REBECA ALVES WEIGEL

**Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares
em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe**

São Paulo

2014

REBECA ALVES WEIGEL

**Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares
em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2956
FMVZ

Weigel, Rebeca Alves

Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe / Rebeca Alves Weigel. -- 2014.
57 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira.

1. Cavalos. 2. Nutrição. 3. Gordura. 4. Imunologia. 5. EROS. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe", protocolado sob o nº 2480/2011, utilizando 5 (cinco) cavalos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 7/12/2011.

We certify that the Research "Biochemical profile, oxidative metabolism and function of polymorphonuclear in horses fed a mineral, soybean, rice, linseed or fish oil", protocol number 2480/2011, utilizing 5 (five) horses, under the responsibility Profa. Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/7/2011.

São Paulo, 27 de março de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WEIGEL, Rebeca Alves

Título: **Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu irmão,
Raphael Alves Weigel (*in memoriam*),
Com muito amor

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o fim de um longo ciclo e resultado do trabalho em equipe e amizade de excelentes pessoas. Desde já agradeço a todos que, de alguma maneira participaram desta etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira pela orientação, atenção, carinho e paciência. Sua contribuição para a minha formação profissional e pessoal é inestimável. Quero manter a sua presença na minha vida com um amizade forte e sincera.

À “Família Sucupira”: Alessandra, Aline, Giovanna, Priscilla, André, que estiveram sempre presente em todas as fases do experimento, sem vocês essa pesquisa não seria concluída, literalmente! Muito Obrigada!

À grande amiga Renata, sempre pronta para me ajudar com seu carinho e experiência. Desde momentos com os cavalos “de má vontade” comigo, passando por análises fatigantes até longas conversas coloridas com lágrimas e risadas. Tua amizade é um presente muito especial que recebi no mestrado e realizei no doutorado.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP, pela concessão de auxílio à pesquisa, imprescindível para a realização desse trabalho.

À CAPES e ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP pela Bolsa que recebi.

À Clara Satsuki Mori, responsável pelo Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas. Excelente Profissional, competente, atenciosa, paciente, divertida. Além da ajuda irrestrita nas análises e resolução de todos os tipos de problemas, agradeço a você uma grande lição que aprendi: Ter razão nem sempre é o mais importante, principalmente se isso custar as lágrimas de um amigo.

Às amigas Juliana, Ludmila e Tatiana pelas risadas, almoços, colas e amizade sincera, vocês deixaram meu doutorado mais colorido e feliz.

Ao Prof. Dr Wilson Roberto Fernandes e Profa. Raquel Yvonne Arantes Baccarin por permitir que eu utilizasse as dependências do Hospital de Grandes Animais e os cinco cavalos.

Ao prof. Fernando José Benesi e profa. Viviani Gomes, por permitir que eu alojasse meus animais no hospital de ruminantes.

Ao Tio Chico (Milton), pelos ensinamentos, ajuda, disposição e paciência sempre que eu precisei.

Aos funcionários dos Hospitais de equinos e ruminantes, principalmente Marquinhos, Rosendo Pela ajuda na limpeza das baias.

Ao funcionário Abelardo (Dinho), por sua amizade, ajuda e paciência com os alimentos dos animais, bagunça no galpão e limpeza das baias.

Ao Prof. Dr. Stefano Carlo Filippo Hagen pela amizade, sempre bem humorado e conversas que apenas a sua percepção poderia proporcionar.

Às técnicas dos laboratórios Claudia, Marly, Samantha e Maria Helena pela ajuda nas análises e companheirismo de sempre.

Aos senhores Marcio Ceccantini e Luciano Andriguetto, pela compreensão, incentivo e apoio.

Às secretárias do Departamento de Clínica Médica, Adelaide, Cida e Silvana pela ajuda e convívio agradável.

Principalmente aos cinco cavalos do experimento: Aladin, Castanho, Faraó, Socks e Colorado (*in memoriam*) que participaram involuntariamente desta pesquisa e contribuíram, nem sempre de bom humor, para a realização do meu trabalho. A personalidade de cada um e minha convivência com vocês foram, sem dúvida os maiores estímulo e prazer para mim durante os seis meses de convivência.

Ao Fabiano e seu pai, Celso, sua ajuda, apoio e carinho nos momentos de finalização deste trabalho foram essenciais.

À minha família, meu alicerce, sempre me dando apoio com muito amor e paciência. Mãe, Pai, Nath, Tete, minha irmã Raquel e primas Jessica e Quéren: Muito obrigada!

RESUMO

WEIGEL, R. A. **Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe.** [Biochemical profile, oxidative metabolism and polymorphonuclear cells function of horses fed with mineral, soybean, ricebran, linseed or fish oils]. 2014. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A domesticação dos equinos e a sua utilização para esportes fez com que a nutrição destes animais passasse por mudanças significativas. O alto requerimento energético pode ser suprido com forragem conservada e grandes quantidades de amido. Este manejo, porém, predispõe os equinos a problemas digestivos e metabólicos, podendo levar a cólica, endotoxemia e laminite. Outra forma de atingir o requerimento energético é a adição de gordura na dieta, já que óleos vegetais e animais podem conter até três vezes mais energia que grãos em igual volume. Sabe-se que óleos de diferentes fontes diferem quanto a propriedades relacionadas aos seus componentes ativos; óleos podem conter componentes como ω -3, ω -6, γ -orizanol em diferentes quantidades e estes compostos podem influenciar o metabolismo. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de óleos de diferentes origens e composição sobre o metabolismo bioquímico, oxidativo e função de células polimorfonucleares de equinos. Durante 15 semanas foram utilizados cinco equinos machos, mestiços, que receberam ou óleo mineral, ou óleo de soja, ou óleo de arroz, ou óleo de linhaça, ou óleo de peixe, em delineamento experimental quadrado latino 5x5. Cada período experimental foi composto por três semanas. Foram avaliados perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e “burst”-respiratório de granulócitos. Houve efeito do tratamento sobre os teores de triglicérides, fração HDL de colesterol e hemoglobina, contagem de eritrócitos, hematócrito e na intensidade de produção de EROs por granulócitos estimulados com Sa-PI. Das variáveis do perfil bioquímico, pode-se observar que a adição dos óleos de soja, arroz, linhaça e peixe na dieta reduziu os triglicérides plasmáticos, a inclusão de óleos em até 5% da MS nas dietas não representou grande desafio oxidativo, apenas as concentrações de hemoglobina foram menores no tratamento com óleo de soja. O óleo de linhaça aumentou o teor de ácido linolênico plasmático e teve efeito sobre a produção de EROs *in vitro* por granulócitos dos equinos.

