

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE MONOCARBOXILATO
MCT1 E SUA PROTEÍNA AUXILIAR CD 147 EM HEMÁCIAS DE
EQUINOS DE SALTO**

**Walter Heinz Feringer Júnior
Médico Veterinário**

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Fevereiro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE MONOCARBOXILATO
MCT1 E SUA PROTEÍNA AUXILIAR CD 147 EM HEMÁCIAS DE
EQUINOS DE SALTO**

Walter Heinz Feringer Júnior

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

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

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Fevereiro – 2014

Feringer-Júnior, Walter Heinz
F356e Expressão do transportador de monocarboxilato mct1 e sua
proteína auxiliar CD 147 em hemácias de equinos de salto / Walter
Heinz Feringer Júnior. – – Jaboticabal, 2014
ix, 62 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz
Banca examinadora: Antonio de Queiroz Neto, Herbert Gustavo
Simões

Bibliografia

1. *Transportador de Monocarboxilato*. CD147. 2. Equinos. 3.
Exercício. 4. Lactato I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias..

CDU 619:612.766.1:636.1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE MONOCARBOXILATO MCT1 E SUA
PROTEÍNA AUXILIAR CD 147 EM HEMÁCIAS DE EQUINOS DE SALTO

AUTOR: WALTER HEINZ FERINGER JUNIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
de Jaboticabal

Prof. Dr. ANTONIO DE QUEIROZ NETO

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
de Jaboticabal

Prof. Dr. HERBERT GUSTAVO SIMÕES

Universidade Católica de Brasília / Brasília/DF

Data da realização: 28 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Walter Heinz Feringer Júnior – Nascido na capital paulista, em 16 de julho de 1981, filho de Ivete Le Senechal Feringer e Walter Heinz Feringer, portador do RG 29.259.674-1. Médico Veterinário graduado pela Universidade Estadual Paulista - UNESP, câmpus de Jaboticabal – SP, com início em Fevereiro de 2006 e término em Dezembro de 2010. Realizou estágio curricular no período de Julho a Agosto de 2010 na clínica *Equine Center*, localizada no Jockey Clube de São Paulo, em clínica e cirurgia de equinos sob orientação do MV Reinaldo de Campos, em setembro de 2010 no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", na UNESP - Jaboticabal em Clínica de Grandes animais sob orientação do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto e de Outubro de 2010 a Novembro do mesmo ano realizou estagio em ortopedia equina na Pferde klinik Wolfesing, Alemanha, sob orientação do médico veterinário Rüdger Brems, atualmente é discente desta Universidade, no Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária - Clínica Médica, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz.

“O fato de uma opinião ser amplamente compartilhada não é nenhuma evidência de que não seja completamente absurda”.

Bertrand Russell

NULLIUS IN VERBA.

Dedico este trabalho àquela que tão cedo nos deixou e durante toda a curta vida e mesmo no final nunca deixou de ser um exemplo.

Ivete Le Senechal Feringer

Eterna Saudade

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar meu pai Walter, amigo, companheiro inseparável e PAI paciente que mesmo com minhas derrotas nunca deixou de me incentivar e apoiar, sem duvida alguma o maior responsável por minha formação.

A minha querida irmã Silvia, outra incansável incentivadora e minha “secretaria” que tanto tempo gastou em me ajudar com o que fosse preciso.

A minha oma Anna, muito obrigado pelo carinho, amor e pelos strudels.

A todos os parentes e amigos que de alguma forma contribuíram com a amizade e companheirismo.

Aos meus grandes amigos Ricardo Nociti, Luciana Diniz e Diego Favero.

Meus companheiros acadêmicos Helena Brito, Julia Carvalho, Inaê Regatieri, Thais Zana, Kamirro Nardi e Flora D'angelis.

A Academia Militar das Agulhas Negras, seus soldados e ginetes por permitir o uso de seus cavalos e a Otávio Soares por organizar e viabilizar este projeto, assim como as ajudas online, muito obrigado.

Agradeço também a professora Gesiane Ribeiro, pela grande contribuição a este trabalho por permitir o nosso acesso aos cavalos de elite.

Muito obrigado a professora Eliana Lemos por abrir as portas de seu laboratório e a João Campanharo pela ajuda com os aparelhos.

Ao professor Antonio Queiroz Neto pela criação do LAFEQ.

A FAPESP pelo projeto auxilio e bolsa.

Professor Guilherme de Camargo Ferraz, muitíssimo obrigado pela orientação e pela extrema educação e profissionalismo, mesmo na hora das broncas.

E especialmente eterno agradecimento ao exemplo máximo de proatividade e capacidade de realização que eu poderia ter, pessoa que consegue ser mãe, esposa, aluna, pesquisadora e amiga, Maria Luiza Almeida impossível descrever sua importância para este trabalho, MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3 CUSTO DE TRANSPORTE: FREQUÊNCIA CARDÍACA E LACTATO COMO DISCRIMINADORES DE DESEMPENHO	8
4 Bioenergética: fonte de íons lactato e H^+	10
4.1 Transportadores de Monocarboxilatos.....	13
4.2 Transportador de Monocarboxilato 1.....	16
4.3 Proteína auxiliadora CD147	18
5 OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo.....	20
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
6.1 Animais e manejo.....	20
6.2 Grupos experimentais	21
6.3 Teste de saltos incrementais	23
6.4 Teste de velocidades incrementais	25
6.5 Prova de Salto	27
6.6 Determinação do custo de transporte (frequência cardíaca e custo glicolítico)	27
6.7 Coleta de sangue, momentos de coleta e preparação da papa de hemácias	28
6.8 Preparação para as amostras de <i>Western Blotting</i>	28
6.9 Determinação da concentração das proteínas das membranas das hemácias	29
6.10 Preparação e montagem da técnica de <i>Western Blotting</i>	29
6.11 Análise estatística.....	31

7	RESULTADOS	31
7.1	Custo de Frequência Cardíaca e Custo de Lactato Plasmático no teste de saltos incrementais.....	31
7.2	Custo de Frequência Cardíaca e Custo de Lactato Plasmático no teste de velocidades incrementais.....	36
7.3	MCT1 e CD147	38
8	DISCUSSÃO	44
8.1	Diferenciação dos grupos de BH pelo custo de transporte	44
8.2	MCT1 e CD147	48
9	CONCLUSÃO	50
10	REFERÊNCIAS	51
11	ANEXOS.....	57



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

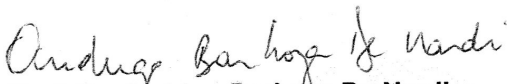


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 019281/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito do grau de condicionamento sobre a expressão de transportadores monocarboxilatos em equinos Brasileiro de hipismo"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de setembro de 2013.

Jaboticabal, 06 de setembro de 2013.


Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE MONOCARBOXILATO MCT1 E SUA PROTEÍNA AUXILIAR CD 147 EM HEMÁCIAS DE EQUINOS DE SALTO

RESUMO

Avaliou-se a expressão do transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) e sua proteína auxiliar CD147 nas hemácias de equinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH) e de raças européias selecionadas para as mesmas modalidades. Utilizou-se 29 equinos, 16 da raça BH divididos em dois grupos segundo o histórico de competições em provas da modalidade salto, grupo de desempenho inferior (DI, $n=8$) e grupo de desempenho superior (DS, $n=8$) esta divisão foi confirmada pelo cálculo do Custo de Frequência Cardíaca (C_{FC}) e Custo de Lactato (C_{LAC}) e 13 equinos de origem européia que foram classificados como grupo Elite devido ao histórico de participação em provas com maiores alturas que os BHs. Com os BHs foram realizados dois testes um de velocidades incrementais (TVI) e um teste de saltos incrementais (TSI) onde valores de frequência cardíaca (FC) e lactato foram avaliados antes e após os testes, assim como sangue para a realização do *Western Blot*, o sangue dos animais Elite foram coletados antes e após a Copa São Paulo de hipismo. Houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) nos C_{FC} e C_{LAC} entre os grupos DI e DS no TSI e o mesmo não encontrado para o TVI. Em relação a expressão do MCT1 e CD147, houve diferença ($p \leq 0,05$) nos valores basais entre os BHs e o grupo Elite, não foram encontradas diferenças nas expressões entre os grupos DI e DS em quaisquer períodos de avaliação e o grupo Elite apresentou maior expressão ($p \leq 0,05$) de CD147 após a prova de hipismo. Concluiu-se que os BHs possuem maior expressão de MCT1 e CD147 quando comparados com raças européias e que estas expressam mais as proteínas estudadas após uma sessão aguda de esforço.

Palavras-chave: CD147, Equino, Exercício, Hipismo, Lactato, Transportador de Monocarboxilato 1.

EXPRESSION OF MONOCARBOXYLATE TRANSPORTER MCT1 AND ITS AUXILIARY PROTEIN CD 147 IN SHOW JUMPING HORSES ERYTHROCYTES

ABSTRACT

We evaluated the expression of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and its ancillary protein CD147 in equine erythrocytes of Brazilian (BH) and European show jump horses. We used 29 horses, 16 of BH breed divided into two groups according to his historical show jump competitions, group underperformed (DI, $n = 8$) and group of superior performance (DS, $n = 8$) this division was confirmed by calculating the Cost of Heart Rate (C_{FC}) and Cost of Lactate ($CLAC$) and 13 horses of European origin which were classified as Elite group due to the history of participation in events with greater heights than BHs. The BHs were tested twice, with a incremental speeds test (TVI) and a test of incremental jumps (IST) where values of heart rate (HR) and lactate were evaluated before and after the tests as well as blood for the Western blot, Elite animals blood were collected before and after Copa São Paulo of show jump. There was a statistical difference ($p \leq 0.05$) in the C_{FC} and C_{LAC} between DI and DS groups in IST, the same was not found for TVI. Regarding the expression of MCT1 and CD147, significant differences ($p \leq 0.05$) at baseline between the BHs and the Elite group, no differences in expression were found between DI and DS groups in any evaluation periods and the Elite group had higher expression ($p \leq 0.05$) of CD147 after the show jump competition. It was concluded that BH's expression of MCT1 and CD147 is higher when compared to European breeds and that they express more CD147 after an acute bout of effort.

Keywords: CD147, Exercise, Horse, Lactate, Monocarboxylate Transporter 1, Showjump.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Provável estrutura do MCT1, representando as duas formas *inside open* e *outside open* com o substrato de ligação e em lados opostos da membrana. Domínio N-terminal em vermelho e domínio C-terminal em azul (HALESTRAP, 2013), reprodução autorizada.....17
- Figura 2.** Hipotético modelo mostrando a estrutura do complexo de transporte MCT1/CD147 MCT1 e CD147, notar o paralelismo entre a terceira hélice transmembrana do MCT1 e o domínio transmembrana da CD147, Mykkänen 2011, reproduzido com autorização.19
- Figura 3.** Ilustração do percurso de 74 metros, contendo 10 obstáculos montados em pista de areia, no qual 16 equinos (DI n=8 e DS n=8) realizaram o teste de saltos incrementais (SOARES, 2012).....23
- Figura 4.** Imagem fotográfica do percurso montado para o Teste de Saltos Incrementais, da pista de areia coberta, localizada na Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN). (SOARES, 2012).....24
- Figura 5.** Imagem fotográfica de um equino Brasileiro de Hipismo (BH) realizando o Teste de Saltos Incrementais (TSI), estágio de 0,40m. Altura evidenciada pela seta. (SOARES, 2012).24
- Figura 6.** Média $\pm$ erro padrão da média do Custo de Frequência Cardíaca (C_{FC}) no teste de saltos incrementais calculadas com a velocidade. * Indica diferença no custo pelo teste t-test de Student ($p < 0,05$), DI (n=8) e DS (n=8).....33
- Figura 7.** Média $\pm$ erro padrão de média do Custo de Frequência Cardíaca (C_{FC}) no teste de saltos incrementais calculadas com a altura, DI (n=8) e DS (n=8).33

Figura 8. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} no teste de saltos incrementais calculadas com a velocidade. * indica maior custo pelo t-test de Student ($p<0,05$), DI (n=8) e DS (n=8).	35
Figura 9. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} no Teste de Saltos Incrementais (TSI) calculadas com a altura. *indica maior custo, DI (n=8) e DS (n=8).	35
Figura 10. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{FC} dos grupos DI e DS nas diferentes velocidades do TVI, DI (n=8) e DS (n=8).....	37
Figura 11. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} dos grupos DI e DS nas diferentes velocidades do TVI, DI (n=8) e DS (n=8).....	38
Figura 12. Em A, detecção de CD 147 e em B, MCT1 pela técnica de Western Blot. Observar a semelhança entre a expressão da proteína CD 147 com o transportadormonocarboxilato1 (MCT1) em equinos da raça BH.,.....	39
Figura 13. Em A, detecção de CD 147 e em B, MCT1 pela técnica de Western Blot. Observar em “1” equino com alta expressão e em “2” equino com baixa expressão.....	39
Figura 14. Média $\pm$ erro padrão da média dos valores basais de MCT1 e CD147 dos grupos DI, DS e Elite. * indica menor expressão, DI (n=8), DS (n=8) e ELITE (n=13).....	40
Figura 15. Média $\pm$ erro padrão de média da expressão de CD147 do grupo Elite (n=13), valores basais e após prova de salto. * indica menor expressão pelo t-test de Student ($p<0,05$).....	41
Figura 16. Média $\pm$ erro padrão de média da expressão de MCT1 do grupo Elite (n=13), valores basais e após prova de salto.....	41

Figura 17. Média $\pm$ padrão de média da expressão de CD147 dos grupos DI (n=8) e DS (n=8), valores basais e após os TSI e TVI.....	42
Figura 18. Média $\pm$ erro padrão de média da expressão de MCT1 dos grupos DI (n=8) e DS (n=8), valores basais e após os TSI e TVI.	42
Figura 19. Gel SDS-PAGE a 10%.Em A: Marcador Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad) B: Equino controle.....	57
Figura 20. Análise das bandas de CD147 em ImageLab (BioRad® versão 4.0).....	57
Figura 21. Análise das bandas de MCT1 em ImageLab (BioRad® versão 4.0).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do teste de saltos incrementais (TSI) realizados por equinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH).	25
Tabela 2. Descrição do teste de velocidades incrementais (TVI) realizados por equinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH).	26
Tabela 3. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{FC} dos grupos DI (n=8) e DS (n=8) nas diferentes etapas do teste TSI.	32
Tabela 4. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} dos grupos DI (n=8) e DS (n=8). nas diferentes alturas do teste de saltos incrementais.	34
Tabela 5. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} dos grupos DI (n=8) e DS (n=8) nas diferentes etapas do TVI.	36
Tabela 6. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{FC} dos grupos DI (n=8) e DS (n=8) nas diferentes velocidades do teste de velocidades incrementais.	37
Tabela 7. Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g g}/\mu\text{L}$) em membranas de hemácias de equinos antes e depois teste de saltos incrementais.	59
Tabela 8. Classificação dos animais segundo Mykännén (2010), para valores basais	60
Tabela 9. Classificação dos animais segundo Mykännén (2010), para valores após TSI e prova de salto.	61

Tabela 10. Classificação dos animais segundo Mykannen (2010), para valores após TVI.....	62
---	----

1 INTRODUÇÃO

É conceito clássico na literatura que durante o exercício intenso a utilização de energia pela musculatura esquelética excede a capacidade de produção de ATP predominantemente pela via aeróbia. Para que o exercício prossiga, há necessidade de que maior proporção de ATP seja produzida pela via glicolítica anaeróbia, o que aumenta a concentração muscular de lactato e íons H^+ .

O lactato e o íon H^+ produzidos, em decorrência da contração muscular, são formas dissociadas do ácido láctico, que em pH fisiológico, está quase que totalmente dissociado. Estas substâncias dissociadas precisam ser transportadas. Os principais transportadores são um grupo de proteínas denominadas de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), que transportam simultaneamente os aníons lactato e os prótons H^+ (HALESTRAP, 2013).

