

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

MERE ERIKA SAITO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM
VITAMINA E (dl- α TOCOFEROL) NAS FUNÇÕES
DE MONÓCITOS E POLIMORFONUCLEARES DE
EQÜINOS DA RAÇA ÁRABE SUBMETIDOS AO
EXERCÍCIO FÍSICO**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aguemi Kohayagawa

Botucatu – SP
Fevereiro-2007

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

MERE ERIKA SAITO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM
VITAMINA E (dl- α TOCOFEROL) NAS FUNÇÕES
DE MONÓCITOS E POLIMORFONUCLEARES DE
EQÜINOS DA RAÇA ÁRABE SUBMETIDOS AO
EXERCÍCIO FÍSICO**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aguemí Kohayagawa

Botucatu – SP
Fevereiro-2007

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

Saito, Mere Erika.

Influência da suplementação com vitamina E (dl-a tocoferol) nas funções de monócitos e polimorfonucleares de eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício físico / Mere Erika Saito. – Botucatu [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Aguemi Kohayagawa

Assunto CAPES: 50501003

1. Eqüino - Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Estudos experimentais 2. Imunologia veterinária

CDD 636.108969

Palavras-chave: Eqüino; Exercício; Estresse oxidativo; Monócitos; Polimorfonucleares; Vitamina E

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária, em 13 de fevereiro de 2007.

Nome do autor: SAITO, Mere Erika

Título: Influência da suplementação com vitamina E (dl- α tocoferol) nas funções de monócitos e polimorfonucleares de eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício físico.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Aguemi Kohayagawa

Prof^a. Dr^a. Alice Maria M. P. Della Libera

Prof^a. Dr^a. Mara Regina Stipp Balarin

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Prof^a. Dr^a. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

*Aos meus pais, Chieko Saito e Sakuji Saito, pela
maior prova de amor que poderia ser dada, a
renúncia dos próprios sonhos pelos filhos.*

*Aos meus irmãos Takao, Ai e Gouji, por serem
motivos de eu nunca desistir dos meus objetivos e
compreenderem minha ausência em diversas ocasiões.*

*À Prof.^a. Dr.^a. Aquemi Kohayagawa pela
preocupação constante com a formação profissional e
bem estar dos orientados e pelo modelo de
profissionalismo e dedicação.*

*À Prof.^a. Dr.^a. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
pelo exemplo de dedicação e competência profissional
junto à humildade e benevolência.*

A solidão não é a melhor companhia para a realização de um trabalho ou etapa profissional, ao contrário da solidariedade. Serei grata por toda a eternidade...

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por possibilitarem a execução deste trabalho por meio da Acessoria Científica e financiamento do Projeto de Pesquisa e pela concessão da Bolsa de Estudo, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação.

Ao programa de pós-graduação desta Faculdade, por me aceitarem no quadro discente e permitirem a realização de mais uma etapa de minha vida profissional.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), da qual atualmente pertenço ao quadro docente, por me apoiarem na conclusão do curso de doutorado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Aquemi Kohayagawa, por apoiar as idéias mais improváveis sempre com confiança plena. Por tantos aprendizados, pela tranqüilidade que soluciona todos os problemas baseados em enorme conhecimento profissional e de vida e pelo carinho inestimável.

Ao Prof. Dr. Armen Thomassian, do departamento de Cirurgia e Anestesiologia desta Faculdade, por disponibilizar o Centro de Medicina Esportiva Equina e apoio indispensável para a realização deste projeto de pesquisa, pela transmissão de conhecimentos incalculáveis.

À Prof^a. Dr^a. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, do departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências (IB), UNESP – Campus de Botucatu-SP, pela disponibilização do laboratório e seus equipamentos. Pela orientação na padronização das técnicas laboratoriais, pela dedicação, paciência e carinho que recebi.

Aos meus pais Chieko Saito e Sakuji Saito, por sempre confiarem e apoiarem minhas decisões pessoais e profissionais, viabilizando de todas as formas possíveis e impossíveis os meus planos de aprimoramento.

Aos meus irmãos Jorge Takao, Sally Ai e Gouji, pela simples existência, por não me deixarem desistir mesmo em momentos mais adversos.

À querida amiga Luciana Pereira Machado, por tantas discordâncias, pelo companheirismo, pelo apoio constante, por tantos momentos felizes. Pela amiga que terei por toda a vida ou quem sabe além dela.

Ao querido amigo Rafael Torres Neto, pelo apoio incondicional, carinho e amizade. Ao dividir o mesmo teto nos tornamos muito mais que meros companheiros de república, uma verdadeira família.

Ao pós-graduando Marcos Jun Watanabe, pelo auxílio absolutamente necessário no Centro de Medicina Esportiva Equina e manejo dos animais, por compreender os horários impróprios da fase experimental, pelo exemplo de profissionalismo e companheirismo.

A Maria Luiza Cassetari, Sílvia Regina T. Estevam e Neisa Maria Cechinato, do Laboratório de Nutrição do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, pelas dosagens do malondialdeído e vitamina E.

Ao Prof. Cesar Augusto Taconelli do Departamento de Estatística, IB, UNESP-Campus de Botucatu-SP, pelo auxílio na análise estatística dos dados e sempre compreender meus prazos curtíssimos.

Aos professores Ângela Soares, Ramon Kaneno, José Mauricio Sforcin, Sílvio Luis Oliveira, Alexandrina Sartori e Eduardo Bagagli, do departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNESP – Campus de Botucatu-SP, pela prontidão em sanar minhas dúvidas e contribuir para o prosseguimento do trabalho.

À querida amiga Silvia de Almeida e sua mãe Maria, por tantos momentos felizes e todo o carinho, que foram essenciais para manter a confiança e a energia para prosseguir com o trabalho muitas vezes extenuante.

À querida amiga Geisa Karine Kleemann, por tantos momentos compartilhados em Botucatu.

À querida amiga Flavia Zuaresma Moutinho, por ser uma presença alegre em tantos momentos durante a minha passagem por Botucatu.

À querida amiga Veridiana Fernandes da Silveira, pela presença constante em todos os momentos, o auxílio indispensável em todas as fases deste projeto e pela amizade já duradoura.

À amiga Leticia Andreza Yonezawa, a cacula da equipe, cuja participação foi essencial na etapa final deste projeto.

Ao querido amigo Andrey Borges Teixeira, pelo grande auxílio nas dosagens de cortisol sérico e tanta paciência em diversos momentos deste projeto.

Ao querido amigo Joandes Henrique Fontequê, pelo incentivo, companheirismo e amizade.

À pós-graduanda Regina de Cássia Veronezi, pela disposição em auxiliar nas colheitas de amostras nos horários mais impróprios e no manejo dos animais.

Aos professores do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira e Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes sempre prontos a colaborar.

Às queridas amigas Karina Rodrigues dos Santos, Viviane von Ah Lopes, Satie Katagiri, Catharine Ferrazoli e aos queridos amigos Luciano Fonseca, Adriano Rubini, Emilano Cisneros, Aruaque de Oliveira, Ângelo, Perez e Edcarlos, por todo o carinho e preocupação constante com o meu bem estar, pela amizade que me inspira diariamente.

Às queridas amigas Simone Argenton, Débora Toledo, Raquel Reis, Adriana Brittes, Melissa, por tantas as reuniões alegres e todo o carinho em suas visitas em nossa casa em Botucatu.

Aos colegas pós-graduandos do departamento de Microbiologia e Imunologia do IB-UNESP-Botucatu, e em especial a Erika Takahashi Nakaira, Magda Paula Pereira do Nascimento e Rosana Aparecida Rodrigues Martins, por todo o apoio e amizade tão essenciais.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP – Campus de Botucatu-SP, pelos serviços prestados com dedicação.

Aos técnicos do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, Sueli de Oliveira Souza Emílio, Ilson A. Tavares e Luiz Antônio Matiazzi e a Sônia Santi técnica do Laboratório Enfermidades Parasitárias, pelo incentivo e amizade.

Aos técnicos e auxiliares Luiz Alquati, Maria de Lourdes Alves, Luiz Severino dos Santos (Lula), e às secretárias Sônia e Nice do departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNESP – Campus de Botucatu-SP, pelo auxílio na preparação de reagentes e materiais. Pelo carinho de sempre.

Aos residentes e ex-residentes do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, Cláudio Roberto Scabelo Matoso, Andressa Inaba de Magalhães, Telma Paparotto, Renata Couto, Cynthia Lucidi, Sandra Curotto e Gracy Canto Gomes pela convivência durante o doutoramento.

Aos residentes e ex-residentes do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais desta Faculdade, Andressa B. da Silveira, Brunna P. A. da Fonseca, Bruno C. Menarim, Lucas H. Alfaia, Maria Júlia A. Moreira e Rolf B. Modesto, pelo auxílio prestado em diversos momentos no manejo com os animais e pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários do Hospital Veterinário desta Faculdade, José Correa, Melissa Ágata Salemmme, Antônio G. Donizete, Luiz Souza Pinto, Nadir Silvestre de Almeida, João Borioli Cassetari, Nelson Adriano, pela prontidão em atender nossos pedidos.

A Denise Aparecida Fioravanti Garcia, Maria Aparecida D. A. Manuel e Maria Regina T. Forlin da Secretaria de Pós-Graduação desta Faculdade, por tantos pedidos atendidos com tanta prestatividade.

Aos queridos amigos Professores do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, Carlos André Rosa, Lídia Almeida Picinin, Sônia Botton, Ubirajara Maciel Costa e Vera Villamil Martins, por toda a amizade e companheirismo deste a minha chegada a Lages.

A Marlene Dias Camargo, secretária do departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu-SP, pelos inúmeros favores prontamente prestados, com a simpatia de sempre e pela amizade desde a residência no Laboratório Clínico Veterinário.

Aos queridos e inesquecíveis amigos de Pariqueira-Açu, pela presença constante, apesar da distância física.

A Deus, por colocar em minha vida tantas oportunidades e pessoas que me apoiaram e incentivam até mesmo nos gestos mais singelos.

Aos que eventualmente tenha esquecido, peço desculpas pela memória não privilegiada.

*"Faça o melhor uso possível do que
está dentro das suas possibilidades,
e o resto aceite tal como é"*
Epicteto

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\cdot\text{OH}$ - hidroxila
- d - densidade
- GC - grupo controle
- GE - grupo suplementado com vitamina E
- GSH - glutathiona reduzida
- H_2O_2 - peróxido de hidrogênio
- $\text{HOO}\cdot$ - hidroperoxila
- LPS - lipopolissacarídeo
- MDA - malondialdeído
- NO - óxido nítrico
- O_2 - oxigênio
- O_2^- - ânion superóxido
- $\text{O}_2\cdot^-$ - radicais superóxido
- P1 - prova de exercício físico antes do treinamento
- P2 - prova de exercício físico após o treinamento
- PMA - Phorbol Myristate Acetate
- PMN - polimorfonucleares
- ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
- TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas.....	xi
Resumo.....	1
Abstract.....	2
 Capítulo I	
1 Introdução geral.....	3
2 Revisão de literatura.....	4
 Capítulo II	
Artigo: Separação simultânea de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico equino.....	7
Resumo.....	8
1 Introdução.....	9
2 Material e métodos.....	9
3 Resultados.....	10
4 Discussão.....	11
5 Referências.....	13
 Capítulo III	
Artigo: Influência da suplementação de vitamina E (dl-α tocoferol) nas funções de monócitos de eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício.....	15
Resumo.....	16
1 Introdução.....	17
2 Material e métodos.....	19
3 Resultados.....	22
4 Discussão.....	27
5 Referências.....	29
 Capítulo IV	
Artigo: Efeito do exercício e suplementação com vitamina E (dl-α tocoferol) em leucócitos polimorfonucleares de eqüinos da raça Árabe.....	33
Resumo.....	34
1 Introdução.....	35
2 Material e métodos.....	36
3 Resultados.....	38
4 Discussão.....	41
5 Referências.....	43
 Capítulo V	
1 Considerações finais.....	46
2 Referências.....	46

SAITO, M. E. **Influência da suplementação com vitamina E (dl- α tocoferol) nas funções de monócitos e polimorfonucleares de eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício físico.** 2007. 72f. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

A alteração biológica mais evidente observada durante o exercício físico é o aumento da taxa metabólica, com elevada demanda de oxigênio, que pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) potencialmente danosas ao organismo, ocorrendo lipoperoxidação como consequência. Foi desenvolvido um método de isolamento simultâneo de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino, utilizando gradiente descontínuo de ficoll-hipaque $d=1,077$ e $d=1,119$. A separação de ambos os tipos celulares resultou em alto grau de pureza e viabilidade. Foram avaliadas funções de monócitos e polimorfonucleares em eqüinos da raça Árabe suplementados com vitamina E comparando-se com um grupo controle em duas provas de exercício progressivo em esteira de alta velocidade antes e depois de serem submetidos a um protocolo de treinamento. Os resultados indicam que o treinamento e a suplementação com vitamina E preservaram as funções dos monócitos eqüinos quanto à geração de anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ao mesmo tempo em que preveniram a produção exacerbada dessas substâncias. Enquanto as produções de H_2O_2 e O_2^- por polimorfonucleares pelo grupo de animais suplementados foram mais elevadas. Isso indica a exacerbação desta função dos polimorfonucleares dos eqüinos pela vitamina E antes e após a prova de exercício físico em esteira de alta velocidade. A vitamina E suplementar na dieta promoveu menor formação de malondialdeído (MDA), ou seja, ocorreu atenuação da lesão oxidativa.