Palavras-chave: Cavalos. Nutrição. Gordura. Imunologia. EROs.

ABSTRACT

WEIGEL, R. A. **Biochemical profile, oxidative metabolism and polymorphonuclear cells function of horses fed with mineral, soybean, ricebran, linseed or fish oils.** [Perfil Bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe]. 2014. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Sports use made significant changes in horse's nutrition necessary. The high energy requirement is supplied with conserved forage, and large amounts of starch. This management, however, predisposes horses to digestive and metabolic disorders, leading to colic endotoxemia and laminitis. Another way to achieve the energy requirement is adding fat to the diet, as vegetable and animal oils may contain up to three times more energy than grains in equal volume. It is known that oils from different sources differ in their active components related properties, they may contain ω -3, ω -6, γ -oryzanol, in different quantities and these compounds can influence metabolism. The aim of this study was to evaluate the effect of different oils from different origins and composition on the maintenance of the horses biochemical and oxidative metabolism and on polymorphonuclear cells function. A Latin square design was made with five crossbreed horses fed during three weeks with the five treatments: mineral (control), soy, rice, linseed and fish oil. Biochemical profiles, oxidative metabolism respiratory-burst of granulocytes were evaluated. Treatment effect was found on the triglycerides, HDL cholesterol and hemoglobin levels, erythrocyte count, hematocrit and intensity of ROS production by granulocytes stimulated with Sa-PI. Conclusions: The addition of oil to the diet reduced plasma triglycerides, fat diets didn't offer major oxidative challenge and hemoglobin showed to be a more sensitive oxidative marker. Linseed oil increases the plasma levels of linolenic acid and had effects on the production of *in vitro* ROS by granulocytes of horses.

Keywords: Horse. Nutrition. Fat. Immunology. ROS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Valores totais de ácidos graxos saturados e insaturados (g/100g de ácidos graxos totais) e relação entre ácidos graxos poliinsaturados e total de ácidos graxos saturados (tamanho da esfera) dos óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe. São Paulo. 2012	24
Gráfico 2 - Valores de colesterol total (mmol/L) e fração LDL (mmol/L) e HDL (mmol/L) de colesterol de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe. São Paulo. 2012.....	28
Quadro 1 – Delineamento experimental quadrado latino com cinco tratamentos, óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe e cinco equinos, distribuídos em semanas.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição nutricional da ração comercial e feno <i>Cynodon sp.</i> - São Paulo - 2012	23
Tabela 2 -	Perfil de ácidos graxos de cadeia longa contidos na ração comercial e óleo mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe. - São Paulo - 2012	24
Tabela 3 -	Valores médios do peso vivo (kg) e diferença de peso vivo* (kg) e respectivos desvios padrão de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe. - São Paulo - 2012.....	27
Tabela 4 -	Médias e desvios padrão das variáveis bioquímicas de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. - São Paulo - 2012.....	28
Tabela 5 -	Perfil de ácidos graxos de cadeia longa (g/100g de ácidos graxos totais) no plasma de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. - São Paulo - 2012	29
Tabela 6 -	Valores de médias e desvios padrão do eritrograma de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. - São Paulo - 2012.....	42
Tabela 7 -	Valores de média e desvio padrão do estado antioxidante total sérico (TAS); habilidade de redução férrica plasmática (HRFP); das atividades eritrocitárias das enzimas glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase; dos teores séricos de malondialdeído (MDA) e ácido úrico de equinos mestiços alimentados com dietas contendo óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. – São Paulo - 2012	42
Tabela 8 -	Avaliação da fagocitose de granulócitos de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe, analisado por citometria de fluxo. Quantidade de células (%) e Intensidade de fagocitose, em valores arbitrários. – São Paulo - 2012	48
Tabela 9 -	Valores de médias e desvios padrão de granulócitos (%) produzindo ERO, <i>in vitro</i> , de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. Valores basais e frente a estímulos Sa-PI, LPS e PMA, analisados por citometria de fluxo. - São Paulo - 2012	49
Tabela 10 -	Valores de médias e desvios padrão da intensidade de produção de ERO por granulócitos, <i>in vitro</i> , de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. Valores basais e frente a estímulos Sa-PI, LPS e PMA, analisados por citometria de fluxo. - São Paulo - 2012	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	METABOLISMO LIPÍDICO	15
2.2	METABOLISMO OXIDATIVO	18
3	EFEITO DE DIETAS CONTENDO ÓLEOS VEGETAIS E ANIMAL SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO DE EQUINOS	21
3.1	INTRODUÇÃO	21
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.2.1	Análise estatística	26
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.5	CONCLUSÕES	31
4	BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO EM EQUINOS ALIMENTADOS COM ÓLEOS MINERAL, DE SOJA, ARROZ, LINHAÇA OU PEIXE	32
4.1	INTRODUÇÃO	32
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.2.1	Preparação da papa de hemácias	34
4.2.2	Métodos analíticos	35
4.2.3	Análise estatística	40
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.4	CONCLUSÕES	43
5	EFEITO A ALIMENTAÇÃO COM ÓLEO MINERAL, DE SOJA, ARROZ, LINHAÇA OU PEIXE SOBRE A IMUNIDADE INATA DE EQUINOS	44
5.1	INTRODUÇÃO	44
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.2.1	Análise estatística	47
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.4	CONCLUSÃO	50
	REFERENCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Quando em liberdade ou solto em piquetes, equinos tem habito organizado de colheita de pastagem, que abrange amplas áreas e espécies vegetais (STUTH, 1991). O tempo para cada atividade corresponde de 10 a 16 horas por dia para o pastejo, com duração de 2 a 3 horas para cada refeição, separadas por intervalos curtos usados para descanso, locomoção e atividades sociais, o pastejo noturno abrange 20 a 50% do tempo de ingestão diária (DITTRICH et al., 2010). Todas as etapas deste processo são relevantes e a interferência do homem, por meio do manejo, promove consequências importantes na alimentação, nutrição e saúde da espécie. A simples restrição do tempo de pastejo e/ou a baixa oferta de forragem diminuem o volume ingerido e, consequentemente, o conteúdo de nutrientes, principalmente os carboidratos estruturais, ou fibras (DITTRICH et al., 2010). As fibras formam a base da dieta de equinos e há muitas evidências da sua importância na dieta para prevenção de acidoses (MEDINA et al., 2002), cólicas (TINKER et al., 1997), úlceras gástricas (MURRAY et al., 1989) e desvios comportamentais (GILLHAM et al., 1994).