No exercício, o lactato e o íon H^+ são transportados da fibra muscular para o compartimento plasmático e deste, 50% podem sofrer influxo para as hemácias (PÖSÖ, 2002). Este mecanismo sustenta um gradiente de concentração entre os músculos e plasma (MYKKÄNEN et al., 2010), favorecendo a remoção muscular de lactato. Este processo biológico facilita o transporte de lactato junto com os íons H^+ através das membranas plasmáticas contribuindo efetivamente com a regulação do pH muscular durante o exercício. Desta forma, nos equinos, as hemácias podem ter a função de dissipador de lactato e H^+ (PÖSÖ et al., 1995; VÄIHKÖNEN & PÖSÖ, 1998). Este conceito

está baseado no fato que na espécie equina 50% do lactato sanguíneo está contido nas hemácias (VÄIHKÖNEN et al., 1999), enquanto que o valor correspondente para espécie humana está em torno de 17% (JUEL et al., 1990).

Na espécie equina, o principal transportador de lactato nas hemácias é a isoforma 1 (MCT1) e sua proteína auxiliar CD 147 (KOHO et al., 2002, KOHO et al., 2006). Baseado na expressão destes transportadores, MCT1 e CD 147, nas membranas das hemácias, os equinos podem ser distribuídos em dois grupos, sendo um de baixa atividade de transporte e expressão (BATE) e outro de alta atividade de transporte e expressão (AATE) (KOHO et al., 2002). Finalmente, o tipo de atividade é correlacionado com a quantidade (expressão) da proteína CD 147, que é distribuída de modo bimodal nas membranas das hemácias (VÄIHKÖNEN & PÖSÖ 1998, VÄIHKÖNEN et al., 1999, VÄIHKÖNEN et al., 2001, KOHO et al., 2002, KOHO et al., 2006, MYKÄNNEN et al., 2010a).

No que tange os esportes equestres, alguns estudos determinaram a expressão na membrana de hemácias tanto do MCT1 como da CD 147. Cavalos e éguas de trote (*Standardbred*) revelaram expressão de ambas às proteínas, entretanto nenhum indivíduo expressou a isoforma 4 (MCT4) (KOHO et al., 2002). Adicionalmente, um estudo (MYKÄNNEN et al., 2010a) determinou a expressão da MCT1 e CD 147 de equinos trotadores, de corrida (PSI) e cavalos corredores Filandeses (*Finnhorses*), sendo que os autores encontraram alta capacidade de transporte e expressão nas três raças, com maior proporção no PSI, seguido pelos *Finnhorses*. Não existem, até este momento, estudos com transportadores monocarboxilatos em raças especializadas em salto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui o segundo maior rebanho de equinos da América Latina e a quarta maior tropa de equinos do mundo, com uma população de 8 milhões de cabeças (FAO, 2012). A criação nacional possui grande destaque no cenário mundial, e não raro, os equinos e cavaleiros brasileiros conquistam importantes resultados em competições internacionais.

Em 2016 serão realizados no estado do Rio de Janeiro os jogos olímpicos de verão, evento este que conta com quatro modalidades esportivas que utilizam os cavalos como atleta: as modalidades de salto, adestramento, concurso completo de equitação (CCE) e pentatlo moderno.

Contidas dentro do que é conhecido como hipismo clássico, estão justamente as modalidades olímpicas: salto, adestramento e CCE, ainda por sua vez, o salto é uma das provas que compõem o pentatlo moderno e o CCE.

Isto posto, fica evidente a importância de pesquisas com raças nacionais, principalmente com a Brasileiro de Hipismo (BH), que visem um melhor entendimento das respostas fisiológicas envolvidas durante o esforço específico desta raça, ou seja, o salto. Importante informar que para outras raças, também utilizadas nos esportes clássicos, o número de estudos com fisiologia do exercício é relativamente escasso.

Quando submetido ao exercício, o organismo do cavalo lança mão de uma série de respostas fisiológicas, que visam permitir a continuidade do esforço pelo animal.

Tais respostas aumentam a oferta de oxigênio (O_2) e aporte de nutrientes aos músculos e ao mesmo tempo, distribuem para a metabolização ou eliminação os produtos resultantes do metabolismo.

Para que haja trabalho por parte dos atletas da espécie equina, faz-se necessário que exista uma fonte de adenosina trifosfato (ATP) (EVANS, 2002).

Ocorrendo sempre concomitantemente, as vias metabólicas para a produção de ATP, são didaticamente distribuídas em três; via da fosfocreatina, via aeróbia e a anaeróbia, sendo a predominância de uma relação às outras, determinada pelo grau de condicionamento, intensidade e duração do esforço.

Primeiramente, ocorre a utilização da energia armazenada nos estoques intramusculares de ATP e creatina fosfato, fase esta chamada de fase alática da produção anaeróbia de energia. Inicialmente, estes estoques de ATP são restabelecidos pela via glicolítica e posteriormente pela via aeróbia (SPURWAY, 1992).

Os músculos dos equinos utilizam ácidos graxos livres e glicose presentes na corrente sanguínea e o glicogênio muscular como substratos energéticos durante exercícios aeróbios (MYKKÄNEN, 2011). Ácidos graxos e o piruvato, este formado pela oxidação da glicose e do glicogênio, são convertidos a acetil-CoA, que participa da formação dos transportadores de elétrons de nicotinamida e adenina dinucleotídeo (NADH) e o flavina adenina dinucleotídeo ($FADH_2$) no ciclo do ácido tricarboxílico. Submetidos a fosforilação oxidativa no interior da membrana mitocondrial, o glicogênio e a glicose formam dióxido de carbono, água e ATP (HENDERSON, 2013). Entretanto, este mecanismo é relativamente lento e dependente da demanda de oxigênio, além do que, o número de

mitocôndrias nas fibras musculares é um fator limitante na produção de ATP por esta via (NELSON & COX 2008; MYKKÄNEN, 2011).

Em exercícios de alta intensidade, a demanda por ATP cresce, e tal exigência já não é mais suprida pela via aeróbia. Desta maneira, para a ressíntese do ATP, a via anaeróbia torna-se preponderante. A taxa de glicogenólise e glicólise anaeróbia, que são as principais produtoras do anión lactato e prótons H^+ , aumentam em decorrência ao incremento do esforço, durante a contração muscular.

Não há dúvida que a principal fonte produtora de íons lactato e H^+ durante o exercício é a musculatura esquelética estriada. Até o momento, são conhecidos cinco tipos de fibras musculares nos cavalos (3 puras e 2 híbridas), o que as diferencia são suas respectivas capacidades de contração e oxidação (LEISSON et al., 2011).

Mais especificamente, a classificação dos diferentes tipos de fibras musculares leva em consideração as características contráteis e metabólicas, influenciadas pela quantidade de mitocôndrias presentes nas fibras e pela isoforma de ATPase, em conjunto com a avaliação da cadeia pesada de miosina (MyHC) (McARDLE, 2003, POWERS & LOWLEY 2004, FRANCISCO et al., 2011).

Durante o descanso (SNOW & VALBERG, 1994) e trabalho leve, as fibras musculares que apresentam as isoformas MyHCI de cadeia pesada de miosina (fibra do tipo I), são as mais requisitadas e produzem ATP pela via aeróbia para satisfazer sua demanda por energia (MYKKÄNEN, 2011).

As fibras do tipo I, também conhecidas como fibras de contração lenta, geram energia para a ressíntese do ATP predominantemente pelo sistema aeróbio de transferência de energia, tais fibras possuem uma atividade lenta da enzima ATPase, possuem uma menor capacidade de mobilização do cálcio, velocidade de encurtamento mais lenta, menor capacidade glicolítica do que as fibras Tipo II, porém, possuem mais mitocôndrias (McARDLE et al., 2003) acarretando em alta capacidade oxidativa. Essas fibras são envolvidas por mais capilares do que quaisquer outros tipos de fibras e possuem maior quantidade de mioglobina que as fibras tipo II, tudo isso garante a ela uma grande capacidade de metabolismo aeróbio e alta resistência à fadiga (POWERS & LOWLEY, 2004).

Cavalos de enduro, com uma maior capacidade de desempenho em provas de resistência, apresentam uma porcentagem maior de fibras do tipo I e IIA no músculo glúteo médio (músculo de eleição para tipificação celular) e por consequência, maior teor relativo de miosina de cadeia pesada dos tipos MyHC I e MyHC IIA, com menor quantidade das MyHC IIX (LEISSON et al., 2011).

Os tipos celulares que expressam as isoformas MyCHIIA (fibra tipo IIA) e MyCHIIX (fibra tipo IIX) da cadeia pesada de miosina (RINO, 2010) são ativados em exercícios de alta intensidade e o piruvato não entra no ciclo do ácido tricarboxílico, sendo dessa maneira, reduzido a íons lactato e H^+ (NELSON & COX, 2008, MYKKÄNEN, 2011).

Com menor quantidade de mitocôndrias e maior metabolismo glicolítico, as fibras do tipo II são menos resistentes a fadiga do que as fibras tipo I, possuem uma maior capacidade de transmissão eletroquímica dos potenciais de

ação, maior atividade da miosina ATPase, rápida liberação e captação de cálcio e uma alta taxa de renovação das pontes cruzadas (McARDLE, 2003). Com essas características, as fibras tipo II possuem uma velocidade de encurtamento três a cinco vezes mais rápida do que as fibras tipo I (McARDLE, 2003). Por consequência produzem maior quantidade de lactato e íons H^+ intracelularmente, que devem ser transportados para o fluido extracelular.

As fibras rápidas são ainda distribuídas em dois outros tipos; fibras IIA caracterizadas como fibras de contração rápida possuem tanto metabolismo oxidativo (alta concentração da enzima aeróbia desidrogenasesuccínica) como glicolítico (alta concentração da enzima anaeróbia fosfofrutocinase), sendo assim, considerada uma fibra intermediária com alta capacidade de adaptação. Isto faz com que ela seja capaz de elevar sua capacidade oxidativa perante um treinamento de resistência, a valores próximos as das fibras tipo I (McARDLE, 2003, POWERS & LOWLEY, 2004). As fibras IIX apresentam uma diminuição no número de mitocôndrias, são as fibras mais rápidas na velocidade de encurtamento, porém as mais facilmente fatigáveis. O grande número de enzimas glicolíticas garante a esse específico grupo de fibras, uma grande capacidade de trabalho em condições anaeróbia. (POWERS & LOWLEY, 2004).

Estudos com a raça Brasileiro de Hipismo (BH) D'ANGELIS et al., 2008a e 2008b e D'ANGELIS et al., 2009 concluíram que o cavalo BH possui, no músculo *Gluteus medius*, aproximadamente 80% de fibras que utilizam a via glicolítica (tipo IIA e IIX) para a produção de ATP, este músculo é de fundamental importância para a locomoção do animal, por esta razão muito utilizado durante

o salto. Portanto, a raça BH pode ser considerada adequada para o estudo da tríade MCTs-exercício-regulação da acidose induzida por íons lactato e H^+ .

3 CUSTO DE TRANSPORTE: FREQUÊNCIA CARDÍACA E LACTATO COMO DISCRIMINADORES DE DESEMPENHO

Variáveis fisiológicas intensamente estudadas e por este motivo, consagradas na literatura, frequência cardíaca e o lactato, podem ser utilizados juntamente com conceitos relativamente novos para espécie equina como custo de frequência cardíaca (C_{FC}) este, primeiramente proposto para a espécie humana (MORENO, 2007) e custo de lactato (C_{LAC}), para diferenciar indivíduos com diferentes capacidades atléticas.

Com relação à FC, do ponto de vista fisiológico, durante o esforço, a potência aeróbia está relacionada ao débito cardíaco por meio da clássica equação de Fick [$\dot{V}O_2 = \dot{Q} \times (a-vO_2)$]. Devido à significativa participação percentual do débito cardíaco na potência aeróbia máxima ($\dot{V}O_{2max}$), a FC apresenta uma correlação linear com o $\dot{V}O_2$. Esta relação fisiológica também pode ser aplicada nos exercícios submáximos, principalmente na avaliação do trote, galope e no salto.

Juntamente com o incremento da intensidade, velocidade ou duração do exercício, a FC aumenta resultado da ativação simpática, com liberação de catecolaminas e sensibilização de receptores β_1 cardíacos, que provoca aumento do débito cardíaco para atender as necessidades de oxigênio e substrato energético do tecido muscular, bem como para promover eliminação

do dióxido de carbono (SILVERTHORN et al., 2003, POOLE & ERICKSON 2008).

Tendo em vista que o aumento da FC é diretamente proporcional ao aumento da intensidade do exercício (EVANS, 2000; EVANS 2008), e justificando que em testes incrementais o volume de oxigênio (VO_2) depende do débito cardíaco (DC), MORENO (2007) propôs o cálculo de Custo de Frequência Cardíaca (C_{FC}) como sendo uma análise simples na avaliação e diferenciação do grau de condicionamento, onde um menor custo seria indicativo de melhor condicionamento, o conceito de custo pode ser utilizado para outras variáveis fisiológicas, sendo o mais comum na literatura de fisiologia do exercício equina o custo de transporte (*net transport cost*) que é o custo cardiovascular e metabólico que o cavalo desloca uma unidade de peso por determinada unidade de distância (WILLIAMS, 2009, PICCIONE, 2013).

Obtendo assim valores pontuais que nos mostram o custo de tais variáveis em cada velocidade ou altura analisada.

Após seis meses de treinamento OMUHA et al (2013), encontraram uma redução de 4,6% na FC dos cavalos treinados, mostrando como um aumento no condicionamento é seguido de uma diminuição da FC quando comparados aos valores da FC pré-treino nas mesmas velocidades, tal achado é condizente com Evans (2008) onde o autor afirmou que um aumento de condicionamento desloca a curva da FC para direita num gráfico de velocidade versus FC, sendo o mesmo verdadeiro para as concentrações de lactato (EVANS, 2008). PILEGAARD et al (1999a) encontraram um aumento de 12% na remoção de lactato após oito semanas de treinamento em humanos. Por esse deslocamento

da curva a direita, os resultados dos C_{FC} e C_{LAC} serão menores em grupos ou indivíduos possuidores de melhor condicionamento.

Importante informar que, nesta dissertação, o C_{FC} e o C_{LAC} foram usados exclusivamente para verificar a diferença no condicionamento aeróbio entre animais de desempenho superior (DS) e desempenho inferior (DI), sendo que não foi possível calcular estas variáveis para os animais do grupo Elite. A formação dos grupos experimentais será explicada no item Materiais e Métodos.

4 Bioenergética: fonte de íons lactato e H^+

Os principais fatores que regulam a predominância metabólica durante o exercício físico são: tipo, volume e intensidade da atividade, fatores nutricionais, genéticos e treinamento (FROLLINI et al., 2008).

O efluxo de lactato é extremamente importante para células ou tecidos que geram grandes quantidades de íons hidrogênio. Hemácias, glóbulos brancos, células tumorais e as fibras musculares IIA e IIX (RINO, 2010, MERZHSKAYA & FISHBEIN, 2008), por características fisiológicas próprias explicadas anteriormente, produzem grande quantidade de íons lactato e H^+ durante exercícios de alta intensidade. Já o influxo do lactato é de fundamental importância para tecidos que o consomem. Cérebro, miocárdio e células musculares esqueléticas, marcadamente as tipo I (RINO, 2010) o utilizam como combustível respiratório via piruvato, o fígado o utiliza como substrato para a gliconeogênese e em situações de inanição, o lactato atua como substrato pela via glicerol-neogênica no tecido adiposo branco (MERZHSKAYA &

FISHBEIN, 2009) e pode ser ressintetizado a novas unidades de carboidratos (SPURWAY, 1992).