Palavras-chave: Eqüino, Monócitos, Polimorfonucleares, Exercício, Estresse Oxidativo, Vitamina E.

SAITO, M. E. **Effects of exercise and vitamin E (dl- α tocopherol) supplementantation in Arabian horses peripheral blood monocytes and polymorphonuclear cells functions.** 2007. 72f. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ABSTRACT

The clearest biological alteration observed during physical exercise is the increase of metabolic rate, with a high oxygen demand. It can increase the reactive oxygen species (ROS) formation potentially harmful to the organism, occurring lipoperoxidation as a result. It was developed a method of simultaneous separation of peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells in horse utilizing discontinuous Ficoll-Hypaque gradients $d=1,077$ and $d=1,119$. Both cells types isolation resulted in high purity and viability degree. It was evaluated functions in monocytes and polymorphonuclear cells in Arabian horses supplemented with vitamin E by comparing a control group in two incremental treadmill exercises before and after been submitted to a training protocol. Results indicated that training and vitamin E supplementation preserved the monocyte functions regarding superoxide anion generation (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) at the same time that they prevented an excessive production of those substances. Whereas H_2O_2 e O_2^- productions by polymorphonuclear cells in supplemented animals group were higher. It indicates an exacerbation of that horse polymorphonuclear cells function by vitamin E before and after incremental treadmill exercises. Supplementary vitamin E in the diet promoted a lower malondialdeide (MDA) formation, namely occurred attenuation in oxidative stress.

Key-words: Horse, Monocytes, Polymorphonuclear Cells, Exercise, Oxidative Stress, Vitamin E.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O exercício físico é conhecido por diversos benefícios que proporciona ao organismo. Os antioxidantes aumentam com o exercício, porém, o incremento dessas defesas nem sempre é proporcional aos eventos pró-oxidantes, que dependem da duração e da intensidade do exercício, do programa de treinamento, idade, dieta e estado de saúde do animal (SACHECK et al. 2001). O aumento de estresse oxidativo provocado pelo exercício físico pode ser mais prejudicial que benéfico. Durante o exercício ocorre produção de ROS com envolvimento de uma série de mecanismos bioquímicos e fisiológicos, que são indicativos de estresse oxidativo (JI, 1995).

O sistema imune inato também pode ser afetado pelo estresse oxidativo provocado pelo exercício, sendo estimulado ou inibido, de acordo com a intensidade da atividade física (SUGIURA, et al., 2001). Os eqüinos são considerados atletas por definição e sofrem as conseqüências da elevação da demanda de oxigênio no organismo provocada pela elevação da taxa metabólica (POWERS e LENNON, 1999) e há uma grande preocupação quanto aos riscos de doenças infecciosas provocadas pela imunossupressão decorrentes do estresse oxidativo (AINSWORTH et al., 2003).

O malondialdeído (MDA) é o produto de lipoperoxidação mais estudado como marcador de lesão oxidativa durante o exercício e é aceito como índice de intensidade de lipoperoxidação (CHIARADIA, 1998; AVELLINI et al., 1999), pois há elevação de sua concentração durante o exercício em vários tecidos e a extensão da lipoperoxidação depende da intensidade do exercício (JI, 1995).

O treinamento físico regular e a suplementação com antioxidantes na dieta podem ser opções para diminuir os efeitos maléficos do exercício, devido à resposta adaptativa dos antioxidantes e mecanismos de reparo que resultam em menor acúmulo de lesões oxidativas (KANTER et al., 1993; AVELLINI et al., 1999; NAVARRO et al., 2004).

Apesar das inúmeras pesquisas realizadas sobre o efeito do exercício e suplementação com antioxidantes na dieta em eqüinos, ainda permanecem muitas dúvidas, principalmente a respeito da influência do estresse oxidativo sobre o sistema imune inato. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do exercício físico em eqüinos suplementados com vitamina E sobre

algumas funções pró-inflamatórias dos monócitos (Capítulo III) e a liberação de ROS por polimorfonucleares de sangue periférico (Capítulo IV).

Para que as células fossem analisadas de forma isolada, inicialmente foi necessária a padronização de uma técnica de isolamento de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino (Capítulo II).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Normalmente dois a 5% do oxigênio (O_2) consumido é transformada em espécies reativas de oxigênio (ROS). Durante o exercício o consumo de O_2 aumenta imensamente, cerca de 10 a 15 vezes a mais que o repouso, sendo que o requerimento de O_2 pelo músculo esquelético pode aumentar em mais de 100 vezes. Sendo inevitável o aumento da produção ROS, e se a mesma porcentagem destes reativos for produzido, o exercício pode elevar muito a quantidade de ROS no organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As ROS são importantes no mecanismo de lesão celular, e podem ser liberados no meio extracelular por leucócitos após a exposição a agentes quimiotáticos, imunocomplexos, citocinas ou durante o metabolismo oxidativo de fagócitos. Este metabolismo é uma importante medida de ativação dos fagócitos durante a fase efetora das repostas imunes, e este processo está altamente relacionado à exposição dessas células a vários microrganismos, com concomitante aumento da atividade microbida (ROSEN et al., 1995).

Em condições fisiológicas o organismo possui reservas antioxidantes adequadas para conter a produção de ROS, pois a sua produção é um processo intrínseco da vida de organismos aeróbicos (JI, 1995). Quando os sistemas antioxidantes não são suficientes para uma defesa eficaz aumenta a vulnerabilidade dos tecidos e componentes celulares às ROS e ocorre o chamado estresse oxidativo, que pode atingir grandes proporções danificando as estruturas celulares do organismo (CHIARADIA et al., 1998; POWERS e LENNON, 1999).

O exercício físico foi associado a alterações nas funções imunes em humanos, roedores e eqüinos (ROWBOTTOM e GREEN, 2000; RAIDAL et al., 2000; SUGIURA et al., 2001; AINSWORTH et al., 2003). Exercícios regulares e moderados estimulam alguns aspectos da resposta imune, como o aumento da

atividade fagocítica e da explosão oxidativa dos neutrófilos em eqüinos atletas como efeito benéfico do exercício moderado (PYNE, 1994), enquanto exercícios intensos podem provocar imunossupressão e aumentar os riscos de doenças infecciosas (SUGIURA, et al., 2001).

A atividade física intensa pode aumentar a formação intracelular de ROS e promover o estresse oxidativo, devido à elevação da atividade metabólica celular. A dimensão do estresse oxidativo está relacionada à intensidade e duração do exercício (SOUZA JÚNIOR et al., 2005).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da lipoperoxidação. Os lipoperoxídeos formados podem acumular em órgãos ou tecidos produzindo redução irreversível da fluidez da membrana, aumentando a permeabilidade e resultando em perda de sua integridade e ruptura da célula (DE MOFFARTS et al., 2006). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O treinamento físico regular pode diminuir a incidência de certas neoplasias, apesar da possibilidade de maior formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, devido à resposta adaptativa dos antioxidantes e mecanismos de reparo que resultam em menor acúmulo de lesões oxidativas do DNA e reduzem a vulnerabilidade das proteínas às lesões oxidativas (RADÁK et al., 2002).

Os antioxidantes preservam a homeostasia das células ao repouso e exercícios leves, porém, quando a produção de ROS é excessiva ou a defesa antioxidante não é adequada, como durante exercício aeróbico prolongado ou quando o sistema antioxidante está comprometido, ocorre lesão oxidativa celular e tecidual (PHUNG et al., 1994; JI, 1995; CHIARADIA et al., 1998; AVELLINI, et al., 1999; CHOW, 1991), podendo estar envolvido na patogênese das miopatias e hemólises induzidas pelo exercício em eqüinos (CHIARADIA, 1998).

Devido ao consumo de antioxidantes durante o exercício extenuante e treinamento crônico, a suplementação de antioxidantes na dieta pode ser benéfico (JI, 1995). A suplementação diária de vitamina E reduz

significativamente a quantidade de MDA sérico, antes e após exercício moderado e intenso (KANTER et al., 1993; AVELLINI et al., 1999).

Artigo: Separação simultânea de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino

A ser encaminhado para o periódico Veterinary Clinical Pathology

ISSN: 0275-6382

Normas para publicação disponível em:

<http://www.vetclinpathjournal.org/authorinfo.html>

Separação simultânea de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino

RESUMO

O método de separação simultânea de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino foi desenvolvido para estudos comparativos e de função em processos fisiológicos e patológicos. Utilizou-se gradiente descontínuo de ficoll-hipaque nas densidades de 1,119 e 1,077. Após centrifugação com suspensão celular de leucócitos em plasma autólogo, a viabilidade obtida foi maior que 95%, com 98,9% de células mononucleares contra 1,1% de polimorfonucleares na interface entre o plasma e o ficoll-hipaque $d=1,077$ e 97% de polimorfonucleares e 3% de mononucleares na interface entre o ficoll-hipaque de $d=1,119$ e $d=1,077$. Esta técnica permite trabalhar com estes tipos celulares de forma isolada, pois os leucócitos mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino utilizando gradiente descontínuo de histopaque com densidades de 1,077 e 1,119 foram isolados com alto grau de pureza e viabilidade.

Palavras-chave: Eqüino, Mononucleares, Polimorfonucleares, Sangue Periférico, Separação simultânea.

1 INTRODUÇÃO

As investigações sobre as propriedades e mecanismos das células em processos fisiológicos e patológicos freqüentemente necessitam de populações isoladas. Há diversas metodologias descritas para este fim, como sedimentação por gravidade, centrifugação com gradientes de densidade contínuos e descontínuos, flotação, citometria de fluxo, aderência em plástico ou vidro, ou a combinação de técnicas (WEISS et al., 1989).

O emprego de gradiente de densidade descontínuo de Percoll para isolamento simultâneo de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino foi descrito anteriormente (WEISS et al., 1989), entretanto, esta técnica necessita de adequação ao ambiente de trabalho e manipulação de reagentes (MAY et al., 1991), o que demanda tempo e possibilita muitos erros. Em outros procedimentos são necessárias várias etapas, que incluem a sedimentação prévia com dextran, centrifugação com gradiente de densidade e lise de eritrócitos com soluções hipotônicas (BOYUM, 1968; SEETHANATHAN et al., 1990; FOSTER et al., 1992; ALMEIDA et al., 2000).

Metodologias que utilizam apenas o gradiente de ficoll-hipaque $d=1,077$ resulta em populações de células mononucleares com elevado grau de pureza e contaminação mínima com eritrócitos, entretanto, é necessária uma etapa adicional para a obtenção de células polimorfonucleares, que consiste na recuperação deste tipo celular da camada de eritrócitos sedimentados e remoção por hemólise (WEISS et al., 1989).

Desta forma apresentamos uma técnica para separação de células de sangue periférico eqüino, que possibilitou o isolamento concomitante de células mononucleares e polimorfonucleares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de 20 a 30mL de sangue obtidas da veia jugular de 15 eqüinos clinicamente sadios, machos e fêmeas, com idade variando de 3,5 a 10 anos de idade foram obtidas em tubos a vácuo contendo heparina (Vacutainer-Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e centrifugadas por 10 minutos a 500g para obtenção de papa de leucócitos e suspensão em plasma autólogo.

Foi preparado um gradiente descontínuo de ficoll-hipaque (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) nas densidades de 1,077 e 1,119 em tubos cônicos de polipropileno de 15mL dispostos da seguinte forma: 2,5mL de ficoll-hipaque $d=1,077$ colocados vagarosamente sobre 2,5mL de ficoll-hipaque $d=1,119$, ambas as soluções eram mantidas a 4°C somente antes do uso.

Sobre este gradiente acrescentou-se 10mL de suspensão celular de leucócitos em plasma autólogo, e submetido à centrifugação por 30 minutos a 500g em temperatura ambiente, sem aplicação de freio ao final do processo. Após esta etapa obtiveram-se duas porções em forma de halo, a primeira entre o ficoll-hipaque de $d=1,077$ e o plasma e a segunda entre o ficoll-hipaque de menor densidade e o de $d=1,119$.

As duas porções foram recuperadas separadamente e submetidas a duas lavagens com meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) por 10 minutos de centrifugação a 150g para remoção dos gradientes de densidade e plaquetas e suspensas em RPMI 1640. A viabilidade das células foi verificada pelo método de exclusão com Azul Tripán 0,2% (Merck, Darmstadt, Germany) com auxílio de câmara hemocitométrica de Neubauer e a identificação dos tipos celulares por observação em microscopia óptica de lâminas preparadas por citocentrifugação e coradas com May-Grünwald-Giemsa (Merck).