Quando a quantidade de fibra oferecida aos animais é insuficiente, os indicadores de saciedade, no sistema nervoso central, podem não ser ativados e os cavalos permanecem com alta motivação à procura de alimento (MCGREEVY et al., 1995). Assim, o modelo de nutrição com altas proporções de alimentos concentrados e pouco volumoso também aumenta a incidência de estereotipias (JOHNSON et al., 1998).

Quando há alto requerimento energético para animais estabulados, a necessidade de volumosos é suprida com o uso de forragem conservada, principalmente feno, e o incremento calórico é feito com grande quantidade de amido (MARQUEZE; KESSLER; BERNARDI, 2001). Este manejo predispõe os equinos a problemas digestivos e metabólicos, pois a ação das enzimas digestivas no intestino delgado é limitada e, consequente, há passagem de amido para o intestino grosso onde é fermentado rapidamente (HOFFMAN et al., 2003). Como consequências podem ocorrer endotoxemia, cólica, laminite e, em um prazo maior, resistência à insulina em cavalos obesos e de pouca atividade física (OLIVEIRA et al., 2010).

A adição de gordura na dieta tornou-se alternativa frequente, como relataram Marchello et al. (2000), como forma mais segura de incrementar o aporte energético de equinos. Porém, além de fornecer grande quantidade de energia, óleos de diferentes origens possuem composição lipídica variada e ainda podem conter mais substâncias de ação

metabólica. Assim, essa prática, cada vez mais comum, pode ter influencia sobre o metabolismo dos animais, dependendo do tipo de fonte lipídica utilizada e, portanto são necessários estudos que considerem a utilização de fontes lipídicas em cavalos em manutenção para verificar o efeito destes nutrientes no metabolismo animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO LIPÍDICO

Lipídios são compostos insolúveis com funções essenciais no organismo animal, tais como gerar energia para as células, composição das membranas celulares, solubilização de compostos não hidrossolúveis nos fluídos, manutenção nos alvéolos pulmonares e regulação fisiológica do organismo, quando compõem hormônios esteroides (SWENSON; REECE; 1996).

A digestão de gorduras é mais lenta que de carboidratos e proteínas, por isso a presença de lipídios no intestino delgado inibe o esvaziamento gástrico, para que a digesta passe ao intestino mais lentamente, dando tempo para o processamento dos lipídios aí presentes. A maior parte da gordura dos alimentos está na forma de triglicerídeos, este composto não é hidrossolúvel, por isso é emulsificado para ser absorvido pela mucosa intestinal. A lipase pancreática age neste emulsificado dividindo o triglicerídeo em uma molécula de β -monoglicerídeo e duas de ácidos graxos não esterificados (AGNE), formando a micela, uma solução solúvel. Ao entrar em contato com a membrana do jejuno, as micelas liberam os compostos dentro da célula epitelial. Nos enterócitos estes são reesterificados a triglicérides, que se associam a moléculas de colesterol, éster de colesterol e fosfolipídios formando os quilomícrons, composto hidrossolúvel semelhante às micelas. Os quilomícrons carregam a gordura pelo citoplasma, através da membrana celular da borda interna do enterócitos até os vasos linfáticos (SWENSON; REECE; 1996). A linfa transporta os quilomícrons para o sangue pelo ducto linfático torácico e o sangue os leva até os microcapilares dos tecidos adiposo e muscular, onde a enzima extracelular lipase lipoproteica hidrolisa os triglicerídeos dos quilomícrons em ácidos graxos e glicerol, que são transportados para os tecidos-alvo subjacentes. No músculo, os ácidos graxos são oxidados para gerar energia, já no tecido adiposo são reesterificados para serem armazenados como triglicerídeos (NELSON; COX, 2005).

Para a utilização da energia armazenada a lipase hormônio sensível libera ácidos graxos do triglicerol presente no tecido adiposo para a circulação. Estes ácidos graxos se ligam à albumina e são transportados aos tecidos alvo, como coração, músculos esqueléticos e fígado, para gerarem energia por meio da oxidação, ou para serem transformados em outros

compostos. O processo de decomposição dos quilomícrons, que libera os triglicerídeos para a célula, deixa como resíduo lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), esta é convertida em lipoproteína de baixa densidade (LDL) ainda no plasma. O fígado também sintetiza LDL, porém sua função maior é retirá-las do sangue, captando pelo menos 50% do total circulante. Esta lipoproteína é associada à arteriosclerose e a outras doenças quando encontrada em grandes quantidades no plasma, pois seu processamento plasmático favorece o depósito nos vasos sanguíneos. Já as lipoproteínas de alta densidade (HDL), são produzidas principalmente a partir de colesterol extra-hepático e também são captadas pelo fígado, fazendo uma ponte do colesterol tissular para o fígado, por isso sua concentração no sangue é inversamente relacionada a doenças vasculares (SWENSON; REECE; 1996).

Para avaliar o metabolismo energético frente à nutrição, é importante considerar não apenas o tipo de fonte de energia, como carboidrato ou lipídios, mas também que tipo de ácidos graxos compõe a fonte lipídica, pois a quantidade e o perfil de lipídios plasmáticos estão relacionados à abundância e composição lipídica da dieta.

Os AG são classificados quanto à saturação, em insaturados ou saturados. Os insaturados possuem uma ou mais ligações duplas, ou saturações, entre carbonos da molécula, enquanto os saturados não as possuem. Quando apresentam uma dupla ligação são chamados de monoinsaturados (MUFA) e quando possuem duas ou mais duplas ligações são chamados de poliinsaturados (PUFA). Quanto mais insaturado, mais suscetível o ácido graxo é à lipoperoxidação. O posicionamento da insaturação também é importante na característica metabólica deste composto. Identifica-se a primeira ligação dupla contando a partir do radical metil terminal como ω e o número do carbono, resultando em ω -1, ω -3, ω -6 etc. Embora algumas espécies de animais tenham capacidade de sintetizar ácidos dos grupos ômega três e seis a partir de fonte insaturada específica, os mamíferos não, pois não possuem enzimas dessaturases que adicionam a dupla ligação entre átomos de carbono na cadeia. Desta forma, ácidos graxos com esta configuração devem ser adquiridos pela dieta e são considerados ácidos graxos essenciais (AGE) (CALDER, 2001). Ácidos graxos podem ainda ser classificados segundo o tamanho de sua cadeia carbônica. São classificados como AG de cadeia curta, os que possuem menos de seis carbonos, média os com 6 a 12 carbonos, longa os com 12 a 22 carbonos e muito longa com mais de 22 carbonos (NELSON; COX, 2005).