A predominância de uma via metabólica em determinado momento depende em parte da capacidade física e da intensidade e duração do exercício. MUÑOZ et al. (1999) ressaltaram que as vias da creatina fosfato e glicolítica são mecanismos importantes para geração de energia muscular durante o exercício de equinos, principalmente em esforços de potência como o salto. Adicionalmente, EATON (1994) relatou que em níveis relativamente inferiores de condicionamento ou à medida que a intensidade do exercício aumenta, uma maior quantidade de lactato é produzida, pois uma maior proporção de energia é suprida pela glicólise anaeróbia.

Cabe enfatizar que é clássica a afirmação de muitos autores que o ácido láctico é o produto final da glicólise anaeróbia (ROBERGS, 2001). Entretanto, como a constante de dissociação do ácido láctico (PK_a) é de 3,86 a maioria do ácido láctico presente nos líquidos corpóreos, na faixa de pH fisiológico, se encontra na forma ionizada, dissociado no anión lactato e em prótons (H^+). Sob condições aeróbias, a glicólise forma piruvato que é transportado para o interior da matriz mitocondrial e convertido em acetil coenzima A (CoA) que funciona como um substrato no ciclo do ácido tricarboxílico produzindo os transportadores de elétrons NADH e $FADH_2$. Durante o exercício, na fosforilação oxidativa, tanto o NADH e $FADH_2$ são oxidados para produzir adenosina trifosfato (ATP) para a demanda energética da fibra muscular. Se a utilização de ATP é alta, a taxa de glicólise excede a capacidade mitocondrial em oxidar o piruvato que é posteriormente reduzido a lactato via enzima lactato desidrogenase (LDH). Uma

razão NADH/NAD⁺ elevada devido à redução do NAD⁺ (nicotinamida e adenina dinucleótido) a NADH via reação da desidrogenase gliceraldeído, favorece a formação de lactato. Na produção de lactato, o NADH é oxidado em NAD⁺ que é essencial para manter a alta taxa de glicólise. Nas hemácias, que não possuem mitocôndrias, ocorre somente a glicólise anaeróbia para produção de energia. Entretanto, todos os tecidos são dependentes da via energética glicolítica durante a hipóxia ou isquemia ou quando a capacidade oxidativa da célula é excedida (NELSON & COX, 2008).

O lactato e o H⁺ produzidos são removidos a partir do líquido intracelular, sendo esse mecanismo de remoção e liberação uma etapa primordial no controle da acidose intracelular. Sabe-se hoje que o lactato é não somente um metabólito da via anaeróbia de produção de energia, mas sim um importante fator de coordenação celular e substrato do metabolismo energético durante o exercício (PHILIP et al., 2005). O lactato circulante na corrente sanguínea durante o exercício serve de substrato energético para a via aeróbia das fibras musculares esqueléticas tipo I e para a fibra cardíaca, além de entrar no ciclo de Cori no fígado e ser metabolizado novamente a glicose (MURIEL, 2007).

Durante a realização do exercício, o lactato é um dos produtos do metabolismo anaeróbio muscular que é produzido em qualquer tipo de esforço, sendo que seu aumento na circulação sanguínea ocorre tanto pelo aumento da necessidade da glicólise anaeróbia para produção de ATP, como da limitação na disponibilidade de oxigênio para oxidação do piruvato na mitocôndria.

Desta maneira, a relação entre a concentração de lactato e a velocidade ou intensidade do esforço, obtida durante a realização de competições ou a

partir de testes de esforço (FERRAZ et al., 2008), pode determinar a situação na qual há um aumento, por vezes exponencial, de suas concentrações plasmáticas ou sanguíneas quando a contribuição da energia obtida de maneira aeróbia, começa a ser insuficiente frente aos requerimentos energéticos totais.

4.1 Transportadores de Monocarboxilatos

O aumento da concentração sanguínea de íons H^+ reduz o pH provocando acidose, que é apontada como um dos fatores de fadiga (KOHO et al., 2002). Para se evitar uma acentuada redução do pH e retardar a fadiga, aumentando assim a capacidade de trabalho, prótons (H^+) juntamente ao íon lactato são co-transportados do músculo tanto para o espaço intersticial como para o plasma. O ácido láctico não dissociado pode atravessar a membrana por difusão, mas como a maior parte deste ácido está dissociado em lactato, este é facilmente distribuído pelos fluidos corpóreos, por esta razão há necessidade de transportadores protéicos (PÖSÖ, 2002).

Entre as diversas proteínas transportadoras destacam-se os transportadores monocarboxilatos (MCTs) que carregam lactato e H^+ através das membranas celulares sendo que a atividade dos MCTs é estimulada por reduções no pH e aumento da temperatura (VÄIHKÖNEN et al., 1999).

Estudos verificaram a expressão de MCT 1 e sua proteína auxiliar CD147 em equinos de trote e corrida (KOHO et al., 2002, KOHO et al., 2006). Existem poucos trabalhos com cavalos de hipismo clássico, ou são praticamente

inexistentes as informações científicas sobre a expressão dos transportadores de monocarboxilatos em equinos destinados a estas modalidades.

De fundamental importância para a continuidade da atividade física, a dinâmica do lactato é intimamente dependente de proteínas, denominadas transportadores de monocarboxilatos (MCTs), sendo que atualmente, são conhecidas 14 isoformas desta família de proteínas (HALESTRAP, 2013).

Possuindo uma característica de transporte denominada de bimodal (KOHO et al., 2002), a expressão de MCTs e CD147 nos permite distribuir os equinos em duas categorias elementares: os de baixa atividade de transporte e expressão (BATE) e os de alta atividade de transporte e expressão (AATE), sendo que as expressões dessas proteínas na fibra muscular esquelética podem ser moduladas pelo tipo de treinamento (KITAOKA et al., 2011).

Já a capacidade de transporte do lactato na membrana das hemácias é muito mais influenciada pela expressão de CD147 do que dos MCT1 e 4 (KOHO et al., 2006) e dificilmente se altera com os estímulos agudos ou crônicos caracterizados por sessão única de esforço ou programas de treinamento, respectivamente.

O metabolismo de um organismo utiliza e produz vários ácidos monocarboxilatos, e quase a totalidade é dissociada em seus respectivos aníons quando em pH fisiológico (HALESTRAP, 2013). Quantitativamente os mais importantes são o piruvato e o L-lactato, que possuem papel primordial no metabolismo de carboidratos, gorduras e aminoácidos.

Relativamente ao metabolismo do lactato, este, pode ser convertido a piruvato, assim que as condições de aerobiose sejam restabelecidas, ou pode

ainda ser eliminado (HENDERSON, 2013). Como comentado anteriormente, durante exercícios intensos, que exigem altas velocidades ou contração de grandes grupamentos musculares, a utilização de energia pelas fibras musculares ultrapassa a capacidade aeróbia de produção de ATP, dessa forma a demanda por energia é suprida pela via anaeróbia o que acarreta aumento na produção de lactato e íons H^+ .

O termo isoforma indica proteínas que são semelhantes, mas não idênticas, os MCTs são proteínas de membrana, relacionadas entre si por sequência homóloga (MEREZHINSKAYA & FISHBEIN, 2009). Derivando dos mesmos genes, possuem formas distintas provocadas por processos alternativos de maturação do RNA (PAS et al., 2004). Este fenômeno é fundamental para entendermos os processos de adaptação celular ao exercício, uma vez que as isoformas são semelhantes o suficiente para substituírem umas as outras, mas também diversificadas o suficiente para apresentarem propriedades funcionais distintas.

Os primeiros quatro membros da família, MCT1, MCT2, MCT3 e MCT4, transportam substâncias alifáticas, incluindo importantes metabolitos, como o lactato, piruvato, corpos cetônicos, grupos cetoácidos e tais transportes independem do ATP (MEREZHINSKAYA & FISHBEIN, 2009, FROLLINI et al., 2008), no caso do lactato, ocorre devido a trocas de cargas entre o lactato e o H^+ e resíduos de aminoácidos presentes no MCT1 (HALESTRAP, 2013).

O MCT1 é a isoforma mais abundante, presente na maioria dos tecidos é também a isoforma mais estudada (HALESTRAP & MEREDITH 2004, MEREZHINSKAYA & FISHBEIN, 2009), ainda as isoformas MCT1 e MCT4 são,

juntamente com a proteína auxiliadora CD147, a chave para o transporte do lactato no músculo esquelético.

4.2 Transportador de Monocarboxilato1

A isoforma MCT1 está presente nas hemácias, sendo correlacionada com o conteúdo mitocondrial muscular. É também encontrada em quantidade significativa na membrana sarcolemal das fibras oxidativas, em cavalos as fibras tipo I e IIA (FROLLINI et al, 2008) e no coração (BÖNEN et al., 2000a). Já a isoforma MCT4 encontra-se, predominantemente expressa na membrana sarcolemal das fibras glicolíticas, fibras tipo IIX (KOHO et al., 2006, KITAOKA et al., 2011).

Dependendo da intensidade e duração do exercício, modalidade equestre e grau de condicionamento pode haver considerável acúmulo de lactato e íons H^+ no sarcoplasma, sendo que estes íons podem ser transportados para o plasma, e posteriormente, para o interior das hemácias e outros tecidos como miocárdio e fígado. A continuidade do fluxo do íon H^+ e lactato é determinada principalmente pelo gradiente de concentração através da membrana plasmática destes tecidos (MYKKÄNEN et al., 2010a).

O tipo de programa de condicionamento físico influencia a expressão muscular das proteínas MCTs, podendo favorecer a regulação do pH por uma maior eficiência no transporte do lactato, mantendo assim a contração muscular (KITAOKA et al., 2011).

O MCT1 possui basicamente a seguinte estrutura, terminais C e N intracelulares juntamente com 12 hélices transmembrana com domínios C e N distintos, cada domínio possui 6 hélices transmembrana que são conectadas por um grande laço entre as hélices 6 e 7, o MCT1, observado na Figura 1, ainda apresenta como estrutura provável, duas faces; a voltada para o citosol (*inside open*) e a voltada para o substrato (*outside open*) extracelular (HALESTRAP & PRICE, 1999, HALESTRAP, 2013).

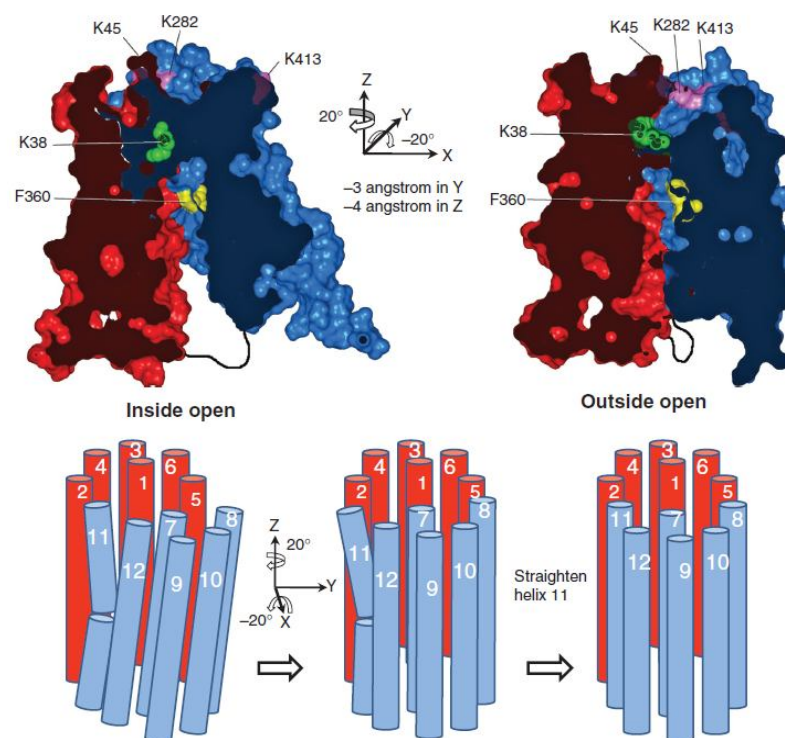


Figura 1. Provável estrutura do MCT1, representando as duas formas *inside open* e *outside open* com o substrato de ligação e em lados opostos da membrana. Domínio N-terminal em vermelho e domínio C-terminal em azul (HALESTRAP, 2013), reprodução autorizada.

O influxo de lactato para os tecidos diminui a lactatemia sendo que o efluxo muscular aumenta, pois é direcionado pelo gradiente de concentração músculo-plasma. No cavalo, o espaço intracelular das hemácias é

especialmente importante, pois durante o exercício devido à contração esplênica, 60% do volume sanguíneo pode ser formado por hemácias. Estas possuem MCTs ativos nas suas membranas plasmáticas, principalmente a isoforma 1 com peso molecular em torno de 76 a 80 kDa, sendo que esta é auxiliada pela proteína CD147 que possui peso molecular de aproximadamente 45 a 52 kDa e contribui para a retirada de lactato do plasma (KOHO et al., 2002, MYKKÄNEN et al., 2010).

4.3 Proteína auxiliadora CD147

CD 147 é uma abreviação do termo em inglês *Cluster of Differentiation* 147, e dependendo da espécie estudada pode receber os seguintes nomes; *basigin*, *M6*, *extra cellular matrix metalloproteinase inducer* (EMMPRIN), *neurothelin* (MYKKÄNEN, 2011), OX-47 e HT7 (WILSON, 2002) é uma proteína transmembrana categorizada como um membro da superfamília de imunoglobulinas denominada IgSF (IACONO et al, 2007, MURAMATSU & MIYAUCHI, 2003), que no cavalo apresenta cerca de 45 kDa. A CD 147 forma, juntamente com o MCT1 ou MCT4, um eficiente complexo de transporte de lactato.

A estreita relação entre CD147 e MCT1/MCT4, é demonstrada pela existência de características estruturais comuns, incluindo sítios de ligação de imunoglobulinas, uma cauda C-terminal citoplasmática curta, e um único domínio transmembrana. Tal domínio apresenta na CD147 24 resíduos de aminoácidos (WILSON et al., 2002, IACONO et al., 2007), possui ainda 187 resíduos em seu

domínio extramembrana e 40 em seu domínio citoplasmático (IACONO et al., 2007). Anticorpos anti-CD147 co-imunoprecipitam MCT1 e MCT4, mas não MCT2 (WILSON, 2002) e todos os tecidos que expressam MCT1 e MCT4, a CD147 é marcada exatamente no mesmo local (WILSON, 2002) por volta de 45 kDa.

O modelo tridimensional da CD147, que pode ser visto na Figura 2, sugere que seu domínio transmembrana localiza-se paralelamente a terceira hélice transmembrana do MCT1 no complexo de transporte (MANOHARAN et al. 2006).

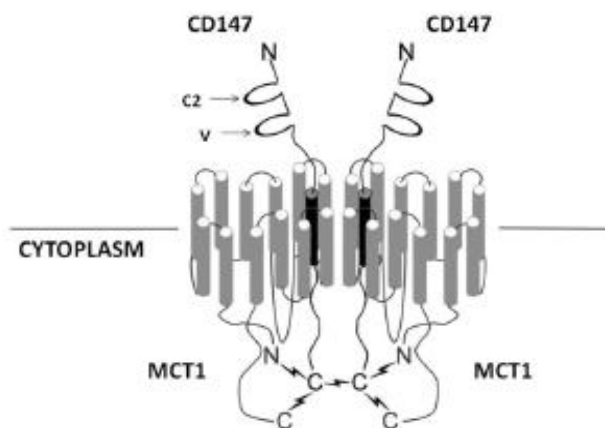


Figura 2. Hipotético modelo mostrando a estrutura do complexo de transporte MCT1/CD147. MCT1 e CD147, notar o paralelismo entre a terceira hélice transmembrana do MCT1 e o domínio transmembrana da CD147, Mykkänen 2011, reproduzido com autorização.