Todo o procedimento foi realizado em no máximo três horas após a colheita das amostras.

3 RESULTADOS

Após a centrifugação dos gradientes de densidade ficoll-hipaque com os leucócitos diluídos em plasma, foi obtida a seguinte conformação: uma camada de eritrócitos no fundo do tubo cônico, seguido do gradiente $d=1,119$, um halo contendo células polimorfonucleares, o gradiente $d=1,077$, um halo com células mononucleares e o plasma autólogo.

Esta técnica possibilitou o isolamento de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico equino com alto grau de pureza e viabilidade. A interface entre o ficoll-hipaque de $d=1,077$ e o plasma continha 98,9% de células mononucleares contra 1,1% de polimorfonucleares (Figura 1A) e na interface entre o ficoll-hipaque de $d=1,119$ e $d=1,077$ foram

encontrados 97% de polimorfonucleares e 3% de mononucleares (Figura 1B). A viabilidade das células isoladas foi maior que 95% (Tabela 1).

TABELA 1 Dados (n=15, média±desvio padrão) de duas interfaces de células mononucleares e polimorfonucleares isoladas de sangue periférico eqüino em gradiente descontínuo de ficoll-hipaque d=1,077 e d=1,119

	Interface entre plasma e ficoll-hipaque d=1,077 (mononucleares)	Interface entre ficoll-hipaque d=1,077 e d=1,119 (polimorfonucleares)
Pureza (%)	98,9±1,1	97,0±0,8
Viabilidade (%)	>96,0	>95,0
Neutrófilos (%)	1,1±1,0	96,6 ±0,8
Eosinófilos (%)	0,1±0,1	0,3±0,5
Basófilos (%)	0,0±0,0	0,1±0,3
Monócitos (%)	44,3±24,2	1,0±0,0
Linfócitos (%)	54,6±24,3	2,0±0,8

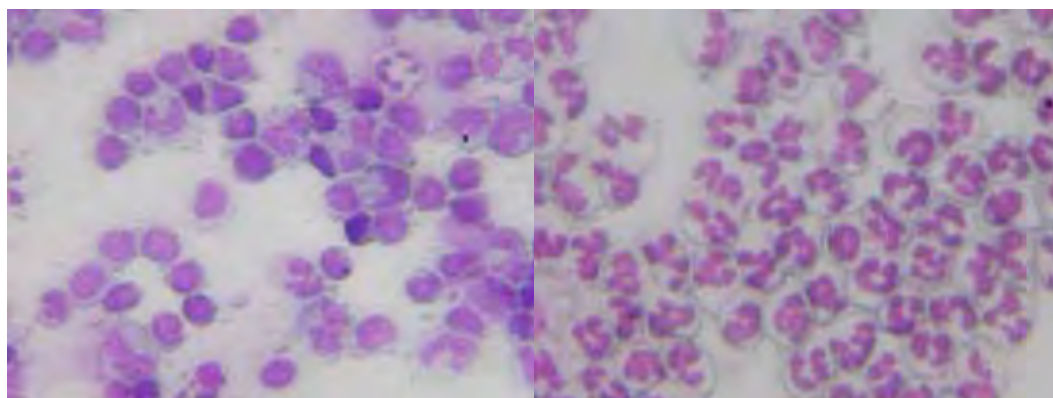


FIGURA 1 Separação de células mono e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino com gradiente descontínuo de ficoll-hipaque. **(A)** interface entre ficoll-hipaque d=1,077 e plasma autólogo e **(B)** interface entre ficoll-hipaque d=1,077 e ficoll-hipaque d=1,119.

A quantidade de eritrócitos não foi mensurada, porém, ao analisar as lâminas preparadas a partir da suspensão celular dos isolados de mononucleares e polimorfonucleares de ambas as porções, a contaminação por este tipo celular foi mínima.

4 DISCUSSÃO

Esta técnica é simples e rápida e não requer procedimentos como o preparo de reagentes (PICOCK et al., 1987; WEISS et al., 1989, MAY et al.,

1991), sedimentação por gravidade (BOYUM, 1968; ALMEIDA et al., 2000), lise de eritrócitos por soluções hipotônicas (SEETHANATHAN et al., 1990; FOSTER et al., 1992) e nem mesmo reagentes e equipamentos muito onerosos como os utilizados para separação com anticorpos marcados magneticamente (JOUBERT et al., 2001). Muitas destas técnicas requerem várias etapas para a separação de células mononucleares e polimorfonucleares, e estas manobras podem culminar com a diminuição da viabilidade e afetar as funções das células, principalmente das polimorfonucleares.

Gradientes de Percoll foram utilizados para separação de células de sangue periférico eqüino, entretanto, há grande variação na concentração deste composto entre diversos estudos (WEISS et al., 1989; MAY et al., 1991; FOSTER et al., 1992; DAGLEISH et al., 1999; BENBAREK et al., 1999). Uma das possibilidades dessa diversidade é a interferência da temperatura, sendo recomendado o ajuste para cada local de trabalho (MAY et al., 1991). Apesar de não ter sido analisada a influência da temperatura ambiente, é recomendável que esteja entre 25 e 30°C, pois este trabalho foi realizado sob estas condições térmicas sem prejuízo na viabilidade das células, sem necessidade de adequações nas densidades dos gradientes de ficoll-hipaque utilizados.

Strasser et al. (1998) descreveram uma técnica semelhante para separação de células caninas, distinto em alguns pontos como a temperatura dos gradientes de densidade e a força de centrifugação. Era imprescindível que os gradientes de densidade estivessem a 4°C, ao contrário do presente experimento, que foi utilizada temperatura ambiente, exceto para armazenamento. Não houve separação adequada das células mono e polimorfonucleares com a força de centrifugação de 340g, necessitando de solução de lise para remover os eritrócitos contaminantes, ao contrário do presente experimento, no qual foi aplicado 500g para centrifugar os gradientes de densidade com a suspensão de leucócitos. É possível que os resultados sejam diferentes por não se tratar da mesma espécie, provavelmente seja pela diferença de densidade das células (WEISS et al., 1989).

Não foi observado problema com formação de fibrina ou coágulos utilizando heparina como anticoagulante, não sendo necessário acrescentar

nenhuma solução contendo EDTA como no método descrito por Weiss et al. (1989).

Para remover as plaquetas seria necessária uma força de centrifugação por volta de 100g, entretanto, pode implicar em perda de células (ALMEIDA et al., 2000). Desta forma foi utilizada força de centrifugação de 150g, o que não eliminou totalmente as plaquetas da porção rica em células mononucleares.

A técnica descrita proporcionou um método rápido, simples para separar células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico eqüino de maneira concomitante, e facilmente adaptável para utilização em pesquisas ou terapias que necessitem destes tipos celulares isolados e viáveis.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.C.; SILVA, A.C.; BARRAL, A.; BARRAL NETO, M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p; 221-223, 2000.
- BENBAREK, H.; MOUITHYS-MICKLAD, A.; DEBY-DUPONT, G.; GRÜLKE, S.; NEMMAR, A.; LAMY, M.; SERTEYN, D. High concentrations of histamine stimulate equine polymorphonuclear neutrophils to produce reactive oxygen species. **Inflamm. Res.**, v. 48, p. 594-601, 1999.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** v. Suplem. 97, p. 77-89, 1968.
- DAGLEISH, M.P.; PEMBERTON, A.D.; BRAZIL, T.J.; MCALEESE, S.M.; MILLER, H.R.P.; SCUDAMORE, C.L. Kinetics of equine neutrophil elastase release and superoxide anion generation following secretagogue activation: a potential mechanism for antiproteinase inactivation. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 72, p. 257-275, 1999.
- FOSTER, A.P.; LEES, P.; CUNNINGHAM, F.M. Platelet activating factor is a mediator of equine neutrophil and eosinophil migration in vitro. **Res. Vet. Sci**, v. 53, p. 223-229, 1992.
- JOUBERT, P.; SILVERSIDES, D.W.; LAVOIE, J.P. Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, macrophage-

inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon- γ . **Equine Vet. J.**, v. 33, p. 730-733, 2001.

MAY, S.A.; HOOKE, R.E.; LEES, P. Isolation of equine peripheral blood mononuclear cells using Percoll. **Res Vet Sci.**, v. 50, p. 116-117, 1991.

PICOCK, J.F.; ALLEN, E.; MORRIS, T.H. Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous Percoll density gradient. **Res. Vet. Science**, v. 42, p; 411-412, 1987.

SEETHANATHAN, P.; BOTTOMS, G.D.; SCHAFER, K. Characterization of release of tumor necrosis factor, interleukin-1, and superoxide anion from equine white blood cells in response to endotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 1221-1225, 1990.

STRASSER, A.; KALMAR, E.; NIEDERMÜLLER, H. A simple method for the simultaneous separation of peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells in the dog. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 62, p. 29-35, 1998.

WEISS, D.J.; KRAEMER, R.; SCHMIT, K. Isolation of granulocytes and mononuclear cells from the blood of dogs, horses and cattle. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 18, p. 33-36, 1989.

Artigo: Influência da suplementação de vitamina E (dl- α tocoferol) nas funções de monócitos de eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício

A ser encaminhado para o periódico Veterinary Immunology and Immunopathology

ISSN: 0165-2427

Normas para publicação disponível em:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503319/authorinstructions

Influência da suplementação de vitamina E (dl- α tocoferol) nas funções de monócitos de eqüinos da raça Árabe submetidos ao exercício

RESUMO

A alteração biológica mais evidente observada durante o exercício é o aumento da taxa metabólica, com elevada demanda de oxigênio, que pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio potencialmente danosas ao organismo, ocorrendo lipoperoxidação como conseqüência. Um grupo de eqüinos da raça Árabe suplementado com vitamina E foi comparado com um grupo controle em duas provas de exercício progressivo em esteira de alta velocidade antes e depois de serem submetidos a um protocolo de treinamento. Os animais suplementados apresentaram valores menores de H_2O_2 produzidos por monócitos no teste não estimulado e estimulado por "Phorbol Myristate Acetate" (PMA) na maioria dos momentos antes do treinamento, evidenciando a eficácia da suplementação vitamina E e do treinamento dos eqüinos no aumento de antioxidantes no organismo. Na maioria dos momentos os resultados de liberação de O_2^- no teste não estimulado por PMA foram detectáveis, porém baixos. No teste estimulado os resultados foram menores no grupo suplementado antes e após as provas de exercício. A produção de NO pelos monócitos foi maior, com maior estabilidade no grupo suplementado. A menor produção de TNF- α quando estimulados por lipopolisacarídeo (LPS) em cultura de monócitos foi no grupo suplementado com vitamina E em ambas as provas de exercício. Os resultados indicam que o treinamento e a suplementação com vitamina E preservaram as funções dos monócitos eqüinos quanto à geração de O_2^- , H_2O_2 , NO e TNF- α , ao mesmo tempo em que preveniu a produção exagerada destas substâncias e promoveu menor lesão oxidativa nos animais suplementados, indicada pela menor formação de MDA sérica. Demonstrando a relevância da suplementação com a vitamina E para aumentar as defesas antioxidantes do organismo.

Palavras-chave: eqüino, vitamina E, monócitos, exercício, estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

O exercício físico foi associado a alterações nas funções imunes em humanos, roedores e eqüinos (ROWBOTTOM e GREEN, 2000; RAIDAL et al., 2000; SUGIURA et al., 2001; AINSWORTH et al., 2003). Exercícios regulares e moderados estimulam alguns aspectos da resposta imune, enquanto exercícios intensos podem provocar imunossupressão e aumentar os riscos de doenças infecciosas (SUGIURA, et al., 2001).

A alteração biológica mais evidente observada durante o exercício é o aumento da taxa metabólica, com elevada demanda de oxigênio (POWERS e LENNON, 1999). A maioria do oxigênio é utilizada na mitocôndria para geração de energia. Entretanto, dois a 5% são convertidos a vários intermediários de oxigênio, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila ($HOO^{\bullet}$), hidroxila ($^{\bullet}OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), classificados como Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em condições fisiológicas o organismo possui reservas antioxidantes adequadas para conter a produção de ROS, pois a sua produção é um processo intrínseco da vida de organismos aeróbicos (JI, 1995). Quando os sistemas antioxidantes não são suficientes para uma defesa eficaz aumenta a vulnerabilidade dos tecidos e componentes celulares às ROS e ocorre o chamado estresse oxidativo, que pode atingir grandes proporções danificando as estruturas celulares do organismo (CHIARADIA et al., 1998; POWERS e LENNON, 1999).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são importantes no mecanismo de lesão celular, e podem ser liberados no meio extracelular por leucócitos após a exposição a agentes quimiotáticos, imunocomplexos, citocinas ou durante o metabolismo oxidativo de fagócitos. Este metabolismo é uma importante medida de ativação dos fagócitos durante a fase efetora das repostas imunes, e este processo está altamente relacionado à exposição dessas células a vários microrganismos, com concomitante aumento da atividade microbida (ROSEN et al., 1995).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). A c-NOS é dependente de íons cálcio e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a i-NOS é produzida por macrófagos e

outras células ativadas por citocinas. Em processos infecciosos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais são ativados e secretam simultaneamente NO e ROS, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio (DUSSE et al., 2003).