Alguns ácidos graxos, devido à sua função, tem merecido considerável atenção de pesquisadores, em especial os ácidos linoleico e linolênico, ambos de cadeia longa com dupla ligação nas posições ω -6 e ω -3 respectivamente. O linoleico (ω -6) é encontrado nos óleos de milho, girassol e soja; enquanto que o linolênico (ω -3) é encontrado em óleos de canola,

linhaça e peixe (HALL; SAUN; WANDER, 2004). Os AG ω -6 e ω -3 são precursores de eicosanoides, substâncias envolvidas na cascata inflamatória, e têm importância fundamental como precursores lipídicos envolvidos em muitas funções fisiológicas.

Os lipídios adquiridos da dieta incorporados às membranas fosfolipídicas podem determinar alterações estruturais e funcionais desta estrutura, influenciando o metabolismo do animal. A metabolização do AG ácido linoleico produz ácido araquidônico (AA), e do ω -3 produz EPA e DHA e as membranas celulares incorporam, preferencialmente, ácido oleico, em seguida o araquidônico (AA), e depois os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (CALDER, 2001).

A resposta inflamatória faz parte do sistema de proteção do organismo frente a infecções e traumas. Porém, em diversas situações, essa resposta pode se mostrar excessiva, causando prejuízos aos tecidos e órgãos. A resposta inflamatória que ocorre pela via do AA é marcadamente mais intensa, pois produz fatores pró-inflamatórios mais potentes que aquela desencadeada pela via do EPA. Assim, os tipos de eicosanóides produzidos pelas células e, conseqüentemente, a comunicação entre as células do sistema imunológico pode, potencialmente, ser modulada através da suplementação dietética em PUFA, pois o maior teor de ω -3 em relação ao ω -6 na dieta permite que o primeiro seja preferencialmente incorporado (CALDER, 2001).

Os AG ω -3 e ω -6 competem pelas enzimas de dessaturação para formarem EPA, DHA e AA. Embora estas enzimas tenham maior afinidade pelos ω -3, a conversão do ácido linoleico em EPA e DHA é influenciada pelo teor de ácido linolênico na dieta. Assim, a razão entre o consumo de fontes de ω -3 e ω -6 mostra-se tão importante quanto à quantidade ingerida de cada. Em humanos, recomenda-se que a razão ω -6: ω -3 esteja entre 2:1 e 3:1, de forma a otimizar a conversão do ácido α -linoleico em EPA (MARTINS et al., 2006).

O consumo de óleos de peixe também reduz a resposta imune mediada por células, por diminuir a proliferação de linfócitos, toxicidade mediada por células T e macrófagos, quimiotaxia de monócitos e neutrófilos e atividade das células “natural-killer” (CALDER, 2001). Corroborando com estes estudos, Hall, Saun e Wander (2004) demonstraram que animais que receberam dietas com óleo de peixe inibiam a resposta da PGE₂ ao estímulo *in vitro* sem, contudo, reduzir a capacidade fagocítica dos macrófagos e a excreção de fator de necrose tumoral α , o que representa uma modulação da resposta imunológica. De Moffarts et al. (2007) suplementaram equinos com aproximadamente 2g, por animal, de EPA associado a vitaminas A, C e E, contido em extrato de óleo de peixe, por 14 dias. Foi observado aumento

significativo de ω -3 plasmático assim como redução da relação ω -6/ ω -3 frente ao grupo controle, indicando a boa absorção destes ácidos graxos.

Vários estudos apontam que dietas ricas em ω -3 trazem benefícios para a saúde humana, prevenindo enfermidades cardiovasculares, câncer de cólon, doenças imunomediadas e favorecendo o desenvolvimento cerebral e da retina (VALENZUELA; NIETO, 2001; HORNSTRA, 2002; GONZÁLES, 2003; VALENZUELA; NIETO, 2003). Em equinos, pesquisas recentes sugerem o benefício do ácido α -linoleico, com diferentes doses, em doenças articulares, nas respostas inflamatória e imunológica (HALL; SAUN; WANDER, 2004; HALL et al., 2004).

O óleo de arroz possui dois compostos ativos principais, o γ -orizanol, na quantidade de aproximadamente 3000mg/kg e a vitamina E, em cerca de 300mg/kg dividida em frações de α -tocoferol, α -tocotrienol, γ -tocoferol e γ -tocotrienol (SHIN et al., 1997). O γ -orizanol foi descrito pela primeira vez em 1954, por Kaneko e Tsuchiya, como uma substância única. Em 1998, Scavariello e Arellano revelaram que tal substância é um composto de estéril-ferulatos, chamados de α , β e γ -orizanol. A fração mais pesquisada é a γ -orizanol, por suas propriedades antioxidantes, redução do colesterol plasmático, inibição de agregação plaquetária, redução da biossíntese hepática de colesterol e aumento da excreção fecal de ácidos biliares (JULIANO et al., 2005).

No âmbito da clínica o óleo de arroz é recomendado para o tratamento de hiperlipoproteinemia em humanos, por reduzir os teores de colesterol total e da porção LDL e dos triglicérides plasmáticos (CICERO; GADDI, 2001; WILSON et al., 2007). Frank et al. (2005) utilizaram 700mL de tal óleo, em experimento com equinos, e confirmaram o efeito de redução de triglicérides e ácidos graxos não-esterificados nesta espécie, porém o teor de colesterol total aumentou. Em experimento semelhante realizado no Brasil, mais recentemente, as concentrações de colesterol total também foram elevadas (GOBESSO et al., 2011).