O transporte de lactato é correlacionado com a quantidade de CD147, que a exemplo do MCT1, também possui distribuição bimodal nas hemácias (KOHO, 2002, MYKÄNNEN, 2010). A alta ou baixa capacidade de transporte é mais regulada pela maior ou menor expressão de CD147 do que pela expressão de MCT1 (KOHO, 2006).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo

Quantificar a expressão do transportador monocarboxilato 1 (MCT1) e sua proteína auxiliar CD 147 de equinos de salto com diferentes aptidões aeróbias.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais e manejo

Utilizaram-se vinte e nove equinos, sendo 16 da raça BH, machos e fêmeas, com idade de 11 ± 3 anos, peso de 490 ± 53 Kg, altura de $1,59 \pm 0,09$ praticantes da modalidade salto, pertencentes ao Exército Brasileiro (EB) e estabulados na Academia Militar das Agulhas Negras, Resende – RJ, latitude -22,4709659, longitude -44,4513347 e altitude de 396,4 m. O manejo nutricional diário foi constituído por volumoso à vontade e concentrado comercial correspondente a 1% do peso corpóreo. Os animais foram submetidos a um exame clínico completo, além de hematológico e bioquímico objetivando-se determinar a higidez necessária para a participação do experimento.

Os outros 13 equinos foram de raças européias de salto sendo, 2 da raça Sela Belga, 2 Honoverianos, 2 Holsteiners, 1 Warmblood, 6 da raça Sela

Holandês, com idade de 10 ± 4 anos, peso corpóreo de 550 ± 50 Kg. Estes equinos participaram competições de salto, nível profissional, alojados em baias individuais, na Sociedade Hípica Paulista (São Paulo/SP) latitude -23,6062002, longitude -46,6872218 e 731 metros acima do nível do mar. O manejo nutricional diário consistia de ração comercial para equinos (Omolene, Equisul, Guabi) 1% do peso corpóreo, duas vezes ao dia (6h e 15h), feno de alfafa pela manhã, feno de *coast-cross* e capim fresco de *coast-cross* no final da tarde, totalizando 6kg de volumoso/dia.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da FCAV/UNESP (CEUA, Processo: 019281/13).

6.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais, sendo um de desempenho inferior (DI, n=8); outro de desempenho superior (DS, n=8) e outro de equinos profissionais (ELITE, n=13), de acordo com o histórico de participação em provas da modalidade salto.

Os equinos com histórico de participação somente em provas na categoria Amador, nível Escola de Equitação, com obstáculos de altura máxima de 1,00 m, foram classificados como sendo do grupo DI; os com histórico de participação nos últimos dois anos em provas na categoria Sênior, nível Concurso de Salto Nacional (CSN) e Concurso de Salto Nacional uma estrela (CSN 1), com obstáculos com alturas máximas de 1,10 e 1,20 m, foram classificados como sendo do grupo DS.

Já o grupo ELITE foi composto por equinos que participaram de provas entre 1,35 a 1,50 m (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE HIPISMO, 2012).

Quatro ginetes montaram somente os cavalos BHs nos testes de saltos e de velocidades incrementais (TSI e TVI, respectivamente), sendo todos instrutores profissionais, possuidores do curso de pós-graduação *latu sensu* “Instrutor de Equitação”, da Escola de Equitação do Exército, Rio de Janeiro – RJ. Os cavaleiros possuíam altura entre 1,75 e 1,83m, peso entre 75 e 83 Kg e foram distribuídos nas montarias aleatoriamente.

6.3 Teste de saltos incrementais

Inicialmente é importante ressaltar que todos os testes de esforços realizados como estímulo para o estudo da expressão do transportador MCT1 e a proteína CD 147 foram concebidos num estudo prévio (SOARES, 2012), realizado no LAFEQ com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo: 2011/11080-8).

Somente os equinos dos grupos DI e DS participaram do teste de saltos incrementais (TSI) que foi conduzido em pista de areia coberta com dez obstáculos dispostos em duas fileiras, totalizando um percurso de 74 metros. Os obstáculos permaneceram 3 metros equidistantes entre si (Figura 3). O TSI foi realizado no período da manhã, com temperatura do ar média de 23,5 °C e umidade relativa do ar (UR) média de 73,5% figura 4 e figura 5.

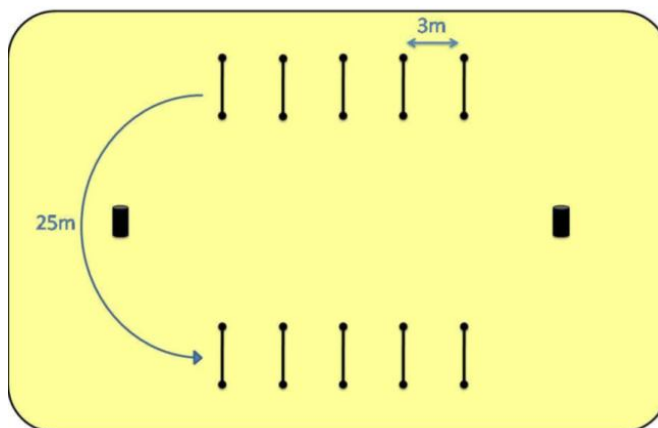


Figura 3. Ilustração do percurso de 74 metros, contendo 10 obstáculos montados em pista de areia, no qual 16 equinos (DI n=8 e DS n=8) realizaram o teste de saltos incrementais (SOARES, 2012).

Após um aquecimento prévio que consistiu em cinco minutos de passo e cinco minutos de trote, foi realizado o TSI, que teve um total de 120 saltos distribuídos em 3 etapas de exercícios, sendo cada etapa com alturas crescentes de 40 cm, 60 cm e 80 cm, em obstáculos montados em “X” simples, a altura do salto foi o ponto onde havia a intersecção das duas varas (observar seta na Figura 5).

O intervalo entre as etapas foi de 3 minutos em repouso, momento no qual foi realizada a coleta de amostras sanguíneas. A frequência cardíaca (FC) foi aferida com frequencímetro digital¹ instalado nos animais e analisadas em *software* específico². O valor da FC utilizado foi o valor encontrado imediatamente após o término de cada estágio.

¹ Equine RS800CX G3, Polar Electro, Finlândia.

² Polar Pro Trainer Equine Edition, Polar Electro, Finlândia.



Figura 4. Imagem fotográfica do percurso montado para o Teste de Saltos Incrementais, da pista de areia coberta, localizada na Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN).



Figura 5. Imagem fotográfica de um equino Brasileiro de Hipismo (BH) realizando o Teste de Saltos Incrementais (TSI), estágio de 0,40m. Altura evidenciada pela seta. (SOARES, 2012).

Cada equino realizou quatro voltas por etapa, sendo que cada etapa de esforço era composta por 40 saltos, em velocidade constante de 18 km h^{-1} e um

intervalo de três minutos entre cada etapa onde eram coletadas as amostras. O teste está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição do teste de saltos incrementais (TSI) realizados por equinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH).

Estágio	Altura (cm)	Voltas	Saltos	Velocidade (k.h ⁻¹)	Distância (m)
1	40	4	40	18	296
2	60	4	40	18	296
3	80	4	40	18	296
Total	-	12	120	-	888

6.4 Teste de velocidades incrementais

O TVI foi proposto como um teste de exercício submáximo padronizado utilizado para a avaliação da capacidade aeróbia como parte da metodologia específica para avaliação de cavalos de salto, seguindo prescrições contidas na literatura (LINDNER & BOFFI, 2007).

Este teste foi realizado em pista descoberta de areia, com metragem de 400m e nenhum obstáculo. Os estágios tiveram a duração de três minutos e foram realizados nas seguintes velocidades ;9,6, 16,8, 24,0 e 31,2 km.h⁻¹, com um intervalo de dois minutos entre eles. As velocidades foram controladas por monitor dotado de sistema GPS instalado no pulso do cavaleiro além de avisos sonoros dados por pessoa da equipe munida de cronômetro. Um resumo do teste pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2.Descrição do teste de velocidades incrementais (TVI) realizados por equinos da raça Brasileiro de Hipismo (BH).

Estágio	Velocidade (km.h ⁻¹)	Duração (min)	Distância (m)
1	9,6	3	480
2	16,8	3	840
3	24,0	3	1200
4	31,2	3	1560
Total	-	12	4080

O monitoramento da FC e coletas de sangue antes e durante o exercício foram realizadas de maneira análoga ao realizado no TSI, porém as FC dos estágios foram consideradas como sendo a média dos últimos 30s de cada estágio (BITSCHNAU et al., 2010). A coleta de sangue logo após o exercício foi realizada o mais breve possível, dentro de no máximo um minuto após o término do exercício.

O TVI foi realizado em dois dias seguidos, no período da manhã, com temperatura do ar média de 23,4 °C e UR média de 88,5%.

6.5 Prova de Salto

Os equinos do grupo ELITE participaram de provas oficiais de salto relativas ao campeonato Copa São Paulo 2012. A menor e a maior altura destas provas foram de 1,35 e 1,50, respectivamente.

6.6 Determinação do custo de transporte (frequência cardíaca e custo glicolítico)

Utilizados neste trabalho, exclusivamente para a confirmação dos diferentes condicionamentos somente para os grupos DS e DI, os C_{FC} e C_{LAC} foram calculados com as seguintes fórmulas:

$$\text{Para o TSI: } C_{FC} = \frac{(\text{FC na altura} - \text{FC basal})}{\text{Velocidade do teste}} \frac{\text{BPM}}{\text{Km.h}^{-1}}.$$

$$\text{Para o TSI } C_{LAC} = \frac{([\text{lac na altura}] - [\text{lac basal}])}{\text{Velocidade na altura}} \frac{\text{mmol/l}}{\text{Km.h}^{-1}}.$$

$$\text{Para o TVI: } C_{FC} = \frac{(\text{FC no estágio} - \text{FC basal})}{\text{Velocidade no estágio}} \frac{\text{BPM}}{\text{Km.h}^{-1}}.$$

$$\text{Para o TVI } C_{LAC} = \frac{([\text{lac no estágio}] - [\text{lac basal}])}{\text{Velocidade no estágio}} \frac{\text{mmol/l}}{\text{Km.h}^{-1}}.$$

Ainda, durante o TSI foram calculados o C_{FC} e C_{LAC} usando como divisor as diferentes alturas de cada etapa de esforço.

6.7 Coleta de sangue, momentos de coleta e preparação da papa de hemácias

A coleta de sangue, por meio de venopunção jugular, foi realizada antes e imediatamente após o término de cada estágio do TSI e do TVI para quantificação da lactatemia. Realizou-se esta coleta em tubo de pressão negativa com fluoreto de sódio e imediatamente após a coleta, mensurou-se a concentração de lactato plasmático em lactímetro de bancada (YSI 2300 YSI Incorporated, EUA).

A coleta do grupo Elite foi realizada antes do aquecimento dos equinos e 5 a 15 minutos após a prova de salto, sendo que as amostras foram coletas em tubos com EDTA, semelhantes aos utilizados nas coletas dos grupos DS e DI.

Outras duas alíquotas de sangue, uma antes e uma após o final de cada teste, foram coletadas em tubos com pressão negativa com ácido etileno diaminotetracético (EDTA), para a preparação da papa de hemácias, procedimento descrito no item 6.8.

6.8 Preparação para as amostras de *Western Blotting*

Para padronização da técnica, as membranas das hemácias foram isoladas segundo a metodologia preconizada por KÖHÖ et al., (2002). As amostras foram congeladas da seguinte forma: primeiramente foram centrifugadas 10 minutos a 2000g. O sobrenadante foi desprezado, obtendo-se a papa de hemácias, que foi acondicionada em criotubo e conservada no freezer a

-80°C até a realização da técnica de *Western blotting*. O congelamento da papa de hemácias também tem por função a lise das hemácias.

Após esse procedimento, as amostras contendo 1mL de papa de hemácias foram processadas da seguinte forma: primeiramente, foram submetidas a 3 ou 4 lavagens com 35mL de tampão fosfato de sódio (pH 8,0; 5 mM) e centrifugação por 15 minutos, à 4°C e 20000g, obtendo-se assim *pellets* das membranas de hemácias. As amostras foram então ressuspensas em 100µL do mesmo tampão fosfato.

6.9 Determinação da concentração das proteínas das membranas das hemácias

Após lavagem com tampão supracitado e remoção do excesso de hemoglobina, determinou-se a proteína total das membranas das hemácias por meio da técnica do ácido bicinonínico (BCA) utilizando-se Kit comercial (Pierce® BCA ProteinAssay Kit).

Para a realização da técnica de *Western Blotting* é necessário um valor mínimo de 1µg/µL de proteínas totais, os valores de proteína total de hemácias de cada equino estão apresentados na tabela 7(em anexo).

6.10 Preparação e montagem da técnica de *Western Blotting*

As informações sobre o sequenciamento da proteína MCT1 de equinos que foi utilizada para preparação dos anticorpos podem ser verificadas no

GenBank (acesso AY457175.1). A partir da quantidade de proteína total, utilizou-se 40 µg/poço contidas em tampão Laemmli separadas em gel SDS-PAGE 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com albumina sérica bovina (BSA) a 5% diluída em TBST 0,1%. As membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-MCT1. Após esta etapa a membrana foi novamente incubada com anticorpo secundário conjugado anti-coelhoperoxidase (DAKO).

Realizou-se visualização por meio de sistema de captura por quimioluminescência (Fotodocumentador ChemiDoc MP -BiO-RAD®) utilizando-se revelador (BiO-RAD- Immun-Star HRP- Chemiluminescent kit®). Designou-se uma amostra conhecida de um equino com alta expressão de proteína auxiliar CD 147 (KOHO et al., 2002) para ser utilizada como controle em todas as análises. O valor desta amostra controle, em cada “imunoblot”, foi ajustado para 1,0 e cada valor das amostras subsequentes foi expresso em relação ao valor da amostra controle (TAKIMOTO et al., 2013). As bandas foram quantificadas utilizando-se o programa computacional ImageLab (BioRad® versão 4.0).

Em anexo, mostramos respectivamente, o resultado da separação das proteínas das membranas de hemácias pela técnica de eletroforese que pode ser visualizada por meio do gel de SDS 10% Figura , a revelação por quimioluminescência (Fotodocumentador ChemiDoc MP -BiO-RAD®) e a quantificação das bandas pelo programa ImageLab (BioRad® versão 4.0) CD147 representado na figura 15 e MCT1 na figura 16, anexo.

6.11 Análise estatística

Todas as variáveis analisadas foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). As expressões de MCT1, CD147 e os C_{FC} e C_{lac} foram analisados pelo teste estatístico t-test de Student ($p < 0,05$) para a comparação entre os grupos. O C_{FC} e C_{LAC} foram ainda submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido, quando necessário, ao teste de Tukey ($p < 0,05$) para as análises ao longo do tempo dentro do mesmo grupo. Para a comparação das expressões do MCT1 e CD147 dos três grupos utilizou-se análise de variância de uma via ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 Custo de Frequência Cardíaca e Custo de Lactato Plasmático no teste de saltos incrementais.

Todos os valores que geraram as médias apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os resultados do teste de Tukey ($p < 0,05$) estão apresentados nas tabelas, e os gráficos revelam os valores médios pelo teste t-test de Student ($p < 0,05$).

Quando se utilizou a velocidade constante (18 km/h), para determinação do C_{FC} e, em relação ao esforço, tanto para o grupo DI como para o DS observou-se aumento do C_{FC} ($p = 0,001$) (Tabela 3). Para comparação entre os grupos, a figura 6 mostra que houve um C_{FC} menor para o grupo DS sendo os

valores de P iguais 0,04, 0,006, e 0,009 para as etapas 40, 60 e 80cm, respectivamente.