Quando mediadores inflamatórios, como as ROS, NO e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são produzidos em grandes quantidades, podem provocar danos teciduais associados a lesões inflamatórias e isquêmicas (KIM et al., 1996).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da lipoperoxidação. Os lipoperóxidos formados podem se acumular em órgãos ou tecidos produzindo redução irreversível da fluidez da membrana, aumentando a permeabilidade e resultando em perda de sua integridade e ruptura da célula (DE MOFFARTS et al., 2006). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A atividade física intensa pode aumentar a formação intracelular de ROS e promover o estresse oxidativo, devido à elevação da atividade metabólica celular. A dimensão do estresse oxidativo está relacionada à intensidade e duração do exercício (SOUZA JÚNIOR et al., 2005).

Aparentemente o exercício moderado pode melhorar a longevidade provavelmente por diminuir o estresse oxidativo celular e pela prevenção da diminuição das funções mitocondriais que acompanham a redução das funções fisiológicas associadas à idade (NAVARRO et al., 2004).

O treinamento físico regular pode diminuir a incidência de certas neoplasias, apesar da possibilidade de maior formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, devido à resposta adaptativa dos antioxidantes e mecanismos de reparo que resultam em menor acúmulo de lesões oxidativas do DNA e reduzem a vulnerabilidade das proteínas às lesões oxidativas (RADÁK et al., 2002).

Deficiência de nutrientes antioxidantes podem comprometer seriamente o sistema antioxidante e exacerbar o estresse oxidativo e lesão tecidual induzidos pelo exercício (JI, 1995). A suplementação diária de vitamina E reduz

significativamente a quantidade de MDA sérico, antes e após exercício moderado e intenso (KANTER et al., 1993; AVELLINI et al., 1999). Há quantidades proporcionais de vitamina E no plasma e nos monócitos de indivíduos suplementados (DEVARAJ, et al., 1996).

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do exercício físico na geração de lesão oxidativa por espécies reativas de oxigênio em eqüinos suplementados com vitamina E e a influência sobre algumas funções pró-inflamatórias dos monócitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados dez eqüinos da raça Árabe, três machos castrados e sete fêmeas, com idade variando de 4,5 a 7 anos e peso médio de 383kg, sedentários e clinicamente sadios, selecionados mediante exame hematológico, bioquímica clínica, videoendoscopia do aparelho respiratório anterior com o animal em repouso e laringoscopia com o animal em movimento e avaliação cinemática do aparelho locomotor.

O manejo nutricional consistiu de ração comercial (Proequi-Guabi, Mogiana Alimentos, São Paulo, Brasil), feno de capim Coast-Cross (*Cynodon dactylon*), suplemento mineral (Sal mineral Centauro, Moagiana Alimentos), conforme recomendações de Lewis (2000) e água *ad libitum*.

Os animais foram igualmente distribuídos nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE). A suplementação com 1000 UI/animal/dia de Acetato de dl- α -tocoferol (E-Tabs, Sigma Pharma, Hortolândia, SP, Brasil) via oral para o grupo GE foi realizado 15 dias antes da primeira prova de exercício, diariamente e interrompido somente no final do experimento.

Foram realizadas duas provas de exercício progressivo, denominadas de P1 (antes do treinamento) e P2 (após o treinamento), as quais consistiram no uso da esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) inclinada a +7% e velocidade de 1,8m/s por 5min, seguindo a 4,0m/s por 3min, 6,0m/s por 2min e posteriormente 8,0m/s, 9,0m/s e 10,0m/s por 1min em cada velocidade, ou até quando o animal não mais conseguisse manter-se em galope, mesmo sendo estimulado. Os animais foram mantidos em repouso e acompanhados

até 120h após o término do exercício.

Entre P1 e P2 houve intervalo de 30 dias, em que os animais foram submetidos a um período de treinamento, realizado uma vez ao dia, seis vezes por semana com um dia de descanso até completarem 20 dias. O protocolo de treinamento adotado foi de 5min a 1,8m/s, 3min a 4,0m/s, 2min a 6,2m/s, 1min a 8,0m/s e 1min a 10,0m/s, seguidos de um período de desaquecimento a 3m/s por 2min e a 1,6m/s por 2min. Os animais descansaram por 48h antes de realizarem a segunda prova de exercício.

Amostras de sangue foram colhidas por venipunção jugular em tubos a vácuo heparinizados (Vacutainer-Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) para isolamento de monócitos e em tubos com gel ativador da coagulação (Vacutainer-Becton Dickinson) para obtenção de soro, antes do início do exercício e 30 minutos, 24, 48, 72 e 120 horas após o exercício em ambas as provas.

2.2 Isolamento de monócitos

Foram utilizadas amostras de 60mL de sangue periférico para o isolamento de células mononucleares, segundo a técnica descrita por Saito et al. (2006), pela utilização de um gradiente descontínuo de densidade de ficoll-hipaque d=1,077 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e d=1,119 (Sigma).

A porção rica em mononucleares da interface entre o plasma e o ficoll-hipaque d=1,077 foi recuperada e submetida a duas lavagens sucessivas por meio de centrifugação com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), por 10 min a 150 g cada. A viabilidade das células foi verificada pelo método de exclusão com Azul Tripan 0,2% (Merck) e a identificação dos monócitos foi realizada pela incorporação do corante Vermelho Neutro 0,02% (Sigma), em câmara hemocitométrica. A suspensão celular em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 2 mM de L-Glutamina (Sigma) e 10% de soro bovino fetal (Gibco) inativado, foi distribuída em placas de cultura com fundo plano e após duas horas de incubação a 37°C em estufa umidificada e tensão constante de 5% de CO₂. As células não aderentes foram eliminadas pela lavagem dos orifícios das placas com meio RPMI 1640.

2.3 Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por monócitos

Utilizou-se a técnica descrita por Pick e Mizel (1981) modificada, baseada na oxidação de vermelho fenol (Sigma) na presença de peroxidase Horseradish tipo II (Sigma) com e sem estimulante "Phorbol Myristate Acetate" (PMA) (Sigma) na concentração de 60ng/alvéolo. Foram isolados 2×10^5 monócitos/alvéolo em placas de cultura de 96 alvéolos (Nunc, Roskilde, Denmark), e o resultado expresso em nM de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, tendo como referência uma curva padrão com diluições seriadas de peróxido de hidrogênio (Sigma). As dosagens e a curva padrão foram realizadas em quadruplicata.

2.4 Liberação de ânion superóxido (O_2^-) por monócitos

A mensuração da produção de O_2^- por monócitos eqüinos foi realizada pela redução de Ferricitocromo c, segundo técnica descrita por Pick e Mizel (1981) modificada. Monócitos isolados (2×10^5 /alvéolo) em placas de cultura, em quadruplicata, foram acrescentados de um reagente contendo 160 μ M de Citocromo C parcialmente acetilado (Sigma) diluído em solução de Hanks, com e sem PMA (Sigma) como estimulante na concentração de 40ng/alvéolo.

A densidade óptica dos sobrenadantes foi mensurada por espectrofotometria a 550nm após 60 min de incubação a 37°C em estufa umidificada e tensão constante de 5% de CO_2 . A quantidade de O_2^- produzido por alvéolo foi calculada pela fórmula $O_2^- = (\text{absorbância a 550nm} \times 100)/6,3$.

2.5 Óxido nítrico (NO) liberados por monócitos

Foram gerados sobrenadantes de cultura de monócitos eqüinos na concentração de 2×10^5 monócitos/alvéolo incubados por 18 horas a 37°C em estufa umidificada e tensão constante de 5% de CO_2 .

A concentração de nitrito nos sobrenadantes de cultura celular reflete a produção de óxido nítrico celular, que foi determinada segundo a reação de Griess, como descrito por Hawkins et al. (1998). Para tanto, volumes iguais (100 μ L) de sobrenadante e reagente de Griess foram colocados em placas de 96 alvéolos à temperatura ambiente por 10 min e mensurados por leitura em leitor de placas a 550nm. A concentração de nitrito foi determinada por referência a uma curva padrão criada por diluição seriada na razão dois de nitrito de sódio (200mM a 1,58mM).

2.6 TNF- α em sobrenadante de cultura de monócitos

Foram gerados sobrenadantes de cultura de monócitos na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de cultura de 24 alvéolos com fundo plano (Nunc) incubados a 37°C em estufa umidificada e tensão constante de 5% de CO₂ por 18 horas com e sem estímulo por lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma). Após este período o sobrenadante foi aliquotado e armazenado a -80°C até o momento da mensuração.

A dosagem de TNF- α foi realizada por meio de um ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), com um kit comercial (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), segundo as instruções técnicas fornecidas pelo fabricante.

2.7 Vitamina E sérica e Malondialdeído Sérico (MDA)

As amostras de soro foram protegidas da luz e armazenadas à -80°C. As dosagens de vitamina E de acordo com a metodologia descrita por Arnaud et al. (1991) e MDA sérico pela metodologia descrita por Karatas et al. (2002) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão), em fluoroscopia.

2.8 Análise estatística

Para variáveis avaliadas nos dois grupos, cuja tendência central foi representada pela mediana, foi efetuado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos, em cada momento e prova. Para comparar os momentos dentro de cada grupo foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman (CURI, 1998). Em todas as análises, as estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Vitamina E Sérica

Os valores de vitamina E foram sempre superiores no grupo suplementado, sendo maiores na segunda prova de exercício.

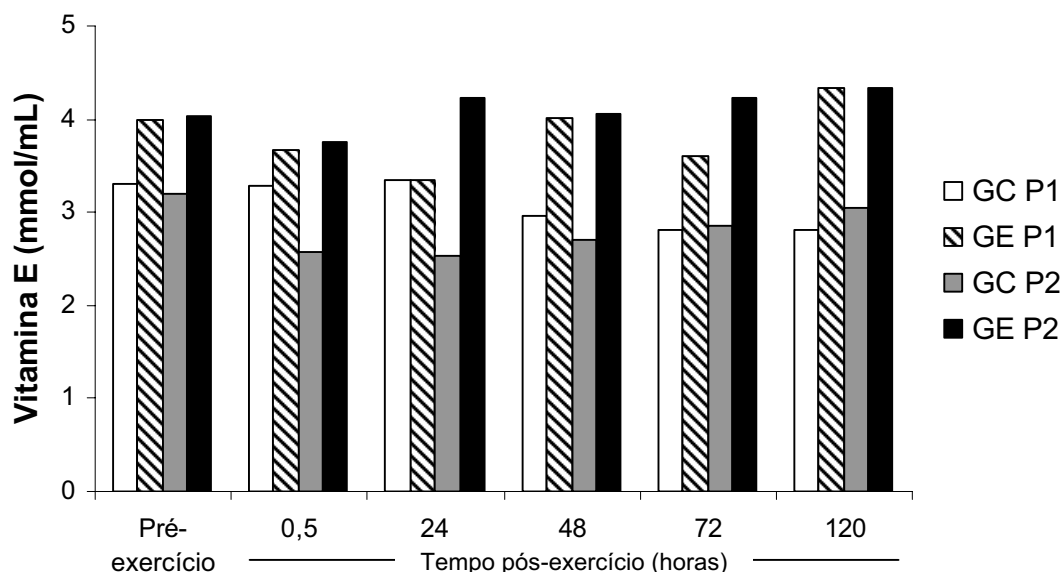


FIGURA 1 Medianas da concentração sérica de vitamina E (dl- α -tocoferol) de eqüinos da raça Árabe, nas provas P1 (antes do treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE).

3.2 Malondialdeído Sérico (MDA)

Apesar de não observar diferença significativa, nota-se que no grupo controle há discreto aumento de MDA antes do treinamento aos 30min após as provas de exercício e redução dos valores em 24h depois (Figura 2). Ocorreu diferença estatística entre os momentos somente no grupo controle na P2, em que aos 30min após o exercício foi significativamente ($p < 0,05$) maior que antes do exercício, 24h e 48h pós-exercício.

Na análise entre os grupos controle e suplementado houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente ao repouso antes de serem submetidos ao treinamento, mas nitidamente os valores de MDA do grupo controle foram superiores em todos os momentos.

Ao confrontar as provas de exercício progressivo não houve diferença entre P1 e P2, com resultados semelhantes antes e após o treinamento.