2.2 METABOLISMO OXIDATIVO

O metabolismo oxidativo é um sistema coadjuvante na maioria das reações metabólicas. Em qualquer sistema de reações químicas onde ocorre transferência de elétrons, o metabolismo oxidativo está presente. Os elementos principais deste sistema são as espécies

reativas (ER), anteriormente chamadas de radicais livres. A todo o momento são gerados ER que não necessariamente representam ameaça para o animal (GALIZIA; WAITZBERG, 2001). Define-se ER como espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado no orbital externo. Nos organismos aeróbicos as ER de maior importância são as decorrentes do metabolismo do oxigênio e são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO). As espécies reativas são produzidas a todo o momento inclusive durante o repouso, porém seu efeito é significativo basicamente em dois processos. Durante a respiração celular, no sistema de transporte de elétrons localizado na membrana mitocondrial interna, reagindo com compostos orgânicos e inorgânicos, degradando-os (GALIZIA; WAITZBERG, 2001); e nas ações das células polimorfonucleares ao fagocitarem e destruírem bactérias e alguns tipos de vírus (SOFFLER, 2007).

Os PUFA, presentes nas membranas celulares, possuem duplas ligações entre alguns dos seus átomos de carbono, as quais são vulneráveis a ação das EROs, resultando na peroxidação lipídica, o que pode desencadear alterações na permeabilidade das membranas celulares, perda da homeostase intracelular por intenso desequilíbrio iônico, levando à ruptura da membrana e, conseqüentemente à morte celular (GALIZIA; WAITZBERG, 2001).

O sistema antioxidante, formado por proteínas, vitaminas e outros compostos biológicos, tem como função neutralizar ou até mesmo reverter lesões causadas pelas EROs. Porém em algumas situações onde há excesso destas EROs ou quando existe menor concentração de substâncias antioxidantes, ocorre o chamado estresse oxidativo, que pode levar à extensa lesão celular (GALIZIA; WAITZBERG, 2001).

Os compostos antioxidantes são classificados como endógenos, quando sintetizados no organismo; ou exógenos, quando obtidos da dieta ou de outra fonte suplementar. Destacam-se entre as substâncias endógenas a catalase, a glutathione peroxidase (dependente do selênio), glutathione redutase, a superóxido dismutase e o ácido úrico (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 1996). Os antioxidantes exógenos mais comuns são os tocoferóis (vitamina E), carotenóides e flavonóides. Como estes antioxidantes estão disponíveis na natureza, suas concentrações podem ser manipuladas através da suplementação e de modificações dietéticas (GALIZIA; WAITZBERG, 2001).

A atividade antioxidante da vitamina E e do γ -orizanol reduzem a geração de produtos tóxicos da oxidação do colesterol, pode ser essa a causa da característica hipocolesterêmica destes nutrientes (XU; HUA; GODBER, 2001). O efeito tanto do óleo de arroz, como de tantos outros óleos sobre a oxidação do colesterol em equinos ainda não está totalmente

esclarecido. Este conhecimento ajudaria a entender a verdadeira ação deste nutriente sobre os teores de colesterol plasmático na espécie equina.

Estudos sobre a relação do ω -3 com o estresse oxidativo foram reportados na literatura humana e veterinária (DE MOFFARTS et al., 2007). A insaturação dos PUFAS pode favorecer o metabolismo oxidativo, pela liberação de espécies reativas, aumentando a lipoperoxidação (SAPATA, 2008). Algumas pesquisas descrevem aumento no metabolismo oxidativo em indivíduos suplementados com ω -3, no entanto este efeito ainda não é totalmente estabelecido tanto para humanos como para animais. (BERGAMO et al., 2006; DE MOFFARTS et al., 2007).

O melhor conhecimento a respeito dos efeitos de diferentes tipos de fonte lipídica sobre o metabolismo de equinos pode propiciar a utilização mais consciente e adequada deste recurso para animais em condições fisiológicas variadas.

3 EFEITO DE DIETAS CONTENDO ÓLEOS VEGETAIS E ANIMAL SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO DE EQUINOS

3.1 INTRODUÇÃO

Considerando a forma natural de vida dos equinos, resultado de sua evolução, o manejo nutricional moderno destes animais impôs mudanças substanciais na qualidade, frequência e quantidade de alimento ingerido. A domesticação e uso intensivos destes animais para trabalho e esporte resultaram em requerimento energético impossível de ser atingido pelo simples pastejo nos intervalos restantes entre atividades.

A forma mais comum de atender à maior demanda energética de equinos é aumentar o fornecimento de carboidratos. Esta prática, porém, predispõe a distúrbios metabólicos como síndrome cólica e laminite (OLIVEIRA et al., 2010). A alternativa é a suplementação com gordura que fornece mais energia em menor volume, evitando a sobrecarga por grãos e reduzindo os riscos metabólicos (MARCHELLO; MARCHELLO; CUNEO, 2000). Assim, o uso de óleo parece ser uma boa opção para categorias de alta exigência energética, como animais de alto desempenho esportivo, éguas em final de gestação e em lactação, garanhões em estação reprodutiva (LANA; MOURA; RESENDE, 2004) e também para animais com algum distúrbio que interfira na ingestão e absorção de energia alimentar.

Óleos de diferentes fontes, vegetais ou animais, diferem quanto a sua composição de ácidos graxos e conteúdo de outras substâncias ativas. Óleos de linhaça e peixe são conhecidos por conter maior quantidade dos ácidos graxos ω -3 que óleos de soja e milho, já o óleo de arroz é rico em γ -orizanol. Os benefícios destes componentes no metabolismo de equinos têm sido estudados por diversos centros de pesquisa, com o intuito de esclarecer seus efeitos, principalmente em animais atletas (CICERO; GADDI, 2001; WILSON et al., 2007; FRANK et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009; GOBESSO et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de cinco óleos, de diferentes origens e composições, sobre o metabolismo de equinos em regime de manutenção.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco equinos mestiços, machos e castrados, com idade média de 5,8 anos (+/- 7 meses); peso vivo inicial médio de 357,1kg (+/- 11,51kg) e escore de condição corporal entre 6 e 7 (HENNEKE et al., 1983). Os animais permaneceram, durante todo o experimento, em baias individuais, providas de comedouro e bebedouro e localizadas nas dependências do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Inicialmente os animais foram vermifugados e adaptados ao manejo e à dieta. Esta última era composta por feno de *Cynodon* sp, *Tifton 85*, tipo A, concentrado comercial (Tabela 1), suplemento mineral em bloco*, disponível na baia de cada cavalo e água *ad libitum*. O cálculo da dieta foi fundamentado nas exigências de manutenção do NRC de equinos (1989), que norteou a quantidade inicial de alimento oferecida com base na porcentagem do peso vivo de cada cavalo. Nos primeiros oito dias não foi adicionado óleo, este período teve o objetivo de adaptar os animais às quantidades e qualidade do novo feno e concentrado. Em seguida, o óleo de soja foi introduzido gradualmente para todos os animais até atingir a quantidade de 5%, na matéria seca (MS), da exigência para manutenção. Finalmente buscou-se encontrar a quantidade de alimento que não induzisse a variação de peso de cada animal, o que variou entre 1,5% e 2% do peso vivo (PV) em MS. Este dado foi obtido por meio do monitoramento do peso vivo semanal durante as seis semanas deste período de adaptação.