Quando se calculou o C_{FC} levando-se em conta as alturas, como fator de intensidade, ambos os grupos apresentaram custos menores em decorrência do aumento do esforço, entre as alturas 40 e 80 cm, ($p=0,013$ para o grupo DI e $p=0,002$ para o grupo DS) (Tabela 3). Não houve diferença entre os grupos (Figura 7).

Tabela 3. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{FC} dos grupos DI ($n=8$) e DS ($n=8$) nas diferentes etapas do teste TSI.

	Grupos	C_{FC}		
		40 cm	60 cm	80 cm
Velocidade	DI	5,02 $\pm$ 0,18 ^a	6,62 $\pm$ 0,24 ^b	7,74 $\pm$ 0,49 ^b
	DS	4,52 $\pm$ 0,30 ^a	5,78 $\pm$ 0,26 ^b	6,69 $\pm$ 0,30 ^b
Altura	DI	2,26 $\pm$ 0,08 ^a	1,95 $\pm$ 0,07 ^{ab}	1,74 $\pm$ 0,11 ^b
	DS	2,03 $\pm$ 0,14 ^a	1,73 $\pm$ 0,07 ^{ab}	1,50 $\pm$ 0,06 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($p<0,05$). C_{FC} = custo de FC.

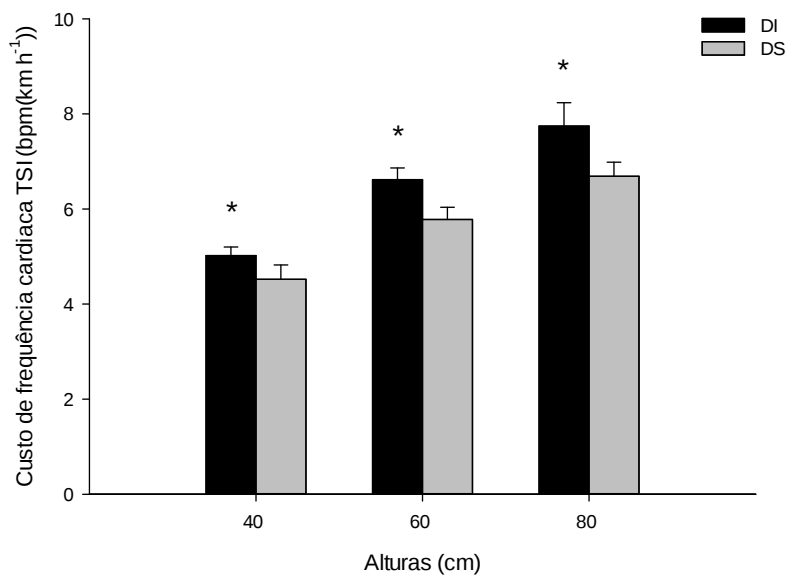


Figura 6. Média $\pm$ erro padrão da média do Custo de Frequência Cardíaca (C_{FC}) no teste de saltos incrementais calculadas com a velocidade. * Indica diferença no custo pelo teste t-test de Student ($p < 0,05$), DI ($n=8$) e DS ($n=8$).

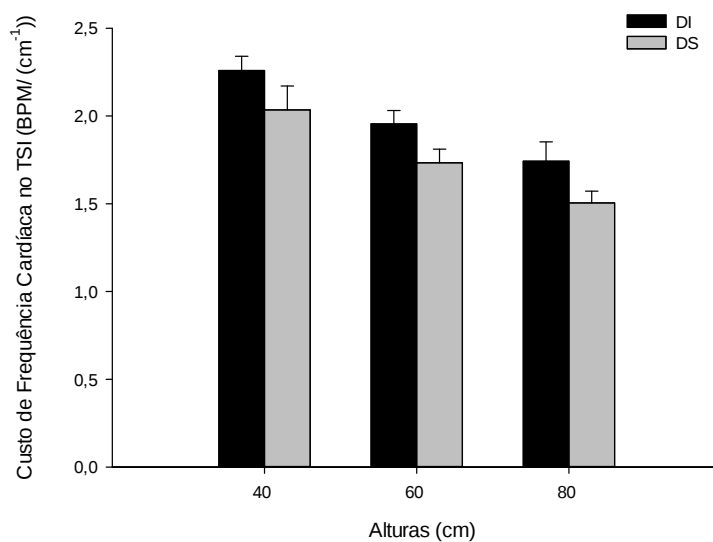


Figura 7. Média $\pm$ erro padrão de média do Custo de Frequência Cardíaca (C_{FC}) no teste de saltos incrementais calculadas com a altura, DI ($n=8$) e DS ($n=8$).

Em relação ao esforço, não foi observada diferença no C_{LAC} , entre as etapas para o grupo DI (velocidade constante). O grupo DS apresentou elevação do C_{LAC} nas etapas 60 e 80 cm ($P < 0,001$) (Tabela 4). O C_{LAC} foi menor, em todas as etapas, para o grupo DS quando comparado ao DI (Figura 8).

Não houve diferença do C_{LAC} em relação ao esforço quando divididos pela altura. Entretanto, quando comparados entre si, o grupo DS teve custo menor, em relação ao DI, em todas as etapas, sendo os valores de p iguais a 0,039; 0,01 e 0,014 para 40, 60, 80 cm respectivamente (Figura 9).

Tabela 4. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} dos grupos DI ($n=8$) e DS ($n=8$). nas diferentes alturas do teste de saltos incrementais.

		C_{lac}		
Grupos		40 cm	60 cm	80 cm
Dividido pela Velocidade	DI	0,1 $\pm$ 0,03 ^a	0,14 $\pm$ 0,03 ^a	0,19 $\pm$ 0,05 ^a
	DS	0,05 $\pm$ 0,04 ^a	0,07 $\pm$ 0,06 ^{ab}	0,1 $\pm$ 0,04 ^b
Dividido pela Altura	DI	0,039 $\pm$ 0,008 ^a	0,045 $\pm$ 0,005 ^a	0,043 $\pm$ 0,004 ^a
	DS	0,02 $\pm$ 0,003 ^a	0,023 $\pm$ 0,005 ^a	0,026 $\pm$ 0,003 ^a

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

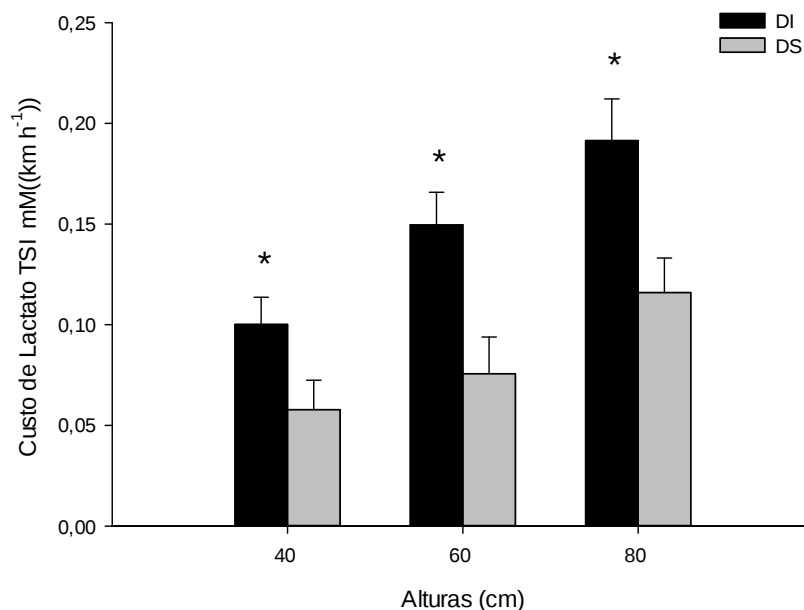


Figura 8. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} no teste de saltos incrementais calculadas com a velocidade. * indica maior custo pelo t-test de Student ($p < 0,05$), DI ($n=8$) e DS ($n=8$).

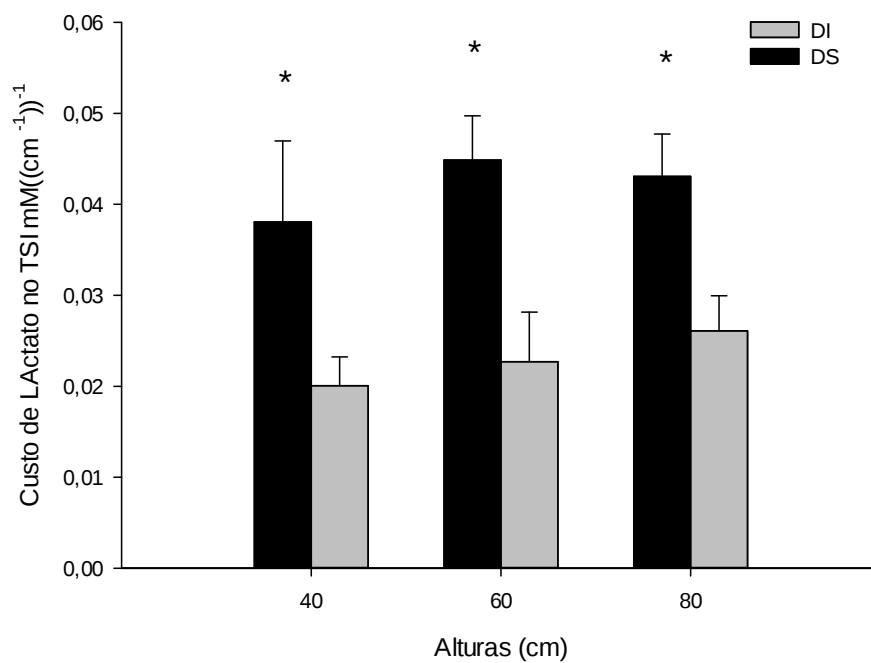


Figura 9. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} no Teste de Saltos Incrementais (TSI) calculadas com a altura. *indica maior custo, DI ($n=8$) e DS ($n=8$).

7.2 Custo de Frequência Cardíaca e Custo de Lactato Plasmático no teste de velocidades incrementais.

Todos os valores analisados apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). Os resultados do teste de Tukey ($p < 0,05$) são apresentados nas tabelas, e os gráficos apontam os resultados obtidos pelo teste t-test de Student ($p < 0,05$).

A Tabela 5 revela que, em relação ao esforço, somente no grupo DI houve aumento do C_{LAC} . Não houve diferença entre os grupos experimentais.

Tabela 5. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} dos grupos DI (n=8) e DS (n=8) nas diferentes etapas do TVI.

Grupos	C_{LAC}			
	Velocidades (km h ⁻¹)			
	9,6	16,8	24,0	31,2
DI	0,0174 $\pm$ 0,004 ^a	0,0230 $\pm$ 0,007 ^{ba}	0,1193 $\pm$ 0,026 ^c	0,0918 $\pm$ 0,012 ^{ab}
DS	0,0101 $\pm$ 0,005 ^a	0,0090 $\pm$ 0,005 ^{ab}	0,1087 $\pm$ 0,020 ^a	0,0836 $\pm$ 0,016 ^{ab}

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças no C_{FC} durante o TVI ($p = 0,07$). O mesmo ocorreu para o C_{FC} e C_{LAC} quando os grupos foram comparados entre si em cada etapa de velocidade (Figura 10 e Figura 11).

Tabela 6. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{FC} dos grupos DI (n=8) e DS (n=8) nas diferentes velocidades do teste de velocidades incrementais.

Grupos	C_{FC}			
	Velocidades (km h ⁻¹)			
	9,6	16,8	24,0	31,2
DI	2,97 $\pm$ 0,43 ^a	2,82 $\pm$ 0,19 ^a	4,10 $\pm$ 0,5 ^a	3,94 $\pm$ 0,26 ^a
DS	3,33 $\pm$ 0,34 ^a	2,85 $\pm$ 0,38 ^a	3,3 $\pm$ 0,22 ^a	3,27 $\pm$ 0,23 ^a

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

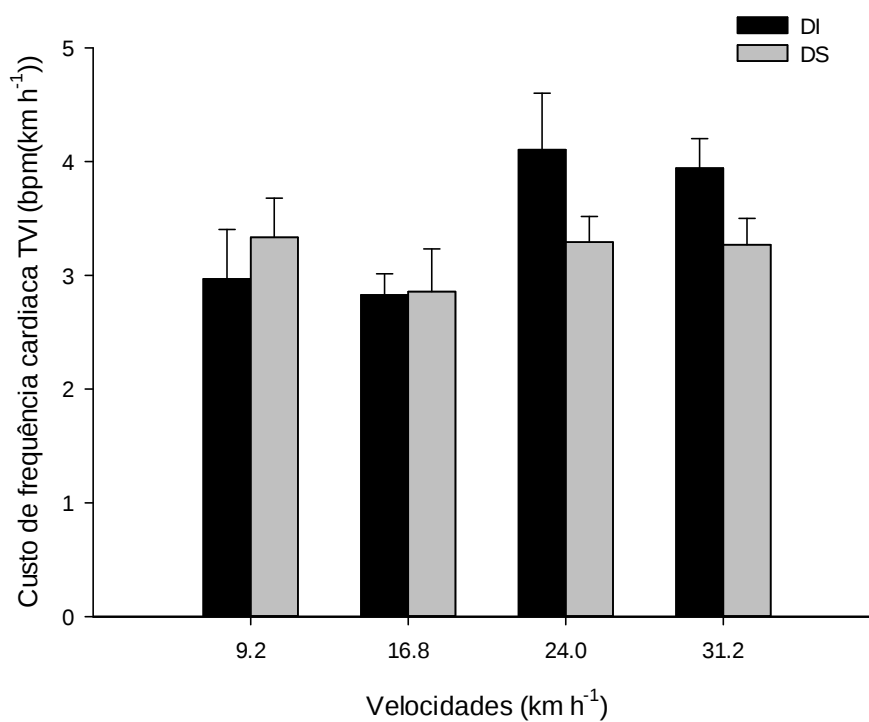


Figura 10. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{FC} dos grupos DI e DS nas diferentes velocidades do TVI, DI (n=8) e DS (n=8).

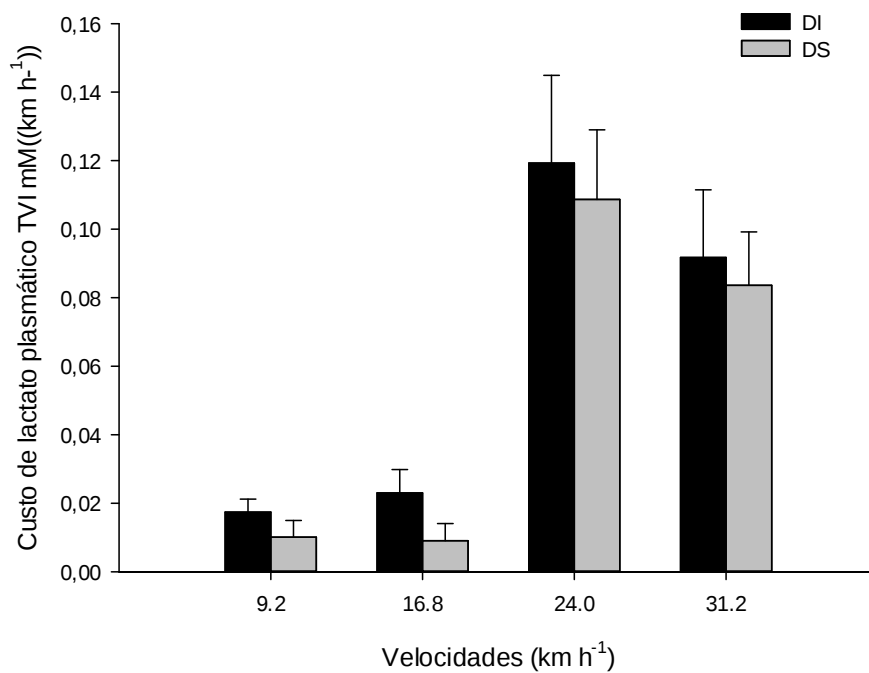


Figura 11. Média $\pm$ erro padrão da média do C_{LAC} dos grupos DI e DS nas diferentes velocidades do TVI, DI (n=8) e DS (n=8).