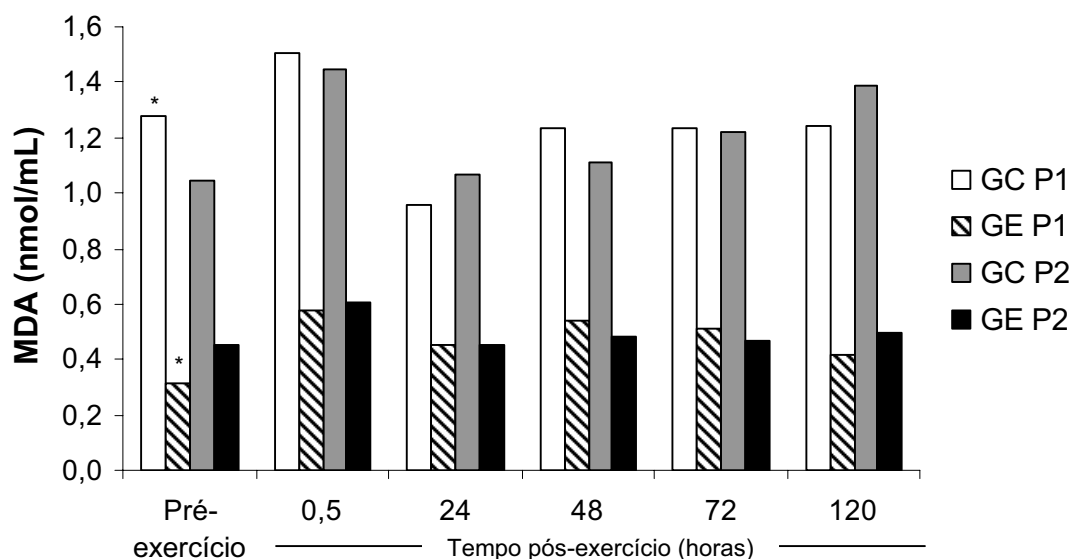


FIGURA 2 Medianas da concentração sérica de malondialdeído (MDA) de eqüinos da raça Árabe, nas provas P1 (antes do treinamento) e P2 (pós-treinamento) de exercício progressivo em esteira nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE). *Difere entre grupos na mesma prova ($p<0,05$).

3.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Os valores foram baixos ou não detectáveis em todos os momentos do teste não estimulado (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre momentos em nenhum dos grupos, porém, a produção aumentou em 48h e 72h após P1 no grupo controle e em 24h após a P2 no grupo suplementado. Analisando-se a influência da suplementação ocorreu diferença significativa ($p<0,05$) somente 48h pós-exercício na P1, com valor superior para o grupo controle. No teste estimulado por PMA, a produção de H_2O_2 aumentou 48h após a P1 no grupo controle, com tendência a ser maior em todos os grupos neste momento. A diferença não foi significativa entre os momentos de nenhum dos grupos.

Comparando-se os grupos a liberação H_2O_2 foi superior no grupo controle em todos os momentos antes e após a P1 e P2, com diferença estatística ($p<0,05$) somente em 48h após P1. Na P2 ambos os grupos tiveram valores muito semelhantes.

Analisando o efeito do treinamento, o grupo controle apresentou valores maiores na P1 que na P2 em todos os momentos. Ao contrário do grupo suplementado em que os valores foram um pouco menores na P1, porém,

muito semelhantes (não houve diferença estatística entre as provas em nenhum dos grupos).

3.4 Ânion superóxido (O_2^-)

A produção de O_2^- por monócitos eqüinos não estimulados com PMA foi baixa em todos os momentos de ambos os grupos e provas de exercício (Tabela 1). Os valores do teste estimulado com PMA no grupo suplementado com vitamina E foram menores em ambas as provas. Analisando a variação entre as provas, o grupo controle apresentou maior liberação na P1 e o grupo suplementado na P2, após o período de treinamento físico.

TABELA 1 Medianas e percentis ($P_{25};P_{75}$) da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e anion superóxido (O_2^-) por monócitos isolados de eqüinos da raça Árabe, antes e após exercício progressivo em esteira pelos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE) nos testes com e sem estímulo por PMA.

			Pré-exercício	Pós-exercício (horas)					
				0,5	24	48	72	120	
H_2O_2 (nM /2x10 ⁵)	Sem PMA	P1	GC	0,00 (0,00; 0,01)	0,00 (0,00; 0,17)	0,00 (0,00; 0,00)	0,38 (0,25; 0,70)	0,18 (0,00; 0,74)	0,00 (0,00; 0,54)
			GE	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00* (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,24)	0,00 (0,00; 0,11)
		P2	GC	0,00 (0,00; 0,07)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,01 (0,00; 0,06)
			GE	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,21 (0,00; 0,27)	0,00 (0,00; 0,05)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,01)
	Com PMA	P1	GC	1,66 (0,40; 2,10)	2,57 (0,68; 2,99)	1,05 (0,46; 2,45)	5,99 (1,40; 7,27)	2,84 (2,06; 2,84)	1,65 (0,93; 2,41)
			GE	0,65 (0,00; 0,84)	0,32 (0,00; 2,04)	0,21 (0,02; 0,98)	0,93* (0,35; 1,36)	0,56 (0,38; 0,77)	0,67 (0,14; 0,96)
		P2	GC	1,10 (0,84; 1,91)	0,66 (0,60; 2,27)	0,67 (0,67; 2,72)	1,75 (0,88; 2,19)	0,45 (0,29; 0,87)	0,99 (0,00; 1,53)
			GE	1,27 (1,17; 1,62)	1,61 (1,16; 3,25)	1,51 (0,96; 4,24)	1,54 (1,37; 2,02)	0,91 (0,90; 1,18)	0,75 (0,27; 1,25)
O_2^- (nM /2x10 ⁵)	Sem PMA	P1	GC	0,05 (0,02; 0,12)	0,11 (0,01; 0,13)	0,07 (0,06; 0,08)	0,15 (0,14; 0,30)	0,18 (0,08; 0,29)	0,09 (0,08; 0,33)
			GE	0,22 (0,12; 0,40)	0,13 (0,06; 0,20)	0,04 (0,02; 0,07)	0,30 (0,00; 0,31)	0,00 (0,00; 0,03)	0,00 (0,00; 0,00)
		P2	GC	0,22 (0,12; 0,27)	0,11 (0,06; 0,14)	0,13 (0,09; 0,40)	0,13 (0,08; 0,68)	0,14 (0,00; 0,22)	0,00 (0,00; 0,06)
			GE	0,00 (0,00; 0,05)	0,00 (0,00; 0,03)	0,01 (0,00; 0,23)	0,01 (0,00; 0,02)	0,02 (0,00; 0,50)	0,14 (0,06; 0,21)
	Com PMA	P1	GC	1,03 (0,58; 1,25)	0,91 (0,68; 0,92)	0,64 (0,48; 0,71)	0,69 (0,62; 0,74)	0,60 (0,59; 0,64)	0,89 (0,85; 0,93)
			GE	0,12 (0,01; 0,46)	0,03 (0,02; 0,37)	0,02 (0,00; 0,96)	0,21 (0,04; 0,44)	0,10 (0,00; 0,10)	0,02 (0,00; 0,04)
		P2	GC	0,69 (0,60; 0,83)	0,85 (0,64; 0,91)	0,60 (0,20; 0,79)	0,82 (0,71; 0,88)	0,52 (0,46; 0,81)	0,61 (0,09; 0,84)
			GE	0,27 (0,00; 0,81)	0,25 (0,00; 0,44)	0,41 (0,17; 0,81)	0,24 (0,05; 0,42)	0,51 (0,25; 0,79)	0,21 (0,15; 0,30)

*difere no mesmo momento do grupo controle

3.5 Óxido nítrico (NO)

Não houve diferença estatística entre momentos, grupos ou provas (Tabela 2). Comparando-se a diferença da produção de NO entre os momentos, no grupo controle diminuiu em 24h pós-exercício na P1. Este mesmo grupo na P2 apresentou elevação no momento 24h com pico de produção em 48h e redução em 72h, mantendo a mesma concentração em 120h. O grupo suplementado com vitamina E não apresentou diferenças marcantes na P1, enquanto na P2 ocorreu pequena elevação em 30 min e 24h após o exercício, com redução nos momentos subsequentes.

Ao analisar a diferença entre grupos, houve tendência dos valores serem superiores no grupo controle na P1. Enquanto na P2 os resultados do grupo suplementado foram maiores, com inversão deste quadro somente em 48h.

Entre as provas o grupo controle apresentou produção mais elevada de NO na P1, exceto em 24h pós-exercício e o grupo suplementado valores maiores em P2.

3.6 Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)?

Durante o teste não estimulado com LPS não foram observados valores detectáveis em nenhum dos momentos analisados (Tabela 2).

No teste estimulado com LPS, apesar de não existir diferença significativa entre os momentos, algumas variações foram observadas. No grupo controle ocorreu aumento da concentração de TNF- α em 24h e 72h após a P1 e na P2 apresentou valor mais alto no repouso com diminuição progressiva até 48h pós-exercício. No grupo suplementado houve pequena elevação da produção em 48h após a P1, sem detecção nos momentos restantes, enquanto na P2 aumentou em 30min e 48h pós-exercício, também de maneira sutil.

Analisando a influência da suplementação, notou-se que o grupo controle na P1 apresentou concentrações mais elevadas de TNF- α na maioria dos momentos, semelhante à P2, na qual todos os momentos as concentrações foram superiores. Não houve diferença estatística entre os grupos controle e suplementado em nenhum dos momentos analisados.

Ao examinar a diferença entre as provas de exercício (sem diferença significativa), o grupo controle apresentou produção maior somente antes do

exercício da P1 que na P2. Os valores do grupo suplementado foram discretamente maiores após 30min da primeira prova de exercício.

TABELA 2 Medianas e percentis ($P_{25}; P_{75}$) da liberação de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por monócitos isolados de eqüinos da raça Árabe, antes e após exercício progressivo em esteira pelos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE).

			Pré-exercício	Pós-exercício (horas)				
				0,5	24	48	72	120
NO (mM/2x10 ⁵ monócitos)	P1	GC	2,42 (1,8; 2,5)	2,47 (2,4; 2,9)	1,11 (1,0; 1,7)	2,64 (2,2; 3,1)	2,28 (1,6; 2,3)	2,45 (1,6; 3,3)
		GE	1,21 (1,1; 1,3)	1,38 (0,6; 1,9)	1,14 (0,7; 1,7)	0,79 (0,6; 1,5)	0,89 (0,8; 0,9)	1,07 (0,8; 1,1)
	P2	GC	1,14 (0,4; 1,3)	1,23 (0,4; 1,7)	1,79 (1,4; 1,9)	2,32 (1,3; 2,6)	1,92 (1,4; 2,1)	1,81 (1,4; 2,2)
		GE	1,58 (1,5; 1,6)	2,19 (1,8; 2,3)	2,25 (2,2; 2,2)	1,77 (1,3; 2,5)	2,11 (1,8; 2,2)	1,83 (1,7; 1,9)
	Sem LPS	P1 GC	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 7,0)	0,00 (0,0; 23,6)	0,00 (0,0; 64,3)	0,00 (0,0; 0,00)	0,00 (0,0; 0,00)
		P1 GE	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 6,8)
		P2 GC	0,00 (0,0; 48,0)	0,00 (0,0; 7,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 213)	0,00 (0,0; 4,9)
		P2 GE	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)
TNF-α (pg/1x10 ⁶ monócitos)	P1	GC	0,00 (0,0; 84)	61,00 (0,0; 195)	203,00 (0,0; 207)	0,00 (0,0; 367)	297,00 (0,0; 365)	17,00 (0,0; 236)
		GE	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	19,67 (0,0; 30,6)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 21,4)
	P2	GC	144,27 (0,0; 403)	102,27 (0,0; 174)	62,00 (0,0; 66)	11,00 (0,0; 64)	50,27 (0,0; 91)	0,00 (0,0; 38)
		GE	0,00 (0,0; 18,5)	46,93 (0,0; 98,3)	0,00 (0,0; 5,9)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)	0,00 (0,0; 0,0)

4 DISCUSSÃO

A maioria dos resultados não apresentou diferença estatística devido ao número reduzido de animais. Entretanto, os dados foram analisados descritivamente devido ao significado metabólico, baseados nos valores de mediana.

Os valores superiores de vitamina E (Figura 1) na segunda prova de exercício é justificada pelo maior período de suplementação, que foi de 45 dias contra 15 dias até o momento da primeira prova. Indicando que as concentrações séricas de vitamina E são influenciadas não apenas pela dose administrada, mas também pelo período de suplementação.

O MDA é o produto final da lipoperoxidação mais significativa, que aparece nos tecidos e no plasma, e é aceito como índice da taxa de lipoperoxidação (AVELLINI et al., 1999), resultado da reação com radicais

livres (LOVLIN et al., 1987). O aumento do MDA imediatamente após o exercício (Figura 2), no grupo controle e suplementado, em ambas as provas de exercício, indica que houve maior produção de ROS neste momento. Todos os valores de MDA praticamente retornaram aos valores iniciais em 24h após o final do exercício, sugerindo a capacidade antioxidante preservada nestes animais. Os valores deste produto de lipoperoxidação sempre menores no grupo suplementado refletem a importância da vitamina E como um dos maiores suplementos antioxidantes (CHIARADIA, 1998; AVELLINI et al., 1999).