Assim, após o período de adaptação, ficou estabelecido que, para manter o peso constante, quatro animais receberiam 1,5% e um animal receberia 2% do PV em MS. A dieta foi constituída de forma que o feno perfazia 87,5% da MS; o óleo, 5%; e o concentrado comercial os 7,5% restantes. O alimento foi fornecido em duas refeições diárias, compostas por feno, concentrado e fonte lipídica ou óleo mineral, dependendo do tratamento. Em média, foi utilizado durante o período 5kg de feno, 0,6kg de concentrado e 300g de óleo por dia. Cada refeição foi pesada individualmente, de forma que cada animal recebeu exatamente a quantidade de alimento calculada. A ração foi pesada em balança de bancada (capacidade para 2 kg e sensibilidade para 0,02g) em potes identificados com o nome do animal, em seguida adicionava-se a quantidade calculada de óleo. O feno foi pesado dentro de sacos

* Nota: Sal mineral para Equinos Blokus 60 Supra®. Composição: Ca: 160g/kg; P: 60g/kg; Mg: 15g/kg; Na: 180g/kg; Zn: 3g/kg; Cu: 1g/kg; Mn: 1,5g/kg; Fe: 1,5g/kg; Se: 0,02g/kg; I: 0,050g/kg; Co: 0,02g/kg; S: 0,015mg/kg; F: 0,584g/kg.

plásticos também identificados, em balança de chão (capacidade para 50 kg e sensibilidade para 10 g).

Tabela1- Composição nutricional da ração comercial e feno *Cynodon* sp. - São Paulo - 2012

	Ração	Feno
Umidade (%)	13,00	8,26
Proteína Bruta (%)	12,00	13,22
Extrato Etéreo (%)	2,00	-
Matéria Fibrosa(%)	15,00	-
Matéria Mineral (%)	15,00	-
Cálcio (%)	1,50	-
Fósforo (%)	0,50	-
ED (mcal/Kg)	3,00	-
MS (%)	87,00	91,75

*Produto comercial Royal Horse Rodeio[®], Marca Socil Evialis.

As fontes lipídicas utilizadas foram óleo de soja, arroz, linhaça dourada e peixe. O óleo mineral foi utilizado como controle negativo e foi adquirido a granel em farmácia veterinária de manipulação. Os óleos de soja e linhaça dourada eram de consumo humano. O óleo de arroz utilizado foi produto comercial específico para equinos e o óleo de peixe foi adquirido em empresa de nutrição animal. O perfil de ácidos graxos de cadeia longa de todos os óleos (tabela 2 e Gráfico 1) foi determinado no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A proteína bruta, matéria seca e umidade do feno foram determinadas no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas do Departamento de Clínica Médica da mesma instituição.

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos de cadeia longa contidos na ração comercial e óleo mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe. - São Paulo - 2012

	Concentrado	Mineral	Soja	Arroz	Linhaça	Peixe
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
C12:0	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
C14:0	0,46	0,00	0,05	10,43	0,07	5,35
C16:0	13,61	0,00	10,64	10,63	4,96	19,30
C18:0	1,25	0,00	2,68	1,36	3,62	3,43
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,54	0,00	0,00
Total de Saturados	15,75	0,00	13,37	23,09	8,65	28,17
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,12
C16:1	0,00	0,00	0,00	0,85	0,05	6,86
C17:1	12,58	0,00	0,00	20,09	0,00	0,28
C18:1 ω -9	15,72	0,00	25,04	21,11	19,56	35,62
Total de MUFA	28,31	0,00	25,04	42,11	19,61	42,87
C18:2 ω -6	41,48	0,00	51,55	15,40	14,95	17,95
C18:3 ω -3	2,60	0,00	0,00	0,35	52,49	5,32
C18:3 ω -6	0,00	0,00	5,13	0,00	0,00	0,00
Total de PUFA	44,08	0,00	56,68	15,75	67,44	23,26
Total de Insaturados	72,38	0,00	81,72	57,86	87,05	66,14
Outros	11,87	0,00	4,91	19,05	4,30	5,69
Total final	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Índice PUFA:Saturados	2,80	0,00	4,24	0,68	7,80	0,83

Nota: C10:0-Cáprico; C11:0-udecanóico; C12:0-Láurico; C14:0-Mirístico; C16:0-Palmítico; C18:0-Esteárico; C20:0-Araquídico; C14:1-Miristoléico; C16:1-Palmitoléico; C17:1-Heptadecanóico; C18:1 ω -9-Oléico; C18:2 ω -6 -Linoléico; C18:3 ω -3 - Linolênico; C18:3 ω -6 - Gama-Linolênico

Gráfico 1 - Valores totais de ácidos graxos saturados e insaturados (g/100g de ácidos graxos totais) e relação entre ácidos graxos poiliinsaturados e total de ácidos graxos saturados (tamanho da esfera) dos óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe. São Paulo. 2012

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino cinco por cinco (Quadro 1), sendo que o período experimental foi composto por três semanas, duas de adaptação e uma para avaliação e coleta de dados.

Quadro 1 – Delineamento experimental quadrado latino com cinco tratamentos, óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe e cinco equinos, distribuídos em semanas

Período experimental	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	Equino 5
Adaptação					
semana 1 a 3	MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE
semana 4 a 6	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	MINERAL
semana 7 a 9	LINHAÇA	PEIXE	MINERAL	SOJA	ARROZ
semana 10 a 12	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	MINERAL	SOJA
semana 13 a 15	PEIXE	MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA

Amostras de sangue foram coletadas ao final da terceira semana de cada período por punção da veia jugular, em tubos a vácuo siliconados, para a obtenção de soro (sem anticoagulante), plasma (com fluoreto de sódio) e sangue total (com ácido diamino tetracético – EDTA).