7.3 MCT1 e CD147

A figura 12 mostra a relação entre as expressões da proteína auxiliar CD 147 com o MCT1. Enquanto que a figura 13 revela equinos de baixa e alta expressão.

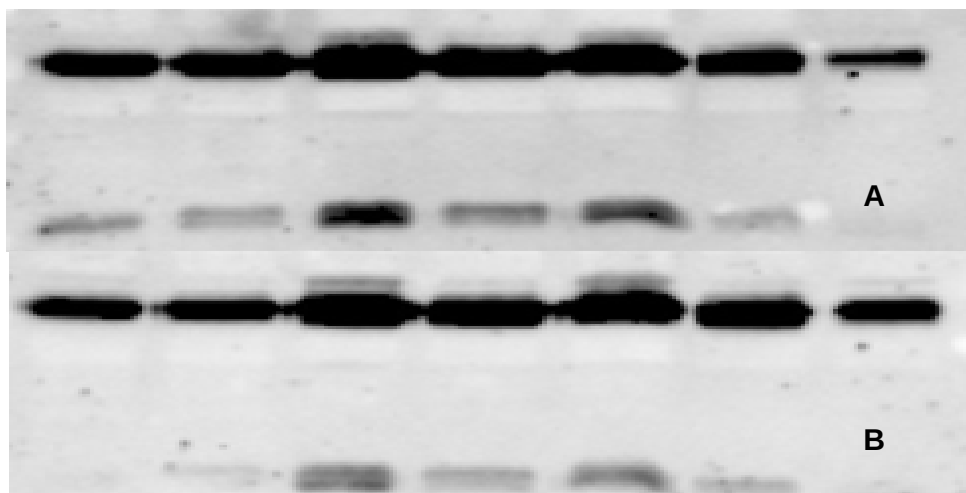


Figura 12. Em A, detecção de CD 147 e em B, MCT1 pela técnica de Western Blot. Observar a semelhança entre a expressão da proteína CD 147 com o transportadormonocarboxilato1 (MCT1) em equinos da raça BH.

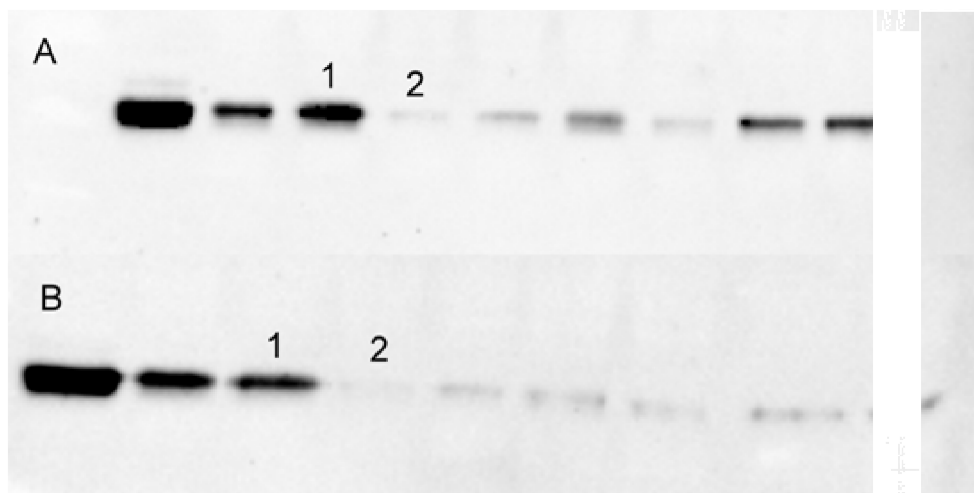


Figura 13. Em A, detecção de CD 147 e em B, MCT1 pela técnica de Western Blot. Observar em “1” equino com alta expressão e em “2” equino com baixa expressão.

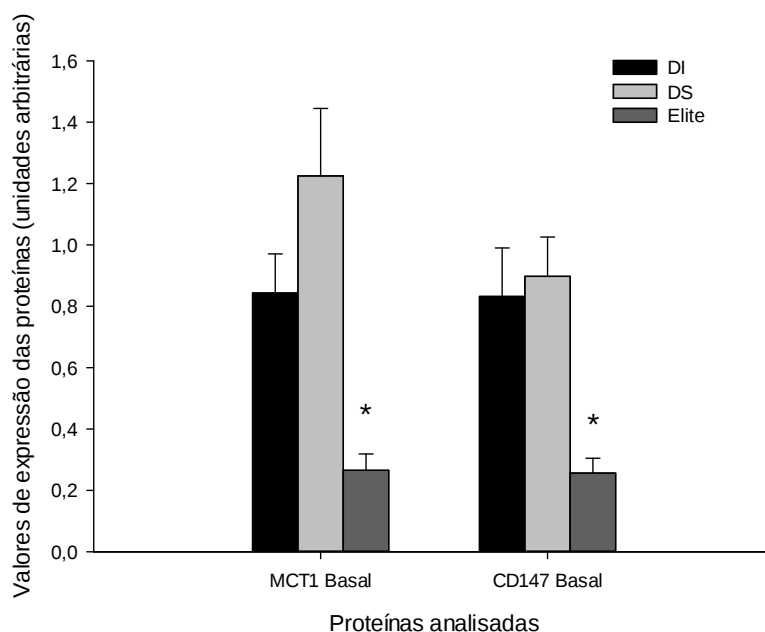


Figura 14. Média $\pm$ erro padrão da média dos valores basais de MCT1 e CD147 dos grupos DI, DS e Elite. * indica menor expressão, DI (n=8), DS (n=8) e ELITE (n=13).

Nos valores basais do MCT1 e CD 147, o grupo ELITE teve menor expressão quando comparado aos grupos DI e DS (Figura 14).

O esforço aumentou ($p=0,032$) a expressão da proteína CD 147 (Figura 15), sendo que o mesmo não foi observado na expressão do MCT1 (Figura 16). Em ambos os testes (TSI e TVI), não houve diferença entre os grupos DI e DS tanto na expressão do MCT1 como CD147, (Figuras 17 e 18).

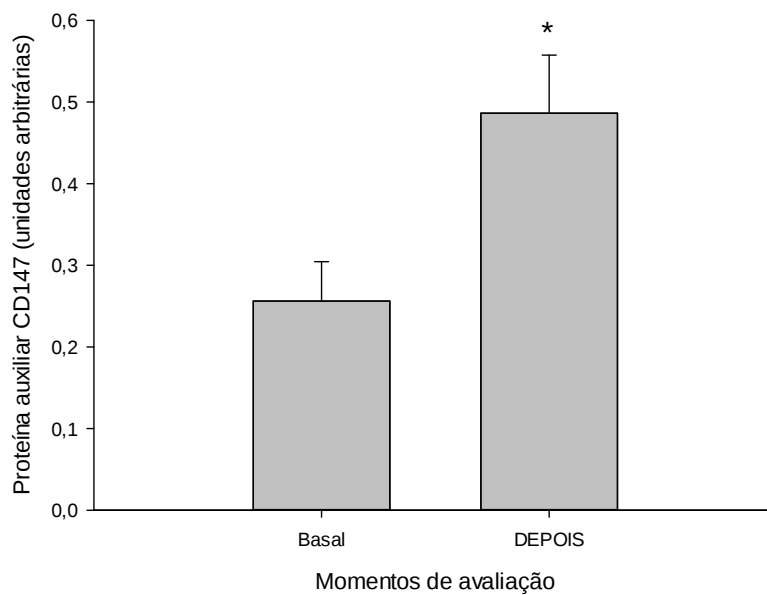


Figura 15. Média $\pm$ erro padrão de média da expressão de CD147 do grupo Elite (n=13), valores basais e após prova de salto. * indica menor expressão pelo t-test de Student ($p < 0,05$).

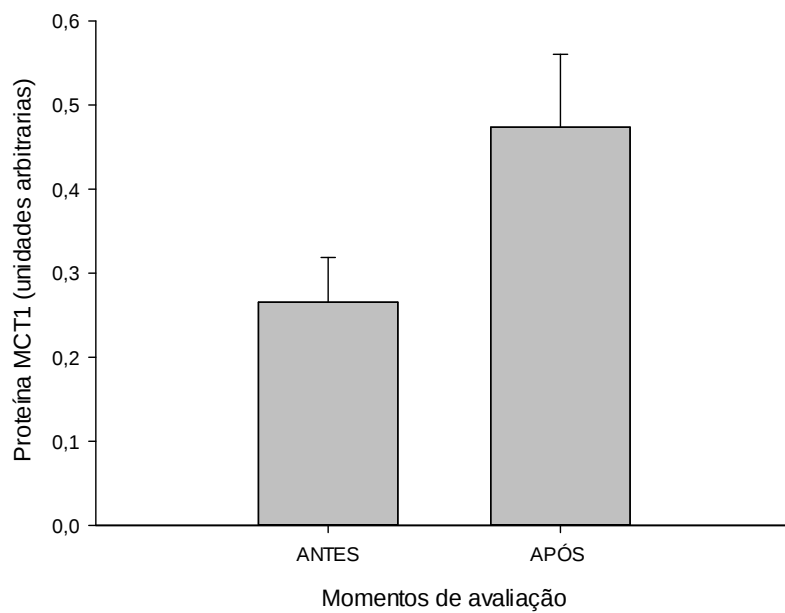


Figura 16. Média $\pm$ erro padrão de média da expressão de MCT1 do grupo Elite (n=13), valores basais e após prova de salto.

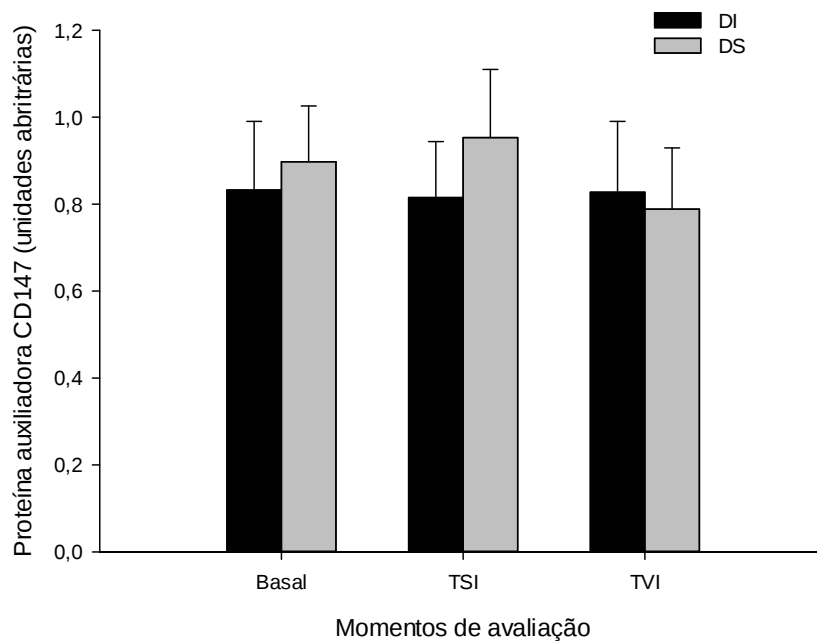


Figura 17. Média $\pm$ padrão de média da expressão de CD147 dos grupos DI (n=8) e DS (n=8), valores basais e após os TSI e TVI.

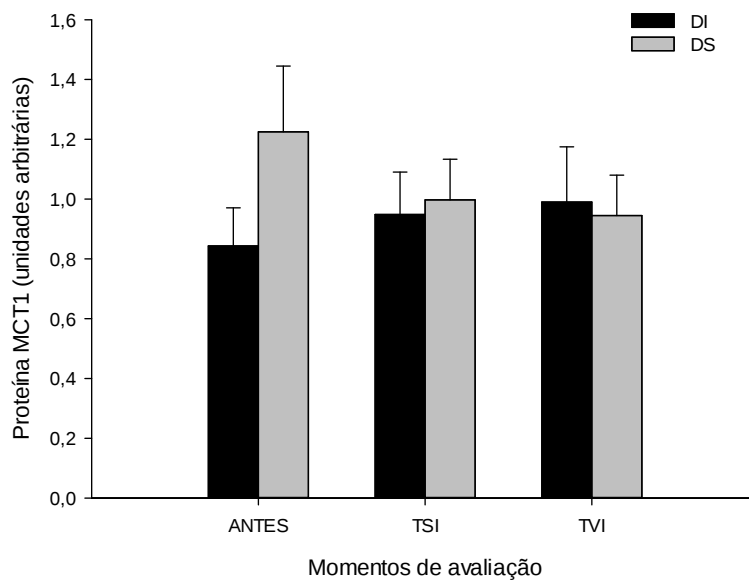


Figura 18. Média $\pm$ erro padrão de média da expressão de MCT1 dos grupos DI (n=8) e DS (n=8), valores basais e após os TSI e TVI.

Majoritariamente, as expressões de MCT1 e CD147 em equinos são estudadas em duas raças, Puro Sangue Inglês (PSI) de corrida e *Standardbred* raça especializada em trote. Ambas possuem um longo histórico de seleção para provas com velocidades altas. A semelhança genética e a utilização dessas raças fazem com que muitas vezes sejam estudadas e comparadas dentro de um mesmo estudo (ASENZZA et al., 2012, FAZIO, 2011, MYKÄNNEN, 2010).

Estudando *Standardbreds*, KOHO et al., (2002) afirmaram que a expressão de MCT1 e DC147 é distribuída de maneira bimodal, conceito confirmado posteriormente por MYKKÄNEN et al., (2010) e estendido para as raças PSI e Finnhorse. Até o presente momento, não existe na literatura sobre o tema, nenhum estudo analisando as expressões das proteínas MCT1 e CD 147 nas raças destinadas ao hipismo clássico.

A expressão de MCT1 e CD 147 nos cavalos analisados neste estudo seguiram o conceito de expressão bimodal, ou seja, os animais pertencem a dois grupos, AATE ou BATE, não existindo assim animais com expressão intermediária. Sugere-se ainda que a bimodalidade seja determinada durante a transcrição do RNAm (KOHO et al, 2002).

Os animais BHs, independentemente do grupo, DS ou DI, foram classificados todos como AAET em relação a expressão de MCT1 e apenas dois animais (12,5%), foram classificados como BATE em relação à expressão de CD147 quando analisados valores basais, o mesmo se repetiu após o teste TSI e TVI, onde a maioria dos BHs receberam a classificação AATE.

Os equinos do grupo elite, de origem européia, apresentaram 61% dos animais classificados como BATE em relação à expressão do MCT1 e 77% em

relação à expressão da CD147 nos valores basais. Após a prova de salto 21% dos animais foram classificados como BATE em relação ao MCT1 e 28% classificados como BATE em relação a CD147. Este achado significa que houve uma maior expressão das proteínas após o esforço, aumento na expressão de MCT1 e CD147 é relatado apenas em células musculares (KOHO et al., 2006, KITAOKA et al., 2010) e não em hemácias.