A produção de oxidantes pelos leucócitos foi apontada como a provável causa de lesões inflamatórias e oxidativas dos tecidos, pois exercícios físicos podem induzir uma infiltração leucocitária, indicado pelo aumento dos marcadores sistêmicos como o MDA (LEEUWENBURGH e HEINECKE, 2001).

Os animais suplementados apresentaram valores menores de H_2O_2 produzidos por monócitos no teste não estimulado e estimulado por PMA na maioria dos momentos antes do treinamento, evidenciando a eficácia da suplementação com vitamina E e do treinamento dos equinos no aumento de antioxidantes no organismo (KANTER et al., 1993; AVELLINI et al., 1999).

Na maioria dos momentos os resultados de liberação de O_2^- pelos monócitos no teste não estimulado por PMA foram detectáveis, porém baixos. No teste estimulado os resultados foram menores no grupo suplementado antes e após as provas de exercício, ratificando o efeito da vitamina E no controle da geração de ROS nestas células (LOVLIN et al., 1987; SUGIURA et al., 2001).

As produções de O_2^- , H_2O_2 e formação de MDA em monócitos estimulados *in vitro* são significativamente menores quando provenientes de indivíduos suplementados com vitamina E (DEVARAJ, et al., 1996), além de melhorar a capacidade de reduzir a formação de radicais livres induzida pelo exercício físico, evitando eficientemente a lipoperoxidação (AVELLINI et al., 1999). Demonstrado neste experimento pela detecção de MDA sérico e produções de ROS pelos monócitos menores no grupo suplementado com vitamina E.

A quantidade reduzida desses potentes mediadores pode aumentar a expressão de citocinas e moléculas de aderência endotelial, amplificando a cascata que suscita a resposta inflamatória. A liberação de altos níveis desses mediadores pode ser prejudicial para o animal, sendo que os efeitos podem ser

abrangentes, particularmente relevantes à lesão celular, pois contribuem para a desestruturação de macromoléculas biológicas, como a lipoperoxidação de membranas, modificação oxidativa de proteínas e lesão de DNA (JAMES e NACY, 1993).

O grupo de animais não suplementados, principalmente antes do treinamento, provavelmente esteve mais vulnerável à ação tóxica pela formação de peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso oxidante de proteínas, pela associação de NO e O_2^- , pois a produção de NO pelos monócitos foi maior (exceto 24h pós-exercício), com maior estabilidade no grupo suplementado. O ONOO^- pode protonar-se na presença de íon hidrogênio (H^+), originando um radical altamente reativo e tóxico, a hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), aumentando a ação tóxica do NO e O_2^- . A célula produtora de NO e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade desta molécula (DUSSE et al., 2003).

A menor produção de $\text{TNF-}\alpha$ quando estimulados por LPS em cultura de monócitos foi no grupo suplementado com vitamina E em ambas as provas de exercício, evitando danos teciduais associados com lesões inflamatórias e isquêmicas (KIM et al., 1996), pois aparentemente o $\text{TNF-}\alpha$ possui um grande papel na endotoxemia clínica em eqüinos (CARGILE, et al., 1995).

Além do treinamento, a suplementação de vitamina E na dieta pode servir de alternativa para aumentar a defesa antioxidante nos organismos submetidos ao exercício físico e evitar o estresse oxidativo pela depuração significativa de radicais livres e conseqüente repressão da lipoperoxidação (CLAYCOMBE e MEYDANI, 2001; SEN, 2001).

Os resultados permitem concluir que o treinamento e a suplementação com vitamina E preservaram as funções dos monócitos eqüinos quanto à geração de O_2^- , H_2O_2 , NO e $\text{TNF-}\alpha$, ao mesmo tempo em que preveniu a produção exagerada destas substâncias e promoveu menor lesão oxidativa nos animais suplementados, indicada pela menor formação de MDA sérico. Demonstrando a relevância da suplementação com a vitamina E para aumentar as defesas antioxidantes do organismo.

5 REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D.M.; APPLETON, J.A.; EICKER, S.W.; LUCE, R.; FLAMINIO, M. J.; ANTCZAK, D.F. The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 91, p. 61-71, 2003.
- ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, D.; FAVIER, D. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v.572, p.103-116, 1991.
- 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.
- CARGILE, J. L.; MACKAY, R.J.; DANKERT, J.R.; SKELLEY, L. Effect of treatment with a monoclonal antibody against equine tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic, and circulating TNF responses of miniature horses given endotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, p. 1451-1459, 1995.
- 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.
- CLAYCOMBE, K.J.; MEYDANI, S.N. Vitamin E and genome stability. **Mutat. Res.**, v.475, p.37-44, 2001.
- CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. 2.ed. Botucatu: Tipmic, 1998. 263p.
- DE MOFFARTS, B.; PORTIER, K.; KIRSCHVINK, N.; COOUDERT, J.; FELLMANN, N.; VAN ERCK, E.; LETELLIER, C.; MOTTA, C.; PINCEMAIL, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. **Vet. J.**, no prelo, 2006.
- DEVARAJ, S.; LI, D.; JIALAL, I. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 756-763, 1996.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 343-350, 2003.

- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n.1, p.61-68, 1997.
- HAWKINS, D. L.; MACKAY, R. J.; MACKAY, S. L. D.; MOLDAWER, L. L. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediator by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 66, p. 1-10, 1998.
- JAMES, S.L.; NACY, C.; Effector functions of macrophages and parasites. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 5, p. 155-158, 1993.
- Jl, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.222, n.3, p.283-292, 1995.
- KANTER, M.M.; NOLTE, L.A.; HOLLOSZY, J.O. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v.72, n.2, p.965-969, 1993.
- KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, v.311, p.76-79, 2002.
- KIM, C.; PARK, E.; QUINN, M.R.; SCHULLER-LEVIS, G. The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF- α in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. **Immunopharmacology**, v. 34, p; 89-95, 1996.
- LEEUEWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 829-838, 2001.
- LEWIS, L.D. **Nutrição clínica equina: alimentação e cuidados**. São Paulo: Roca, 2000. 710 p.
- LOVLIN, R.; COTTLE, W.; PYKE, I.; KAVANAGH, M.; BELCASTRO, A.N. Are indices of free radical damage related to exercise intensity. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 56, p; 313-316.
- NAVARRO, A.; GOMEZ, C.; LÓPEZ-CEPERO, J.M.; BOVERIS, A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.**, v. 286, p. R505-R511, 2004.
- PICK E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic

enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v.46, n.2, p.211-226, 1981.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analyses of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proc. Nutr. Soc.**, v.58, n.4, p.1025-1033, 1999.

RADÁK, Z.; NAITO, H.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; TAKAHASHI, R.; CARDOZO-PELAEZ, F.; GOTO, S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. **Eur. J. Physiol.**, v. 445, p. 273-278, 2002.

RAIDAL, S. L.; LOVE, D. N.; BAILEY, G. D.; ROSE, R. J. Effects of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. **Res. Vet. Sci.**, v.68, p.141-146, 2000.

ROSEN, M.G.; RAMOS, C.L.; COHEN, M.S.; BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB J.**, v. 9, p. 200-209, 1995.

ROWBOTTOM, D.G.; GREEN, K.J. Acute exercise effects on the immune system. **Méd. Sci. Sport. Exer.** v. 32, p. S396-S405, 2000.

SAITO, M.E.; PERAÇOLI, M.T.S.; MACHADO, L.P.; SILVEIRA, V.F.; YONEZAWA, L.A.; WATANABE, M.J.; THOMASSIAN, A.; KOHAYAGAWA, A. Separação simultânea de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico equino. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, p. 65, 2006.

SEN, C.K. Antioxidants in exercise nutrition. **Sports Med.**, v.31, n.13, p.891-908, 2001.

SOUZA JÚNIOR, T.P.; OLIVEIRA, P.R.; PEREIRA, B. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **Rev. Bras. Méd. Esporte**, v. 11, p. 91-96, 2005.

SUGIURA, H.; SUGIURA, H.; NISHIDA, H.; INABA, R.; MIRBOD, S.M.; IWATA, H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, p. 789-794, 2001.

Artigo: Efeito do exercício e suplementação com vitamina E (dl- α tocoferol) em leucócitos polimorfonucleares de eqüinos da raça Árabe

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

Efeito do exercício e suplementação com vitamina E (dl- α tocoferol) em leucócitos polimorfonucleares de eqüinos da raça Árabe

RESUMO

O exercício físico aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido ao maior consumo de oxigênio e, conseqüentemente, ocorre o estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar as funções de liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por polimorfonucleares de sangue periférico de eqüinos suplementados com vitamina E submetidos ao exercício físico. Desta forma um grupo de eqüinos da raça Árabe suplementado com vitamina E foi comparado um grupo controle antes e após uma prova de exercício progressivo em esteira de alta velocidade depois de serem submetidos a um protocolo de treinamento. As produções de H_2O_2 e O_2^- por polimorfonucleares no grupo de animais suplementados foram mais elevadas. Isso indica a exacerbação desta função dos polimorfonucleares dos eqüinos pela vitamina E antes e após a prova de exercício físico em esteira de alta velocidade. A concentração sérica de MDA mais baixa indica que, apesar da maior liberação de H_2O_2 e O_2^- pelos leucócitos polimorfonucleares dos eqüinos suplementados com vitamina E, houve atenuação da lesão oxidativa.

Palavras-chave: Eqüino, Vitamina E, Polimorfonucleares, Exercício, Estresse Oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

A influência do exercício físico no sistema imune inato foi determinada por vários estudos em humanos (CANNON, et al., 1990), eqüinos (RAIDAL et al., 2000; MALINOWSKI, et al., 2004; ESCRIBANO et al., 2005) e animais de laboratório (SUGIURA, et al., 2001). Há aumento da atividade fagocítica e da explosão oxidativa dos neutrófilos em eqüinos atletas como efeito benéfico do exercício moderado (PYNE, 1994). Essa função do neutrófilo fica prejudicada no exercício intenso, aumentando o risco dos animais em contrair infecções pelo comprometimento da resposta imune inespecífica (RAIDAL et al. 2000). A supressão ou estímulo da resposta imune é dependente da intensidade e duração do exercício e é especulada por contribuir com aumento da prevalência de pleuropneumonia e abscessos pulmonares em eqüinos (AINSWORTH et al., 2003).

Normalmente 2 a 5% do oxigênio (O_2) consumido é transformada em espécies reativas de oxigênio (ROS). Durante o exercício o consumo de O_2 aumenta imensamente, cerca de 10 a 15 vezes a mais que o repouso, sendo que o requerimento de O_2 pelo músculo esquelético pode aumentar em mais de 100 vezes. Sendo inevitável o aumento da produção ROS, e se a mesma porcentagem destes reativos for produzido, o exercício pode elevar muito a quantidade de ROS no organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os antioxidantes preservam a homeostasia das células ao repouso e exercícios leves, porém, quando a produção de ROS é excessiva ou a defesa antioxidante não é adequada, como durante exercício aeróbico prolongado ou quando o sistema antioxidante está comprometido, ocorre lesão oxidativa celular e tecidual (PHUNG et al., 1994; JI, 1995; CHIARADIA et al., 1998; AVELLINI, et al., 1999; CHOW, 1991), podendo estar envolvido na patogênese das miopatias e hemólises induzidas pelo exercício em eqüinos (CHIARADIA, 1998). Devido ao consumo de vários antioxidantes durante o exercício extenuante e treinamento crônico, a suplementação de antioxidantes na dieta pode ser benéfica (JI, 1995). A vitamina E é apontada como um poderoso antioxidante, entretanto, sob condições fortemente oxidativas pode sofrer oxidação e uma metabolização irreversível da molécula de tocoferol (SETIADIA et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do exercício físico na geração de lesão oxidativa por espécies reativas de oxigênio em eqüinos suplementados com vitamina E e avaliar as funções de liberação de ROS por polimorfonucleares de sangue periférico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados dez eqüinos da raça Árabe, três machos castrados e sete fêmeas, com idade variando de 4,5 a 7 anos e peso médio de 383kg, sedentários e clinicamente sadios, selecionados mediante exame hematológico, bioquímica clínica, videoendoscopia do aparelho respiratório anterior com o animal em repouso e laringoscopia com o animal em movimento e avaliação cinemática do aparelho locomotor.

O manejo nutricional consistiu de ração comercial (Proequi-Guabi, Mogiana Alimentos, São Paulo, Brasil), feno de capim Coast-Cross (*Cynodon dactylon*), suplemento mineral (Sal mineral Centauro, Moagiana Alimentos), conforme recomendações de Lewis (2000) e água *as libitum*.