As amostras de sangue sem anticoagulante foram mantidas à temperatura ambiente, enquanto que as demais, com anticoagulante, foram homogeneizadas, prontamente refrigeradas e conduzidas ao laboratório para processamento. Todos os tubos foram submetidos à centrifugação, por período de 15 minutos a 500 G. Alíquotas de soro e plasma foram acondicionadas em microtubos plásticos e armazenadas à temperatura de -20°C , para posterior análise laboratorial.

A análise do perfil bioquímico sanguíneo dos animais foi totalmente realizado em analisador bioquímico automático da marca RANDOX[®], modelo Daytona[®], utilizando kits específicos da mesma marca. Foram determinadas as concentrações plasmática de glicose (GL3815) e lactato (LC3980) e as concentrações séricas de, lactato desidrogenase (LDH-LD3818), albumina (AB3800), a proteína total (TP4001), bilirrubinas direta e total (BR3859 e BR3807, respectivamente), triglicérides (TR3823), fosfatase alcalina (FA-AP3803), aspartato amino transferase (AST-AS3804), gama glutamil transferase (GGT-GT3817), creatina quinase (CK-CK110), colesterol total (CH3810), fração lipoproteica de baixa densidade do colesterol (LDL-CH2657), fração lipoprotéica de alta densidade do colesterol (HDL - CH3811) e ácidos graxos não esterificados (AGNES - NE FA115).

3.2.1 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por “outliers” através do procedimento UNIVARIATE do SAS. Os dados que não atenderam à premissa da normalidade dos resíduos foram submetidos à transformação logarítmica ou pela raiz quadrada. Os dados, transformados ou não, foram submetidos à análise de variância para delineamento em quadrado latino 5 x 5. O modelo contemplou, como causas de variação, o efeito de tratamento como efeito fixo e efeito de animal e de período como efeitos aleatórios. A separação dos efeitos de tratamento foi realizada pelo teste de Tukey. Para todos os testes avaliados considerou-se o nível de significância de 5%.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve, em nenhum momento ou por algum cavalo, rejeição a qualquer um dos óleos oferecidos. Os animais consumiram todo o alimento, sem sobras em todos os dias do período experimental. Não foram observados sinais de desconforto abdominal e as fezes permaneceram uniformes durante todo o período experimental.

Em relação ao comportamento, os cavalos manifestavam calma e, mesmo mantidos em baias individuais, em nenhum momento apresentaram comportamento estereotipado. Embora não tivesse sido objetivo do nosso estudo esta avaliação, notou-se maior disposição, tanto quando da comparação com outros animais de pesquisa, presentes no mesmo ambiente e que não participavam do experimento quanto na comparação com os mesmos cavalos do experimento, antes de começarem a receber os óleos.

Os cinco equinos envolvidos neste estudo permaneceram, a maior parte do tempo nas baias individuais. Foram soltos em piquetes pequenos apenas duas vezes por semana durante as duas semanas iniciais do período experimental. Como o alimento era controlado para que os cavalos mantivessem o peso, esperava-se que com a inclusão do óleo na dieta, houvesse maior tempo de ócio e assim houvesse algum tipo de comportamento estereotipado por parte dos animais, já que dietas com elevada participação de concentrados com consequente menor

participação da fibra, embora satisfaçam a exigência energética dos equinos, ainda mantem a motivação por ingestão de forragem (MCGREEVY et al., 1995). Em nosso estudo, as dietas tiveram elevada participação da fibra e os óleos reduziram a participação do concentrado, e provavelmente a ausência de comportamento estereotipado ocorreu devido ao fato das dietas compostas por fibras e óleo para equinos reduzirem a velocidade de ingestão e de esvaziamento gástrico, estendendo a sensação de saciedade (HOTHERSALL; NICOL, 2009). Assim, a dieta utilizada associada a períodos de liberdade explicam a disposição dos animais sem sinais de estresse ou vícios. É importante considerar também que o tipo de óleo utilizado pode influenciar no comportamento dos animais. Pesquisas com humanos e ratos relacionaram dietas ricas em ω -3 com redução de ansiedade em ratos (FERRAZ et al., 2011) e maior tranquilidade e maior atenção em crianças (SCHUCHARDT et al., 2010).

Durante todo o período do experimental não foi observada mudança de peso entre os cavalos (Tabela 3)

Tabela 3 – Valores médios do peso vivo (kg) e diferença de peso vivo* (kg) e respectivos desvios padrão de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe. - São Paulo - 2012

	MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
Peso (kg)	365,9 (12,0)	364,2 (7,9)	369,4 (11,3)	363,3 (8,6)	368,7 (8,7)	0,8250
Diferença de peso (kg)*	1,5 (3,1)	0,8 (0,8)	3,5 (4,3)	-1,6 (3,0)	1,0 (2,7)	0,1540

*diferença entre o peso vivo entre a terceira e primeira semanas de tratamento

Na avaliação do perfil bioquímico renal e hepático (tabela 4) observamos que os resultados ficaram dentro do intervalo considerado fisiológico para a espécie e sem efeito do tratamento.

Considerando os tratamentos que continham AG, o óleo de peixe foi o tratamento que continha mais gordura saturada, seguido pelos óleos de arroz, de soja e de linhaça. A saturação dos óleos é benéfica na medida em que aumenta sua estabilidade oxidante tanto no produto como no organismo. Porém, também está associada ao aumento de colesterol LDL em humanos, que tem efeito deletério à saúde (ZAMBIASI et al., 2007). O óleo com maior quantidade de gordura insaturada foi o de linhaça, seguido pelos óleos de soja, de peixe e de arroz. Maiores quantidades de ácidos graxos poli-insaturados proporcionam melhor relação entre os colesterolis LDL e HDL, favorecendo o aumento do HDL. Entretanto, a instauração favorece a lipoperoxidação no organismo, o que pode resultar na formação de produtos tóxicos, lesão celular e toxicidade de membrana celular (ZAMBIASI et al., 2007).