8 DISCUSSÃO

8.1 Diferenciação dos grupos de BH pelo custo de transporte

Os testes de esforço utilizados no presente estudo, TSI e TVI, foram propostos por serem testes de exercícios submáximos padronizados, sendo que o TSI contemplou o gesto desportivo das modalidades salto e CCE (SOARES, 2012), devido ao emprego dos grupamentos musculares específicos do salto. Já o TVI avaliou a aptidão aeróbia submáxima dos equinos da raça BH. O emprego de ambos os testes tiveram como propósito produzir valores para os cálculos dos C_{FC} e C_{LAC} com o objetivo de discriminar o condicionamento dos equinos utilizados no presente estudo, sendo que o resultado geral foi positivo.

Em relação à diferenciação entre os grupos, os menores custos de transporte apresentados pelo grupo DS, nas diferentes etapas de esforço, revelaram maior adaptação cardiovascular e metabólica dos equinos deste grupo para o TSI. Esta adaptação é atribuída à maior eficiência tanto da bomba cardíaca (EVANS, 2000), como das vias metabólicas de produção de ATP, principalmente a aeróbia (FERRAZ et al., 2008).

PICCIONE et al (2013), compararam o custo de transporte, nos quatro tipos de andamentos: passo, trote, galope e salto. Estes autores encontraram maior custo nos equinos que saltaram. Isso foi atribuído a uma maior mudança no centro de massa do equino durante o salto quando comparado sua movimentação normal, independente da velocidade, que foi constante ($5,8 \text{ m.s}^{-1}$ ou 21 km.h^{-1}), como no protocolo utilizado no presente estudo. Portanto, estudos prévios e recentes consolidaram a utilização da velocidade constante, num esforço de salto para determinação do custo de transporte.

Classicamente relatado na literatura (AERTS et al., 2008, EVANS, 2000, EVANS, 2008, SILVA, 2008), o desvio à direita na curva do lactato ou na reta da FC versus a velocidade, após um período de condicionamento, indica que um indivíduo condicionado apresenta valores menores na lactatemia e na FC. Mesmo o lactato não sendo o responsável pela acidose e/ou fadiga (ROBERGS, 2001), ele é um excelente indicador da glicólise anaeróbia. Isto implica dizer que, equinos com menor custo metabólico anaeróbio e/ou cardíaco, possuem uma melhor aptidão aeróbia, quando comparados num mesmo teste de esforço. Estes são relativamente mais eficientes na realização do esforço, pois utilizam menos a glicólise anaeróbia e, conseqüentemente, produzem menos lactato e H^+ . Este aspecto reforça a explicação que o grupo DS apresentou condicionamento físico melhor. Ademais, este grupo possuiu histórico de participação em provas de salto com altura mais elevadas, em relação ao grupo DI, confirmando a diferença entre o condicionamento dos grupos. Este resultado obtido já era esperado.

Enfocando a discussão na metodologia para determinação do custo de transporte (C_{FC} e C_{LAC}), obtido no TSI, os valores obtidos do C_{FC} , a partir das alturas de cada etapa, não apresentaram diferença estatística entre as etapas subsequentes e graficamente revelaram valores decrescentes conforme se aumentou o esforço. Matematicamente isso é facilmente explicado, pois os valores crescentes dos divisores (40, 60 e 80 cm) reduziram o custo. Contudo, apesar da utilização da variável altura, num teste TSI, parecer mais precisa para determinação do custo de transporte neste tipo de esforço, no presente estudo isso não foi demonstrado. Não é fácil, do ponto de vista fisiológico, explicar este fato. Comparando-se com aqueles resultados obtidos a partir da divisão pela velocidade, em todas as etapas, os custos foram crescentes, provando que o TSI foi eficiente em promover elevações consideráveis tanto na FC como na lactatemia. É exaustivamente comprovado na literatura que, conforme ocorre incremento da velocidade (intensidade), independente do grau de condicionamento, há elevação do lactato e da FC (EVANS, 2000; FERRAZ et al., 2008) e conseqüentemente da exigência fisiológica para o organismo (MORENO, 2007).

Claramente, o esforço aumentou entre as etapas, pois houve aumento da FC e do lactato sanguíneo e isso é descrito na literatura (EVANS, 2000; FERRAZ et al., 2008; FERRAZ et al., 2009). Importante informar também que estes resultados já foram discutidos, com outra abordagem, num estudo prévio realizado em nosso laboratório (SOARES, 2012).

Ainda dentro deste assunto, o C_{LAC} , obtidos por meio da divisão pelas alturas, não diferiu ao longo do teste para ambos os grupos. Entretanto,

conseguiu claramente discriminar os grupos entre as etapas de esforço. Isso pode ser explicado facilmente pelas informações obtidas na literatura que enfoca a equação de Fick. Indivíduos mais condicionados aumentam a sua capacidade muscular de extração de oxigênio, utilizando menos a glicólise anaeróbia para produção de ATP, essencialmente naqueles exercícios realizados numa intensidade submáxima. Este achado foi marcante para o grupo DS.

Em tempo, também é descrito na literatura, a dificuldade em aplicar o conhecimento científico na prática do treinamento diário dos animais (CAMPBELL, 2011, ROGERS et al., 2007) tendo em vista a simplicidade no cálculo dos C_{FC} e C_{LAC} , estas podem ser duas ferramentas para diminuir a “distância” entre o que é desenvolvido e descrito no meio acadêmico com aquilo que se realiza na prática do dia a dia, maximizando o condicionamento e prevenindo lesões em um custo benefício razoável.

8.2 MCT1 e CD147

A leucocitose, ou pseudoleucocitose é um achado comum durante o exercício (MIRANDA et al., 2011, OROZCO et al., 2007, FERRAZ et al., 2009). Isso poderia explicar os maiores valores encontrados para a proteína auxiliar CD 147, após o esforço, no grupo ELITE, tendo em vista que o salto é um esforço que produz maior custo de transporte para a espécie equina (PICCIONE, 2013). Entretanto, tendo em vista a diferença observada entre as concentrações de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e a de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), essa explicação depende de uma enorme quantidade de MCT1 presente na membrana leucocitária, embora a

presença da isoforma MCT1 já tenha sido descrita (MEREZHINSKAYAET et al., 2004) em leucócitos da espécie humana, nenhum dado em relação à presença e quantidade de MCT1 ou CD147 na membrana leucocitária de equinos é descrito na literatura.

Outro fator que poderia influenciar tal resultado seria a hipóxia causada pelo exercício (CONNES et al., 2014), estes autores encontraram uma maior expressão do MCT1 após 2 semanas de treinamento (efeito crônico), período superior ao tempo de exercício realizado pelos equinos do grupo ELITE.

Outra explicação para a elevação da proteína auxiliar CD 147 após o esforço seria alguns fenômenos que podem ocorrer em células eucarióticas como modificações pós-traducionais, glicosilação de proteínas e armazenamento no lúmen do retículo endoplasmático (NELSON & COX, 2008) e outras formas de inibição ou estímulo da expressão de MCT1 e CD147 descritas na literatura tais como as ações de adenosina monofosfatocíclico (AMPC) (SMITH et al, 2012) e p53 (BOIDOT et al, 2012), ainda não foram descritos nas hemácias adultas de equinos. Além disso, o presente estudo não avaliou estes aspectos. Portanto, mais estudos são necessários para explicar estes resultados.

Outra pergunta que devemos tentar responder é o porquê encontrou-se, na raça BH, maior proporção de equinos com alta capacidade de transporte nas hemácias. A raça BH foi selecionada a partir de 1977, sendo formada a partir das raças que apresentavam aptidão para o salto, encontradas no território nacional.

Neste contexto, o PSI, que existia em grande número devido às atividades dos Jóqueis Clubes foi largamente utilizado como uma das raças formadoras da raça BH, segundo Dias et al., (2000) até o ano de 1998, 20,9% dos garanhões usados na formação do BH foram PSIs, portanto esta maior do que qualquer outra raça formadora. Esta grande influência do PSI na formação do BH, pode explicar os resultados apresentados na figura 14, que evidenciam uma maior expressão do MCT1 e da CD147 quando comparados com outras raças européias selecionadas a muito mais tempo para as mesmas modalidades.

Este fato pode ser vantajoso ao BH, embora ainda controverso na literatura (RÄSÄNNEN et al., 1995, MYKKÄNEN et al., 2010) uma maior capacidade de influxo de lactato para a hemácia pode, teoricamente acarretar melhor desempenho em provas como o *cross country*, uma das etapas do CCE.

Os BHs, quando separados em grupos BATE ou AATE, apresentaram números de indivíduos AATE muito semelhantes ao estudo realizado por MYKKÄNEN et al., (2010). Estes autores encontraram 85% de Finnhorses, 82% de Standardbreds e 88% de PSI pertencentes ao grupo AATE. A maior capacidade de expressão dessas proteínas faz com que ocorra uma maior capacidade de transporte do lactato para dentro das hemácias mantendo o gradiente entre os compartimentos muscular e plasmático.

Todas as raças de equinos utilizadas neste estudo expressaram o transportador MCT1 e sua proteína auxiliar CD 147, sendo que o grupo ELITE (Figura 14) revelou ter uma menor expressão quando comparado aos BHs. Pelo padrão das bandas encontradas no grupo ELITE, 77% dos equinos deste grupo

podem ser classificados como de baixa capacidade de transporte. Contrariamente, os grupos de equinos da raça BH (DI e DS) tiveram uma maior proporção de alta capacidade de transporte. Segundo as informações contidas na literatura, raças que possuem aptidão para a corrida como o PSI demonstraram expressão mais elevada, principalmente da proteína auxiliar CD 147 (KOHO et al., 2002). A explicação para este fato está relacionada com o tempo de seleção da raça PSI para a corrida e sua produção de lactato ao final das competições, em torno de 25 mM.

9 CONCLUSÃO

Concluimos que o BH, devido à influência do PSI em sua formação, possui grande expressão das duas proteínas MCT1 e CD147 e alta capacidade de influxo de lactato para as hemácias.

As raças européias, selecionadas há muito mais tempo, também tiveram expressão das proteínas estudadas, porém, em sua maioria apresentaram baixa expressão das mesmas, por esta razão foram classificadas como de baixa capacidade de transporte.

Outra conclusão de grande importância foi a de que as raças européias expressaram mais a proteína auxiliar CD147 após uma sessão aguda de esforço.

10 REFERÊNCIAS

AERTS, J. M.; GEBRUERS, F.; VAN CAMP, E.; BERCKMANS, D. Controlling horse heart rate as a basis for training improvement. **Computers and Electronics in Agriculture**, Amsterdam, v.64, p.78-84, 2008.

BITSCHNAU, C.; WIESTNER, T.; TRACHSEL, D. S.; AUER, J. A.; WEISHAUP, M. A. Performance parameters and post exercise heart rate recovery in Warmbloodsportshorses of different performance levels. **Equine Veterinary Journal**, London, v, 42, s.38, p.17- 22, 2010.

BOIDOT, R.; Vérgan, F.; Meulle, A. Regulation of Monocarboxylate Transporter MCT1 Expression by p53 Mediates Inward and Outward Lactate Fluxes in Tumors. In. **Cancer Res** v.72 p.939-948, 2012.

BÖNEN.A; MISKOVIC.D; LEMIEUX.K; WILSON. M. C; MERETTE. A; HALESTRAP.A.P.Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fast-twitch skeletal muscles. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, Bethesda, v.278, p.1067–1077, 2000.

CAMPBELL, E. H. Lactate-driven equine conditioning programmes. In **The Veterinary Journal**. V, 190. P 190-207, 2011.

CONNES, P.; BOUIX, D.; PY, G.; CAILLAUD, C.; KIPPLEN, P.; BRUN, J-F.; VARRAY, A.; PREFAUT, C.; MARCEIR, J. Does Exercise-Induced Hypoxemia Modify Lactate Influx Into Erythrocytes And Hemorheological Parameters In Athletes?. In. **J Appl Physiol**v. 97 p.1053-1058, 2004.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE HIPISMO. **Regulamento de salto CBH 2012**. 68p.

D'ANGELIS, F. H. F.; SILVA, M. A. G.; MARTINS, C. B.; FERRAZ, G. C.; OLIVEIRA, J. A.; BOLEI, I. C.; LACERDA NETO, J. ; QUEIROZ NETO, A. Light exercise causes adaptive changes in muscles of young Brasileiro de Hipismo horses. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 1313-1318, 2008q.

D'ANGELIS, F.; SILVA, M. A. G.; ALBERNAZ, R.; FERRAZ, G.; BOLELI, I.; LACERDA-NETO, J.; DEOLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, J.; QUEIROZ-NETO, A. Preliminary Study on Age- and Sex-Dependent Alterations in the Composition of Skeletal Muscle Fibers of Brasileiro de Hipismo Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 28, p. 22-27, 2008b.

D'ANGELIS, F.H. F.; OLIVEIRA, J. V.; MARTINS, C. B.; SILVA, M. A. G.; BOLELI, I. C.; LACERDA NETO, J. C.; FERRAZ, G. C.; QUEIROZ-NETO, A. Intramuscular glycogen and lipid contents of active and inactive Young horses of the brasileiro de hipismo breed. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 25, p. 9-13, 2009.

EATON, M.D. Energetics and performance. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. **The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**. Philadelphia: W B Saunders, 1994. p.49-62.

EVANS, D. **Training and fitness in athletic horses**. Canberra: Rural Industries Research and Development Corporation, 2000.

EVANS, D. Exercise testing in the field, In: HINCHCLIFF, K. W; GEOR, R. J, Kaneps, A. J. **Equine exercise physiology**. Philadelphia: W B Saunders. 2008. p.16-32. 2008.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Statistics Division, 2012**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso em: 9 mar. 2014.

FERRAZ, G. C.; D'ANGELIS, F.H.F.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; FREITAS, E.V.V.; LACERDA-NETO, J.C.; QUEIROZ-NETO, A. Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 256-259, 2008.

FERRAZ G.C., TEIXEIRA-NETO A.R., D'ANGELIS F.H.F., LACERDA NETO J.C., QUEIROZ NETO A. Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 46(6):431-437. 2009.

FRANCISCO, C.L.; JORGE, A.M.; DAL-PAI-SILVA, M.; CARANI, F.R.; CABEÇO, L.C.; SILVA, S.R. Muscle fiber type characterization and myosin heavy chain (MyHC) isoform expression in Mediterranean buffaloes. **Meat Science**, Barking, v.88 , p.535–541, 2011.

FROLLINI, A.; DIAS, R.; PRESTES, J.; BAGANHA, R.; CEREJA, D., GOMES, L.; CAVAGLIERI, C. Exercício físico e regulação do lactato: papel dos transportadores de monocarboxilato (proteínas mct). **Revista de Educação Física**, Maringá, v.19, n.3, p.453-463, 2008.

HALESTRAP, A.P.; PRICE, N.T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **Biochemical Journal**, London, v.343, pt 2, p. 281–299, 1999.

HALESTRAP, A. P.; MEREDITH, D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate Transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, Berlin, v.447, p.619-628, 2004.

HALESTRAP, A. P. Monocarboxylic acid transport. **Comprehensive Physiology**, v.3. p.1611- 1643, 2013.

HENDERSON, I. S. F. Diagnostic and prognostic use of L-lactate measurement in equine practice. **Equine Veterinary Education**, Newmarket, v. 25, p. 468-475, 2013.

IACONO, K. T.; BROWN, A. L.; GREENE, M. I.; SAOUAF, S. J. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 83, p.283-295, 2007.

JUEL, C.; BANGSBO, J.; GRAHAM, T.; SALTIN, B. Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 140, p. 147-159, 1990.

KITAOKA, Y.; MASUDA, H.; MUKAI, K.; HIRAGA, A.; TAKEMASA, T.; HATTA, H. Effect of training and detraining on monocarboxylate transporter MCT 1 and MCT4 in Thoroughbred horses. **Experimental Physiology**, New York, v. 96 p. 348–355, 2011.

KOHO, N. M.; VÄIHKÖNEN, L. K.; PÖSÖ, A. R. Lactate transport in red blood cells by monocarboxylate transporters. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 34, p.555-559, 2002. Suplemento.