Os animais foram igualmente distribuídos nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE). A suplementação com 1000 UI/animal/dia de Acetato de dl- α -tocoferol (E-Tabs, Sigma Pharma, Hortolândia, SP, Brasil) via oral para o grupo GE foi realizada por 21 dias antes do treinamento, diariamente e interrompido somente no final do experimento, completando 50 dias.

Os eqüinos de ambos os grupos foram submetidos ao treinamento físico em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) durante 30 dias, realizado uma vez ao dia, seis vezes por semana com um dia de descanso até completarem 20 dias. O protocolo de treinamento adotado foi de 5min a 1,8m/s, 3min a 4,0m/s, 2min a 6,2m/s, 1min a 8,0m/s e 1min a 10,0m/s, seguidos de um período de desaquecimento a 3m/s por 2min e a 1,6m/s por 2min. Os animais descansaram por 48h e realizaram a prova de exercício físico em esteira de alta velocidade inclinada a +7% e velocidade de 1,8m/s por 5min, seguindo a 4,0m/s por 3min, 6,0m/s por 2min e posteriormente 8,0m/s, 9,0m/s e 10,0m/s por 1min em cada velocidade, ou até quando o animal não conseguisse mais se manter em galope, mesmo sendo estimulado. Os animais

foram mantidos em repouso e acompanhados até 120h após o término do exercício.

Amostras de sangue foram obtidas antes do exercício e 0,5h, 24h, 48h, 72h e 120h após o final da prova, por punção da veia jugular em tubos a vácuo heparinizados (Vacutainer-Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) para isolamento de polimorfonucleares (PMN) e em tubos com gel ativador da coagulação (Vacutainer-Becton Dickinson) para obtenção de soro.

2.2 Isolamento de polimorfonucleares (PMN)

As células PMN de sangue periférico eqüino foram isoladas segundo a técnica descrita por Saito et al. (2006), pela utilização de um gradiente descontínuo de densidade de ficoll-hipaque d=1,077 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e d=1,119 (Sigma).

A porção rica em PMN da interface entre o ficoll-hipaque d=1,077 e d=1,119 foi recuperada e submetida a duas lavagens sucessivas por meio de centrifugação com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), por 10 min a 150 g cada. A viabilidade das células foi verificada pelo método de exclusão com Azul Tripán 0,2% (Merck), em câmara hemocitométrica. A concentração foi ajustada pela quantidade de células viáveis.

2.3 Liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Utilizou-se a técnica descrita por de Pick e Mizel (1981) modificada, baseada na oxidação de vermelho fenol (Sigma) na presença de peroxidase Horseradish tipo II (Sigma) com e sem estimulante "Phorbol Myristate Acetate" (PMA) (Sigma) na concentração de 60ng/alvéolo. Foram isolados 2×10^5 PMN/alvéolo em placas de cultura de 96 alvéolos (Nunc, Roskilde, Denmark), e o resultado expresso em nM de H₂O₂/ 2×10^5 células, tendo como referência uma curva padrão com diluições seriadas de peróxido de hidrogênio (Sigma). As dosagens e a curva padrão foram realizadas em quadruplicata.

2.4 Liberação de ânion superóxido (O₂⁻)

A mensuração da produção de O₂⁻ por PMN eqüinos foi realizada pela redução de Ferricitocromo c, segundo técnica descrita por Pick e Mizel (1981) modificada. PMN isolados (5×10^5 /alvéolo) em quadruplicata nas placas de

cultura foram acrescentados de um reagente contendo 160 μ M de Citocromo C parcialmente acetinilado (Sigma) diluídos em solução de Hanks, com e sem estimulante na concentração de 40ng/alvéolo.

A densidade óptica dos sobrenadantes foi mensurada por espectrofotometria a 550nm após 60 min de incubação a 37°C em estufa umidificada e tensão constante de 5% de CO₂. A quantidade de O₂⁻ produzida por alvéolo foi calculada pela fórmula $O_2^-= (\text{absorbância a 550nm} \times 100)/6,3$.

2.5 Vitamina E sérica e Malondialdeído Sérico (MDA)

As amostras de soro foram protegidas da luz e armazenadas à -80°C. As dosagens de vitamina E de acordo com a metodologia descrita por Arnaud et al. (1991) e MDA sérico pela metodologia descrita por Karatas et al. (2002) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão), em fluoroscopia.

2.6 Cortisol

A determinação do cortisol sérico foi realizada por meio da técnica de radioimunoensaio, de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial (Coat-a-Count, Diagnostics Products, Los Angeles, CA, USA) e leitura em contador gama (Kinectic Count 48, Vitek Systems, Missouri, USA).

2.7 Análise estatística

Para variáveis avaliadas nos dois grupos, cuja tendência central foi representada pela mediana, foi efetuado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos, em cada momento. Para comparar os momentos dentro de cada grupo foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman (CURI, 1998). Em todas as análises, as estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

A maioria dos resultados não apresentou diferença estatística devido ao número reduzido de animais. Entretanto, os dados foram analisados descritivamente devido ao significado metabólico, baseados nos valores de mediana.

Os valores de vitamina E séricos foram sempre superiores no grupo suplementado (Figura 1A). A concentração sérica de MDA do grupo controle foi superior em todos os momentos, apesar de não apresentarem diferença significativa, e apresentaram diferença estatística entre os momentos somente no grupo controle, em que aos 30min após o exercício foi significativamente ($p < 0,05$) maior que antes do exercício, 24h e 48h pós-exercício (Figura 1B).

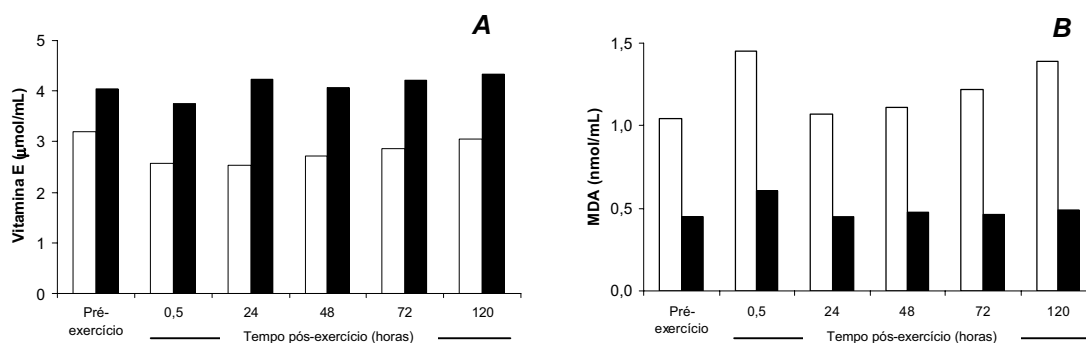


FIGURA 1 Medianas da concentração sérica de vitamina E (dl- α -tocoferol) (A) e MDA (B) de eqüinos da raça Árabe, antes e após exercício progressivo em esteira nos grupos controle (□) e suplementado com vitamina E (■).

A liberação de H_2O_2 pelos polimorfonucleares isolados do grupo controle foi menor no teste não estimulado (Figura 2). Os valores do teste estimulado com PMA foram semelhantes entre os grupos. Houve diminuição da produção de H_2O_2 mais evidente 24h após o exercício.

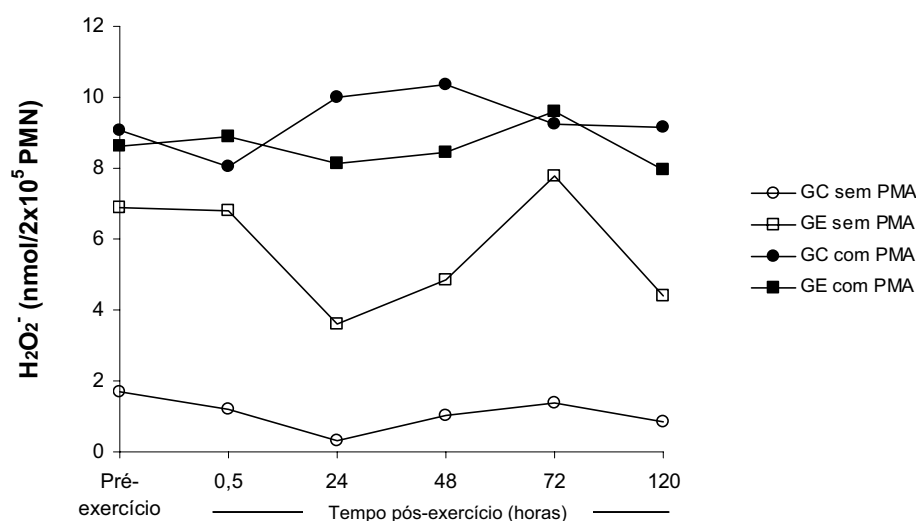


FIGURA 2 Medianas da liberação de H_2O_2 por PMN isolados de eqüinos da raça Árabe, antes e após exercício progressivo em esteira nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE) nos testes com e sem estímulo por PMA.

A produção *in vitro* de O_2^- por PMN eqüinos não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e suplementado com vitamina E, tanto na prova não estimulada como na estimulada por PMA. Entretanto, todos os momentos de ambos os grupos resultou em valores mais baixos no teste estimulado por PMA (Figura 3).

Ocorreu aumento do cortisol sérico somente 30 minutos após o fim do exercício, enquanto os outros momentos foram semelhantes aos iniciais (Figura 4).

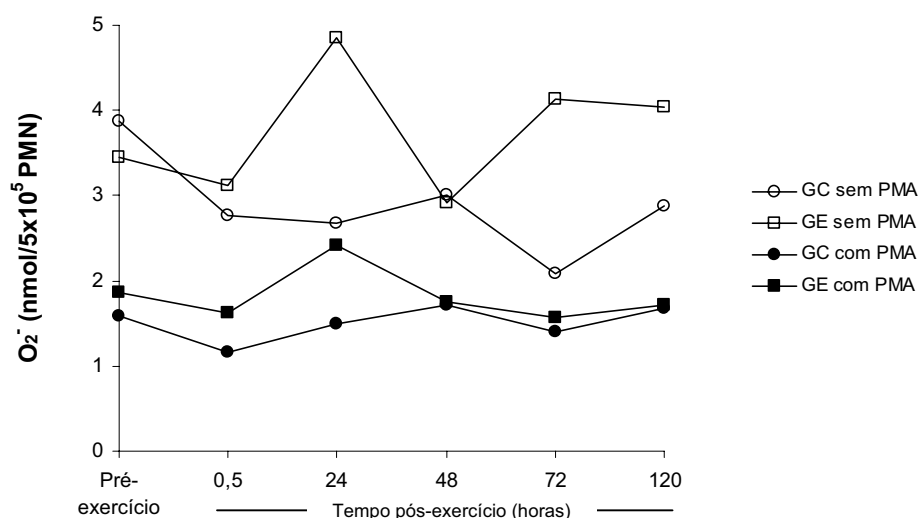


FIGURA 3 Medianas da liberação de O_2^- por PMN isolados de eqüinos da raça Árabe, antes e após exercício progressivo em esteira nos grupos controle (GC) e suplementado com vitamina E (GE) nos testes com e sem estímulo por PMA.

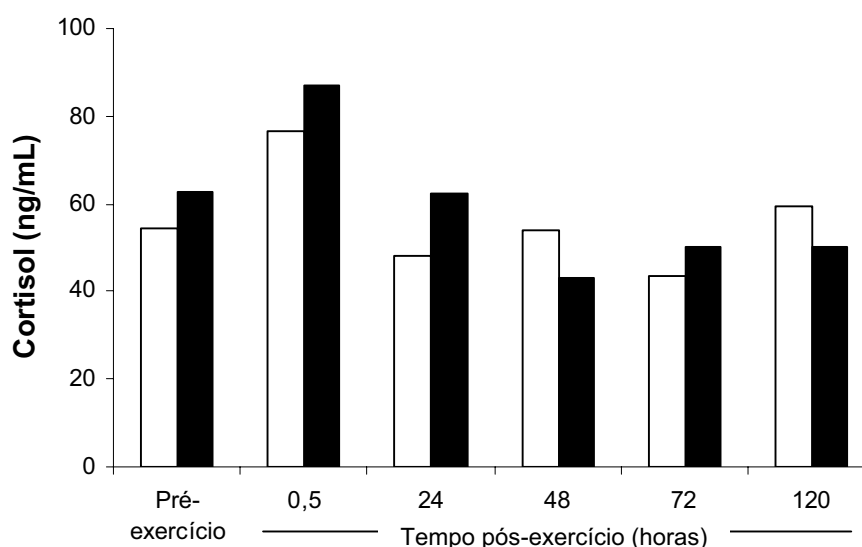


FIGURA 4 Medianas da concentração sérica de cortisol de eqüinos da raça Árabe, antes e após exercício progressivo em esteira nos grupos controle (□) e suplementado com vitamina E (■).

