9,9	103,3 $\pm$ 22,9	112,7 $\pm$ 10,1	108,3 $\pm$ 8,4	<b>103,9 <math>\pm</math> 17,1</b>	<b>110,5 <math>\pm</math> 9,3</b>
<b>72h</b>	99,2 $\pm$ 21,1	105,7 $\pm$ 27,9	104,9 $\pm$ 27,6	111,6 $\pm$ 13,8	<b>102,5 <math>\pm</math> 24,1</b>	<b>108,3 <math>\pm</math> 21,4</b>
<b>120h</b>	92,3 $\pm$ 25,3	93,4 $\pm$ 17,7	118,6 $\pm$ 16,0	108,9 $\pm$ 20,1	<b>92,9 <math>\pm</math> 21,1</b>	<b>113,8 <math>\pm</math> 18,2</b>

PE = imediatamente após o exercício.

\* GE>GC,  $p<0,04$ .

**ANEXO 10.** Média  $\pm$  desvio-padrão da concentração do malondialdeído sérico (nmol/mL) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0), durante (trote e galope) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		GC	GE	Média geral
	P1	P2	P1	P2	P1+P2	P1+P2	
<b>M0</b>	1,08 $\pm$ 0,67	1,12 $\pm$ 0,97	0,66 $\pm$ 0,52	0,54 $\pm$ 0,31	<b>1,10 <math>\pm</math> 0,80</b> †	<b>0,60 <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,68</b>
<b>trote</b>	1,03 $\pm$ 0,76	0,97 $\pm$ 0,83	0,67 $\pm$ 0,40	0,57 $\pm$ 0,35	<b>1,00 <math>\pm</math> 0,77</b>	<b>0,62 <math>\pm</math> 0,37</b>	<b>0,81 <math>\pm</math> 0,62</b>
<b>galope</b>	1,16 $\pm$ 0,87	1,04 $\pm$ 0,90	0,60 $\pm$ 0,33	0,59 $\pm$ 0,33	<b>1,10 <math>\pm</math> 0,86</b>	<b>0,60 <math>\pm</math> 0,32</b>	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,69</b>
<b>PE</b>	1,15 $\pm$ 0,94	1,11 $\pm$ 0,96	0,68 $\pm$ 0,31	0,65 $\pm$ 0,34	<b>1,13 <math>\pm</math> 0,92</b>	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,32</b>	<b>0,90 <math>\pm</math> 0,71</b>
<b>15 min</b>	1,06 $\pm$ 0,82	1,15 $\pm$ 0,94	0,73 $\pm$ 0,39	1,21 $\pm$ 0,68	<b>1,11 <math>\pm</math> 0,85</b>	<b>0,97 <math>\pm</math> 0,59</b>	<b>1,04 <math>\pm</math> 0,72</b>
<b>30 min</b>	1,18 $\pm$ 0,88	1,25 $\pm$ 0,99	1,16 $\pm$ 0,65	1,31 $\pm$ 0,80	<b>1,22 <math>\pm</math> 0,91</b>	<b>1,24 <math>\pm</math> 0,71*</b>	<b>1,23 <math>\pm</math> 0,80 *</b>
<b>2 h</b>	0,97 $\pm$ 0,88	1,13 $\pm$ 0,91	0,62 $\pm$ 0,31	0,72 $\pm$ 0,40	<b>1,05 <math>\pm</math> 0,87</b>	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,35</b>	<b>0,86 <math>\pm</math> 0,68</b>
<b>6 h</b>	0,90 $\pm$ 0,85	0,99 $\pm$ 0,89	0,54 $\pm$ 0,31	0,61 $\pm$ 0,47	<b>0,94 <math>\pm</math> 0,84</b>	<b>0,57 <math>\pm</math> 0,38</b>	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,67</b>
<b>24h</b>	0,90 $\pm$ 0,79	0,90 $\pm$ 0,70	0,57 $\pm$ 0,35	0,55 $\pm$ 0,33	<b>0,90 <math>\pm</math> 0,72</b>	<b>0,56 <math>\pm</math> 0,33</b>	<b>0,73 <math>\pm</math> 0,58</b>
<b>72h</b>	0,95 $\pm$ 0,75	0,97 $\pm$ 0,83	0,60 $\pm$ 0,34	0,56 $\pm$ 0,36	<b>0,96 <math>\pm</math> 0,76</b>	<b>0,58 <math>\pm</math> 0,34</b>	<b>0,77 <math>\pm</math> 0,61</b>
<b>120h</b>	0,95 $\pm$ 0,77	1,13 $\pm$ 0,93	0,58 $\pm$ 0,36	0,57 $\pm$ 0,36	<b>1,04 <math>\pm</math> 0,83</b>	<b>0,57 <math>\pm</math> 0,35</b>	<b>0,81 <math>\pm</math> 0,67</b>

PE = imediatamente após o exercício.