KOHO, N. M.; HYYPPÄ, S.; PÖSÖ, A.R. Monocarboxylate transporters (MCT) as lactate carriers in equine muscle and red blood cells. **Equine Exercise Physiology**, v.7, n.36, p.354-358, 2006. Suplemento.

LINDNER, A; BOFFI, F. M. Pruebas de ejercicio In: BOFFI, F. M. **Fisiologia Del ejercicio en equinos**. Buenos Aires: Inter-médica Editorial, 2007. 302p.

LEISSON, K.; ALEV, K.; KAASIK, P.; JAAKMA, Ü.; SEENE, T. Myosin heavy chain pattern in the Akhal-Teke horses. **The Animal Consortium**, v.5, n.5, p.658-662, 2011.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Músculo Esquelético: Estrutura e Função. In: **Fisiologia do exercício energia, nutrição e desempenho humano**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.369-393, 2003.

MANOHARAN, C.; WILSON, M. C.; SESSIONS, R. B.; HALESTRAP, A. P. The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and 57 its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. **Molecular Membrane Biology**, v.23, p.486-498, 2006.

MEREZHINSKAYA, N.; OGUNWUYI, S. A.; MULLICK, F. G.; FISHBEIN, W. F. Presence and Localization of Three Lactic Acid Transporters (MCT1, -2, and -4) in Separated Human Granulocytes, Lymphocytes, and Monocytes. In. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 52(11): 1483–1493, 2004

MEREZHINSKAYA, N.; FISHBEIN, W.N. Monocarboxylate transporters: Past, present, and future. **Histology and Histopathology**, Murcia, v.24, p. 243-264, 2009.

MIRANDA, R. L.; MUNDIM, A. V.; SAQUY, A. C. S.; COSTA, A. S.; GUIMARÃES, E. C.; GONÇALVES, F. C.; SILVA, F. O. C. In. Perfil hematológico de equinos

submetidos à prova de Team Penning. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31(1):81-86, 2011.

MORENO, J. R. **Comparação entre o custo de VO_2 e o custo de frequência cardíaca, e validade do método de estimar a velocidade de corrida associada ao VO_{2max} em atletas e não atletas**. 2007. Dissertação (Mestrado)- Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2007.

MUÑOZ, A.; RIBER, C.; SANTISTEBAN, R.; RUBIO, M. D.; AGÜERA, E. I.; CASTEJÓN, F. M. Cardiovascular and metabolic adaptations in horses competing in cross-country events. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 61, n. 1, p. 13-20, 1999.

MURAMATSU, T.; MIYAUCHI, T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. **Histology and Histopathology**, Murcia, v.18, p.981-987, 2003.

MURIEL, M. G. Equilíbrio hidroeletrolítico. In: BOFFI F. M. **Fisiologia Del ejercicio em equinos**. Buenos Aires: Inter-Médica Editorial, 2007.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício energia, nutrição e desempenho humano**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

McKEEVER, K. H.; GORDON, M. E. Endocrine alterations in the equine athlete. In: HINCHCLIFF, K. W., GEOR, R. J., Kaneps, A. J.; **Equine Exercise Physiology**. Philadelphia: W B Saunders. P. 271-295. 2008.

MYKKÄNEN, A. K.; HYYPPÄ, S.; PÖSÖ, A. R.; RONÉUS, N.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Immuno histochemical analysis of MCT1 and CD147 in equine skeletal muscle fibres. **Research in Veterinary Science**, London v.89.p.432-437, 2010a.

MYKKÄNEN, A. K.; PÖSÖ, A. R.; MCGOWAN, C. A.; MCKANE. Expression of lactate transporters MCT1, MCT2 and CD147 in the red blood cells of three horse breeds: Finnhorse, Standardbred and Thoroughbred. **EQUINE VETERINARY JOURNAL**, v.42. s.38. p.161-166, 2010b.

MYKKÄNEN, A. **Expression of lactate transporters MCT1, MCT2, MCT4 and the ancillary protein CD147 in horse muscle and red blood cells**. 2011. 62f. Dissertation (Master of Science)- Department of Veterinary Biosciences Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

OHMURA, H.; MATSUI, A.; HADA, T.; JONES, J. H. Physiological responses of Young thoroughbred horses to intermittent high-intensity treadmill training. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, p.55-59, 2013.

PAS, M.F.W.; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. **Muscle development of livestock animals**: physiology, genetics and meat quality. Winslow: MRM Graphics, 2004.

PHILIP, A.; MACDONALD, A. L.; WATT, P. W. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. **The Journal of Experimental Biology**, Oxford, v. 208, p. 4561-4575, 2005.

PILEGAARD, H.; DOMINO, K.; NOLAND, T.; JUEL, C.; HELLSTEN, Y.; HALESTRAP, A. P.; BANGSBO, J. **Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle**. Bethesda: American Physiological Society, 1999. p. 255-261, 1999.

OROZCO C.A.G. Respostas hematológicas e bioquímicas de equinos da raça Puro Sangue Árabe em testes de esforço progressivo realizados em esteira rolante durante a fase de treinamento e em prova de enduro a campo. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP. 112p. 2007.

PICCIONE, G.; MESSINA, V.; BAZZANO, M.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; Heart Rate, Net Cost of Transport, and Metabolic Power in Horse Subjected to Different Physical Exercises. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 8, p. 586-589, 2013.

POOLE, D. C.; ERICKSON, H. H. Cardiovascular function and oxygen transport: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K. W., GEOR, R. J., Kaneps, A. J.; **Equine Exercise Physiology**. Philadelphia: W B Saunders. P. 212-247. 2008.

PÖSÖ, A. R.; LAMPINEN, K.J.; RÄSÄNEN, L.A. Distribution of lactate between red blood cells and plasma after exercise. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. v.18, p. 231-234, 1995.

PÖSÖ, A. R. Monocarboxylate Transporters and Lactate Metabolism in Equine Athletes: A Review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.43, p.63-74, 2002.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. Músculo Esquelético: Estrutura e Função. In: **Fisiologia do Exercício Teoria Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho**, 5ª Edição, Barueri, Manole, p. 136-163, 2005.

RÄSÄNEN, L.A., LAMPINEN, K.J. AND PÖSÖ, A.R. Responses of blood and plasma lactate and plasma purine concentrations to maximal exercise and their relation to performance in standardbred trotters. **Am. J. vet. Res.** 56, 1651-1656. 1995.

REGULEMENTO SBBHC, Regulamento do Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo. <http://brasileirodehipismo.com.br/site/upload/arquivos/regulamento.pdf>, acesso em 11/03/2014.

RINO, A. S. **Resposta das fibras musculares esqueléticas de equinos da raça Puro Sangue Árabe ao treinamento de enduro**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

ROBERGS, R.A. Exercise-induced metabolic acidosis: where do the protons come from? **Sport science Review**, Champaign, v. 5, p.1-20, 2001.

ROGERS, C. W., RIVERO, J. L. L., VAN BREDA, E., LINDNER, A., & VAN OLDRIJTBORGH-OOSTERBAAN, M. S. Describing workload and scientific information on conditioning horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2007.

SILVERTHORN, D. U.; OBER, W. C.; GARRISON, C. W. Fisiologia Cardiovascular, In: **Fisiologia Humana, uma Abordagem Integrada**. 2ª Edição, Barueri. Manole, p. 403-442, 2003.

SMITH, J. P.; UHERNIK, A. L.; LI, L.; LIU, Z.; DREWES, R. L. Regulation of Mct1 by cAMP-dependent internalization in rat brain endothelial cells. **Brain Research**. V.1480 p.1-11, 2012.

SPURWAY, N. C. Aerobic exercise, anaerobic exercise and the lactate threshold. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v.48, n.3, p.569-591, 1992.

SNOW, D. H.; VALBERG, S. J. Muscle anatomy, physiology, and adaptation to exercise and training. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. (Ed.) **The athletic horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p.145-179.

TAKIMOTO, M.; TAKEYAMA, M.; HAMADA T. Possible involvement of AMPK in acute exercise-induced expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 mRNA in fast-twitch skeletal muscle. **Metabolism**, 2013, in press.

VÄIHKÖNEN L. K; HYYPPÄ, S; PÖSÖ A. R. Factors affecting accumulation of lactate in red blood cells. **Equine Veterinary Journal**, London, v.30, p. 443-447, 1999. Suplemento.

WILSON, M. C; MEREDITH, D; HALESTRAP, A. P; Fluorescence Resonance Energy Transfer Studies on the Interaction between the Lactate Transporter MCT1 and CD147 Provide Information on the Topology and Stoichiometry of the Complex *in Situ**. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, n.5, v.227, p.3666–3672, 2002.

11 ANEXOS

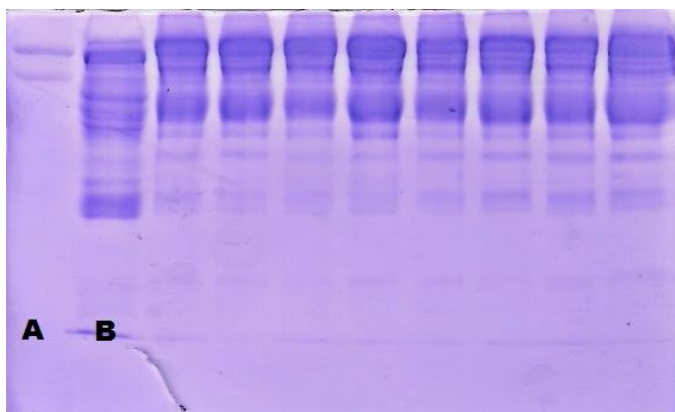


Figura 19. Gel SDS-PAGE a 10%.Em A: Marcador Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad) B: Equino controle.

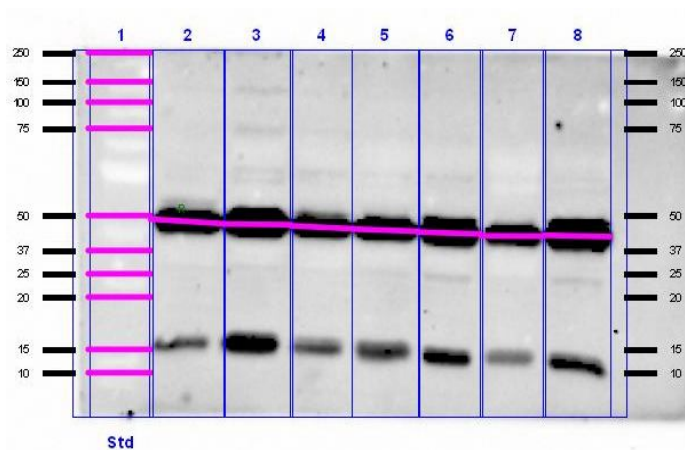


Figura 20. Análise das bandas de CD147 em ImageLab (BioRad® versão 4.0).

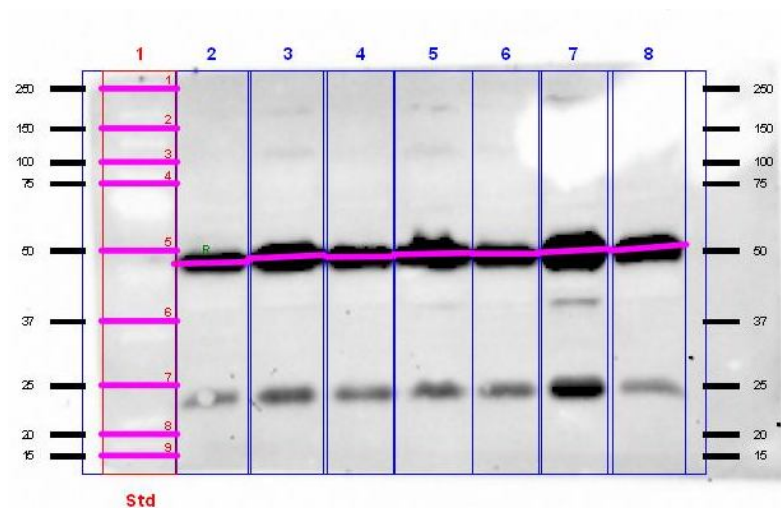


Figura 21. Análise das bandas de MCT1 em ImageLab (BioRad® versão 4.0).

Tabela 7. Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g g}/\mu\text{L}$) em membranas de hemácias de equinos antes e depois teste de saltos incrementais.

ANIMAL	GRUPO	ANTES ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	DEPOIS ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Balim	DI	1,54	2,40
Cazuza	DI	2,40	2,87
Espião	DI	1,38	5,43
Fundamento	DI	3,93	2,57
Garça	DI	2,21	2,09
Intrépido	DI	2,82	3,63
Bocaína	DI	3,98	3,38
Bagadu	DI	3,00	NF
Altaneiro	DS	3,62	2,07
Destino	DS	3,88	2,25
Expresso	DS	3,57	3,22
Garrão	DS	3,09	2,08
Golden	DS	3,22	6,23
Graveto	DS	2,10	3,39
Hebraico	DS	4,50	3,70
Édipo	DS	3,10	NF
C01	Elite	7,18	5,54
C02	Elite	10,0	6,18
C03	Elite	8,84	5,45
C05	Elite	6,85	2,79
C06	Elite	5,19	NF
C07	Elite	5,80	3,41
C08	Elite	5,60	3,82
C09	Elite	7,41	3,73
C10	Elite	7,17	NF
C11	Elite	5,90	NF
C12	Elite	4,96	3,70
C13	Elite	5,23	4,88
C14	Elite	6,23	4,15

DS: Desempenho superior; DI: Desempenho inferior; Elite NF = não feita.

Tabela 8. Classificação dos animais segundo Mykännen (2010), para valores basais

Basal		Alta Capacidade de Transporte				Baixa Capacidade de Transporte			
Grupos	Cavalos	MCT1	Padrão	CD147	Padrão	MCT1	Padrão	CD147	Padrão
DI	Aman 03								
	Aman 05								
	Aman 06								
	Aman 09								
	Aman 11								
	Aman 16								
	Aman 17								
	Aman 21								
DS	Aman 02								
	Aman 04								
	Aman 07								
	Aman 08								
	Aman 10								
	Aman 12								
	Aman 13								
	Aman 14								
Elite	H 01								
	H 02								
	H 03								
	H 04								
	H 05								
	H 06								
	H 07								
	H 08								
	H 09								
	H 10								
	H 11								
	H 12								
	H 13								

Tabela 9. Classificação dos animais segundo Mykannen (2010), para valores após TSI e prova de salto.

TSI/Prova		Alta Capacidade de Transporte				Baixa Capacidade de Transporte			
Grupos	Cavalos	MCT1	Padrão	CD147	Padrão	MCT1	Padrão	CD147	Padrão
DI	Aman 03								
	Aman 05								
	Aman 06								
	Aman 09								
	Aman 11								
	Aman 16								
	Aman 17								
	Aman 21								
DS	Aman 02								
	Aman 07								
	Aman 08								
	Aman 10								
	Aman 12								
	Aman 13								
	Aman 14								
Elite	H 01								
	H 02								
	H 03								
	H 04								
	H 05								
	H 06								
	H 07								
	H 08								
	H 09								
	H 12								
	H 13								
	H 14								

Tabela 10. Classificação dos animais segundo Mykännen (2010), para valores após TVI.

TVI		Alta Capacidade de Transporte				Baixa Capacidade de Transporte			
grupos	Cavalos	MCT1	Padrão	CD147	Padrão	MCT1	Padrão	CD147	Padrão
DI	Aman 03								
	Aman 05								
	Aman 06								
	Aman 09								
	Aman 11								
	Aman 16								
DS	Aman 02								
	Aman 07								
	Aman 08								
	Aman 10								
	Aman 12								
	Aman 13								