4 DISCUSSÃO

O MDA é o produto final da lipoperoxidação mais significativa, que aparece nos tecidos e no plasma, e é aceito como índice da taxa de lipoperoxidação (AVELLINI et al., 1999). O aumento do MDA imediatamente após o exercício (Figura 2), no grupo controle e suplementado, em ambas as provas de exercício, indica que houve maior produção de ROS neste momento. Todos os valores de MDA praticamente retornaram aos valores iniciais em 24h após o final do exercício, sugerindo a capacidade antioxidante preservada nestes animais. Os valores deste produto de lipoperoxidação sempre menores no grupo suplementado indicam que a vitamina E atenuou o estresse oxidativo (CHIARADIA, 1998; AVELLINI et al., 1999). A vitamina E impede a propagação da lipoperoxidação e nesta reação é oxidada formando o radical α -tocoferila (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O aumento de cortisol logo após o exercício sugere que os eqüinos podem ter sofrido algum tipo de estresse, além do estresse oxidativo. O cortisol pode suprimir, induzir efeitos não discerníveis ou intensificar as funções dos neutrófilos (WONG et al., 1992), que representaram cerca de 96% das células polimorfonucleares isoladas do sangue periférico. Os resultados deste estudo não determinaram nenhuma correlação entre o cortisol e a alteração nas funções dos neutrófilos durante os momentos acompanhados.

A liberação de O_2^- pelas células polimorfonucleares de ambos os grupos, inexplicavelmente, foi menor quando estimuladas por PMA. Ao contrário de alguns autores que encontraram diminuição da atividade de H_2O_2 e O_2^- em neutrófilos de indivíduos com vitamina E suplementar na dieta (HIDIROUGLOU et al., 1997), neste experimento foram encontrados valores mais altos destes ROS no grupo de animais suplementados. Isso indica a exacerbação desta função dos polimorfonucleares dos eqüinos pela vitamina E antes e após a prova de exercício físico em esteira de alta velocidade.

Durante a formação dos radicais livres, a vitamina E pode reagir com a hidroxila ($\cdot OH$) e este ser convertido à água (H_2O), que não representa maiores problemas. Entretanto, quando a vitamina E reage com o $HOO\cdot$, este radical hidroperoxila é convertido a H_2O_2 , que causa lesão oxidativa, apesar de este ser menos maléfico que o $HOO\cdot$. A fração substancial da vitamina E oxidada

pode ser novamente reduzida para a vitamina E ativa e originar mais H_2O_2 , que pode atingir quantidade suficiente para provocar extensa lesão oxidativa (SETIADIA et al., 2003).

O sistema glutathiona é o principal responsável pela remoção do H_2O_2 , mediada pela glutathiona peroxidase na presença de glutathiona reduzida (GSH), sendo transformada em H_2O e a GSH é oxidada. Entretanto, a GSH também atua na reciclagem da vitamina E oxidada para sua forma ativa e sua concentração pode diminuir (SEN, 1997; JI, 1995), assim como a remoção da H_2O_2 acumulando no organismo, e a vitamina E seria responsabilizada pela ação pró-oxidante (SETIADIA et al., 2003), ainda que realize a conversão de uma forma altamente deletéria de radical livre para uma ROS menos nociva.

Espécies reativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos participam na defesa do organismo contra bactérias, mas podem causar lesões de tecidos e desempenham um importante papel na patogênese de doenças quando os neutrófilos são estimulados em excesso (BENBAREK, et al., 1999). O aumento da morte intracelular de patógenos em neutrófilos bovinos suplementados com vitamina E sem aumentar o índice de fagocitose encontrado por Hogan et al. (1992), pode ser explicado pelo mecanismo de geração de H_2O_2 e O_2^- por intermédio da vitamina E, pois estes ROS são os maiores responsáveis pela eliminação das bactérias fagocitadas por neutrófilos.

O efeito pró-oxidante da vitamina E foi demonstrado por altas doses de sua suplementação (BURKITT e MILNE, 1995; MCANULTY et al., 2005). Tornando necessário considerar não somente os aspectos nutricionais e antioxidantes da vitamina E, mas também as propriedades toxicológicas, como mediador da geração de ROS. A produção de oxidantes pelos leucócitos foi apontada como a provável causa de lesões inflamatórias e oxidativas dos tecidos provocadas por exercícios físicos, pois podem induzir uma infiltração leucocitária, indicado pelo aumento dos marcadores sistêmicos como o MDA (LEEUEWENBURGH e HEINECKE, 2001).

Concluimos que houve atenuação da lesão oxidativa pela suplementação com vitamina E, apesar da maior liberação de H_2O_2 e O_2^- pelos leucócitos polimorfonucleares, indicada pela menor quantidade de MDA sérica formada nos animais suplementados. Provavelmente ocorreu a transformação de ROS

mais nocivas em menos reativas nas células polimorfonucleares, entretanto, há necessidade de estudos complementares para constatação.

5 REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D. M.; APPLETON, J. A.; EICHER, S. W.; LUCE, R.; FLAMINIO, M.J.; ANTCZAK, D. F. The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 91, p. 61-71, 2003.
- ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, D.; FAVIER, D. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v.572, p.103-116, 1991.
- 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.
- BENBAREK, H.; MOUITHYS-MICKLAD, A.; DEBY-DUPONT, G.; GRÜLKE, S.; NEMMAR, A.; LAMY, M.; SERTEYN, D. High concentrations of histamine stimulate equine polymorphonuclear neutrophils to produce reactive oxygen species. **Inflamm. Res.**, v. 48, p. 594-601, 1999.
- BURKITT, M.J.; MILNE, L. Hydroxyl radical formation from Cu(II)-trolox mixtures: insights into the pro-oxidant properties of α -tocopherol. **FEBS Letters**, v. 379, p. 51-54, 1996.
- CANNON, J.G.; ORENCOLE, S.F.; FIELDING, R.A.; MEYDANI, M.; MEYDANI, S.N.; FIATARONE, M.A.; BLUMBERG, J.B.; EVANS, W.J. Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 1214-1219, 1990.
- 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.
- CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v.11, p.215-232, 1991.
- CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. 2.ed. Botucatu: Tipmic, 1998. 263p.

- ESCRIBANO, B.M.; CASTEJÓN, F.M.; VIVO, R.; AGÜERA, S.; AGÜERA, E.I.; RUBIO, M.D. Nonspecific immune response of peripheral blood neutrophils in two horse breeds (Anglo-Arabian and Spanish-Arabian): response to exercise. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, p. 145-154, 2005.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1999, 936 p.
- HIDIROUGLOU, M.; BATRA, T.R.; ZHAO, X. Bioavailability of vitamin E compounds and the effect of supplementation on release of superoxide and hydrogen peroxide by bovine neutrophils. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 187-193, 1997.
- HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L.; SCHOENBERGER, P.S. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. **J. Dairy Sci.** v. 75, p. 399-408, 1992.
- Jl, L.L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radic. Biol. Med.** , v. 18, p. 1079-1086, 1995.
- KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, v.311, p.76-79, 2002.
- LEEUEWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 829-838, 2001.
- LEWIS, L.D. **Nutrição clínica equina: alimentação e cuidados**. São Paulo: Roca, 2000. 710 p.
- MALINOWSKI, K.; KEARNS, C.F.; GUIRNALDA, P.D.; ROEGNER, V.; MCKEEVER, K.H. Effect of chronic clenbuterol administration and exercise training on immune function in horses. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 3500-3507, 2004.
- MCANULTY, S.R.; MCANULTY, L.S.; NIEMAN, D.C.; MORROW, J.D.; SHOOTER, L.A.; HOLMES, S.; HEWARD, C.; HENSON, D.A. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. **J. Nutr. Biochem**, v. 16, p. 530– 537, 2005.
- PHUNG, C.D.; EZIEME, J.A.; TURRENS, J.F. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.315, n.2, p.479-482, 1994.
- PICK E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic

enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v.46, n.2, p.211-226, 1981.

PYNE, D.B. Regulation of neutrophil function during exercise. **Sports Med.**, v.17, n.4, p.245-258, 1994.

RAIDAL, S. L.; LOVE, D. N.; BAILEY, G. D.; ROSE, R. J. Effects of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. **Res. Vet. Sci.**, v.68, p.141-146, 2000.

SAITO, M.E.; PERAÇOLI, M.T.S.; MACHADO, L.P.; SILVEIRA, V.F.; YONEZAWA, L.A.; WATANABE, M.J.; THOMASSIAN, A.; KOHAYAGAWA, A. Separação simultânea de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico equino. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, p. 65, 2006.

SEN, C.K. Antioxidants in exercise nutrition. **Sports Med.**, v.31, n.13, p.891-908, 2001.

SETIADIA, D.H.; CHASSA, G.A.; TORDAYB, L.L.; VARROB, A.; PAPPB, J.G. Vitamin E models. Can the anti-oxidant and pro-oxidant dichotomy of α -tocopherol be related to ionic ring closing and radical ring opening redox reactions? **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 620, p. 93-106, 2003.

SUGIURA, H.; SUGIURA, H.; NISHIDA, H.; INABA, R.; MIRBOD, S.M.; IWATA, H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, p. 789-794, 2001.

WONG, C.W.; SMITH, S.E.; THONG, Y.H.; OPDEBEECK, J.P.; THORNTON, J.R. Effects of exercise stress on various immune functions in horses. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, p. 1414-1417, 1992.

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O exercício físico proporciona inúmeros benefícios ao organismo, porém, o desenvolvimento de defesas antioxidantes pode ser superado por eventos pró-oxidantes, com lesões oxidativas como consequência. Este projeto de pesquisa foi executado pela motivação na busca de uma alternativa para atenuar os efeitos maléficos da geração de ROS.

Uma das opções para diminuir as lesões oxidativas decorrentes do aumento na produção de ROS é a suplementação de antioxidantes na dieta (SACHECK et al., 2001). Comprovada por este experimento pelos resultados encontrados.

A menor quantidade de MDA sérico detectado nos animais suplementados indica que a lesão oxidativa foi amenizada, ao mesmo tempo em que preservou as funções dos monócitos eqüinos quanto à geração de O_2^- , H_2O_2 , NO e TNF- α e evitou a produção exacerbada das mesmas. Apesar da maior liberação de H_2O_2 e O_2^- pelos leucócitos polimorfonucleares, provavelmente devido à transformação de ROS mais nocivas em menos reativas.

A relevância da suplementação com a vitamina E para aumentar as defesas antioxidantes do organismo foi demonstrada por este estudo, entretanto, há necessidade de pesquisas complementares para elucidar os mecanismos desse incremento antioxidante.

2 REFERÊNCIAS (referente aos Capítulos I e V)

- AINSWORTH, D.M.; APPLETON, J.A.; EICKER, S.W., LUCE, R; FLAMINIO, M. J.; ANTCZAK, D.F. The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 91, p. 61-71, 2003.
- 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.
- 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**, Oxford, v.119, p.833-836, 1998.

CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v.11, p.215-232, 1991.

DE MOFFARTS, B.; PORTIER, K.; KIRSCHVINK, N.; COOUDERT, J.; FELLMANN, N.; VAN ERCK, E.; LETELLIER, C.; MOTTA, C.; PINCEMAIL, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. **Vet. J.**, no prelo, 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n.1, p.61-68, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1999, 936 p.

Jl, L.L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 1079-1086, 1995.

KANTER, M.M.; NOLTE, L.A.; HOLLOSZY, J.O. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. **J. Appl. Physiol.**, v.72, n.2, p.965-969, 1993.

NAVARRO, A.; GOMEZ, C.; LÓPEZ-CEPERO, J.M.; BOVERIS, A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.**, v. 286, p. R505-R511, 2004.

PHUNG, C.D.; EZIEME, J.A.; TURRENS, J.F. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.315, n.2, p.479-482, 1994.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analyses of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proc. Nutr. Soc.**, v.58, n.4, p.1025-1033, 1999.

PYNE, D.B. Regulation of neutrophil function during exercise. **Sports Med.**, v.17, n.4, p.245-258, 1994.

RADÁK, Z.; NAITO, H.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; TAKAHASHI, R.; CARDOZO-PELAEZ, F.; GOTO, S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against

oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. **Eur. J. Physiol.**, v. 445, p. 273-278, 2002.

RAIDAL, S. L.; LOVE, D. N.; BAILEY, G. D.; ROSE, R. J. Effects of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. **Res. Vet. Sci.**, v.68, p.141-146, 2000.

ROSEN, M.G.; RAMOS, C.L.; COHEN, M.S.; BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB J.**, v. 9, p. 200-209, 1995.

ROWBOTTOM, D.G.; GREEN, K.J. Acute exercise effects on the immune system. **Méd. Sci. Sport. Exer.** v. 32, p. S396-S405, 2000.

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

SOUZA JÚNIOR, T.P.; OLIVEIRA, P.R.; PEREIRA, B. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **Rev. Bras. Méd. Esporte**, v. 11, p. 91-96, 2005.

SUGIURA, H.; SUGIURA, H.; NISHIDA, H.; INABA, R.; MIRBOD, S.M.; IWATA, H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, p. 789-794, 2001.