\* Difere do M0 ( $p < 0,05$ ) na mesma coluna.

† GC > GE no mesmo momento ( $p < 0,05$ ).

**ANEXO 11.** Média  $\pm$  desvio-padrão da concentração da vitamina E sérica ( $\mu\text{mol/mL}$ ) de 16 equinos da raça Puro Sangue Árabe, nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE), nas provas P1 (pré-treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira, mensurados antes (M0), durante (trote e galope) e após o exercício.

Momentos	GC (n=8)		GE (n=8)		GC	GE
	P1	P2	P1	P2	P1+P2	P1+P2
<b>M0</b>	2,95 $\pm$ 0,98	2,93 $\pm$ 0,75	3,47 $\pm$ 0,89	3,19 $\pm$ 0,98	<b>2,94 <math>\pm</math> 0,85</b>	<b>3,33 <math>\pm</math> 0,92</b>
<b>trote</b>	3,15 $\pm$ 1,04	2,98 $\pm$ 1,19	3,22 $\pm$ 1,14	3,50 $\pm$ 1,21	<b>3,07 <math>\pm</math> 1,08</b>	<b>3,36 <math>\pm</math> 1,14</b>
<b>galope</b>	3,02 $\pm$ 1,25	3,13 $\pm$ 1,12	3,51 $\pm$ 0,94	3,58 $\pm$ 1,00	<b>3,07 <math>\pm</math> 1,15</b>	<b>3,55 <math>\pm</math> 0,93</b>
<b>PE</b>	3,10 $\pm$ 0,99	3,12 $\pm$ 1,18	3,68 $\pm$ 0,99	3,67 $\pm$ 1,24	<b>3,11 <math>\pm</math> 1,06</b>	<b>3,68 <math>\pm</math> 1,09</b>
<b>30 min</b>	2,90 $\pm$ 0,79	3,00 $\pm$ 1,72	3,17 $\pm$ 0,77	3,01 $\pm$ 0,84	<b>2,95 <math>\pm</math> 1,30</b>	<b>3,09 <math>\pm</math> 0,78</b>
<b>2 h</b>	2,74 $\pm$ 0,76	2,82 $\pm$ 0,77	2,84 $\pm$ 0,76	3,01 $\pm$ 0,87	<b>2,78 <math>\pm</math> 0,74</b>	<b>2,92 <math>\pm</math> 0,79</b>
<b>6 h</b>	2,76 $\pm$ 0,75	2,81 $\pm$ 0,93	2,84 $\pm$ 0,56	3,12 $\pm$ 0,91	<b>2,78 <math>\pm</math> 0,82</b>	<b>2,98 <math>\pm</math> 0,74</b>
<b>24h</b>	2,77 $\pm$ 0,91	2,81 $\pm$ 1,02	3,14 $\pm$ 0,73	3,25 $\pm$ 1,09	<b>2,79 <math>\pm</math> 0,93</b>	<b>3,20 <math>\pm</math> 0,90</b>
<b>72h</b>	2,65 $\pm$ 0,57	2,84 $\pm$ 1,03	3,10 $\pm$ 1,00	3,16 $\pm$ 1,03	<b>2,75 <math>\pm</math> 0,81</b>	<b>3,13 <math>\pm</math> 0,98</b>
<b>120h</b>	2,73 $\pm$ 0,97	2,81 $\pm$ 1,04	3,54 $\pm$ 1,04	3,39 $\pm$ 1,03	<b>2,77 <math>\pm</math> 0,97</b>	<b>3,46 <math>\pm</math> 1,00</b>

PE = imediatamente após o exercício.

Não houve diferença estatística entre grupos e entre provas, GC=GE; P1=P2 ( $p>0,05$ ).