Tabela 4 – Médias e desvios padrão das variáveis bioquímicas de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. - São Paulo - 2012

		MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
Triglicérides (mmol/L)	Média	0,47^A	0,28^B	0,28^B	0,31^B	0,24^B	0,0009
	DP	0,14	0,07	0,11	0,08	0,09	
Glicose (mmol/L)	Média	4,05	4,47	4,32	4,41	3,96	0,1010
	DP	0,80	0,69	0,60	0,85	1,04	
β -hidroxibutirato (mmol/L)	Média	0,020^{AB}	0,018^{AB}	0,021^A	0,016^B	0,019^{AB}	0,0282
	DP	0,11	0,08	0,10	0,09	0,12	
NEFA (μ mol/L)	Média	79,60	76,80	62,80	61,80	55,20	0,3236
	DP	37,38	27,84	9,11	24,89	18,71	
Colesterol (mmol/L)	Média	2,26	2,84	2,43	2,82	2,66	0,3160
	DP	0,63	0,49	1,26	0,47	0,80	
LDL Colesterol (mmol/L)	Média	0,57	0,65	0,71	0,63	0,64	0,1282
	DP	0,16	0,20	0,27	0,25	0,21	
HDL Colesterol (mmol/L)	Média	1,25^B	1,69^A	1,68^A	1,74^A	1,48^{AB}	0,0042
	DP	0,38	0,20	0,38	0,42	0,44	
Lactato (mmol/L)	Média	0,46	0,37	0,43	0,43	0,45	0,8191
	DP	0,15	0,07	0,09	0,29	0,15	
AST (U/L - 30°C)	Média	142,78	149,77	148,07	149,88	141,80	0,8655
	DP	51,82	23,82	61,78	39,09	40,89	
GGT (U/L - 30°C)	Média	9,06	9,49	8,87	9,09	8,49	0,9319
	DP	2,94	1,19	2,53	2,20	1,30	
FA (U/L 30°C)	Média	208,96	229,44	220,20	198,48	183,07	0,3869
	DP	94,17	70,11	113,88	30,59	66,14	
CK (U/L) (30°C)	Média	102,53	119,32	123,91	119,98	117,88	0,3868
	DP	37,86	23,40	56,83	61,07	32,09	
LDH (U/L)	Média	328,90	340,53	327,65	343,46	306,43	0,4085
	DP	114,01	65,25	127,70	75,74	84,53	
Bilirrubina Total (U/L)	Média	23,87	25,48	27,67	25,79	28,49	0,1249
	DP	4,05	3,11	4,92	4,86	5,52	
Bilirrubina Direta (U/L)	Média	8,58	9,58	9,54	9,64	9,64	0,2332
	DP	1,20	1,53	1,26	1,67	1,32	
Proteína Total (g/L)	Média	57,63	61,87	57,72	62,02	57,70	0,5138
	DP	14,14	7,49	20,15	11,94	16,89	
Albumina (g/L)	Média	31,80	33,20	30,60	33,00	31,40	0,6775
	DP	7,55	3,49	9,97	5,33	7,34	
Uréia (mmol/L)	Média	4,93	5,01	4,48	5,38	4,62	0,3823
	DP	1,07	0,73	1,21	1,21	1,09	
Creatinina (μ mol/L)	Média	102,37	109,62	100,25	105,73	96,89	0,5136
	DP	19,50	19,78	30,17	25,45	29,61	

Gráfico 2 – Valores de Colesterol Total (mmol/L) e frações LDL (mmol/L) e HDL (mmol/L) de colesterol de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe - São Paulo – 2012

O ácido linolênico é um AG ω -3 relacionado a uma variedade de efeitos benéficos sobre a saúde humana (SHAPIRO, 2003; VANSCHOONBEEK; MAAT; HEEMSKERK, 2003), porém também aumenta reações de lipoperoxidação e aumento da carga oxidante no organismo. O óleo de linhaça, por conter grande quantidade de ácido linolênico não é recomendado para consumo humano prolongado e em quantidade (CHEN; JU, 2001). No presente estudo o óleo de linhaça apresentou a maior quantidade de PUFA, e determinou maior teor de ácido linolênico ω -3 no plasma ($p=0,0001$), como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos de cadeia longa (g/100g de ácidos graxos totais) no plasma de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. - São Paulo - 2012

		MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
C11:0	Média	0,06	0,17	0,30	0,14	0,13	0,6571
	DP	0,11	0,15	0,29	0,27	0,26	
C13:0	Média	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,4449
	DP	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	
C14:0	Média	0,23	0,02	0,17	0,14	0,16	0,8919
	DP	0,46	0,04	0,28	0,28	0,31	
C16:0	Média	17,02	10,72	15,83	10,93	14,95	0,1419
	DP	5,55	4,59	5,01	4,47	3,65	
C18:0	Média	16,41	13,66	18,08	20,38	17,66	0,5064
	DP	5,36	4,47	5,51	8,78	5,41	
C20:0	Média	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,4449
	DP	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	
Total de Saturados		34,19	24,57	34,38	31,58	32,90	
C18:1 ω -9	Média	10,55	8,13	12,03	7,51	7,35	0,1064
	DP	2,95	3,85	3,51	1,97	2,63	
C18:2 ω -6	Média	30,70	31,84	38,01	30,48	23,84	0,4332
	DP	12,53	11,36	8,65	14,43	7,98	
C18:3 ω -3	Média	1,64^B	0,42^B	0,23^B	4,49^A	0,07^B	0,0001
	DP	0,60	0,48	0,30	2,13	0,14	
Total de Insaturados		41,25	39,97	50,04	37,99	31,19	
Outros		24,56	35,46	15,58	30,42	35,91	

Nota: C11:0-udecanóico; C13:0-Tridecanóico; C14:0-Mirístico; C16:0-Palmítico; C18:0-Esteárico; C20:0-Araquídico; C18:1 ω -9-Oléico; C18:2 ω -6 -Linoléico; C18:3 ω -3 - Linolênico.

Os tratamentos lipídicos apresentaram menor teor de triglicerídeos ($p = 0,0009$) que o controle, mesmo estando todos os valores dentro da referência de normalidade, 0,1 a 0,5mmol/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Pesquisas com maior proporção de gordura que carboidratos na nutrição de humanos e animais de laboratório demonstraram que

dietas ricas em gordura reduzem os triglicérides plasmáticos (SWIFT et al., 1992). Em equinos, porém, este tipo de alimentação gerou efeitos controversos. Alguns estudos revelaram redução de triglicérides (GEELEN; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN; BEYNEN, 1999; HARRIS et al., 1999) com doses superiores a 220g de óleo e período experimental maior que seis semanas. Estudos posteriores utilizando 300g de óleo e período experimental de 2 semanas (RIBEIRO et al., 2009; GOBESSO et al., 2011), ou dose de 150g de óleo em quatro semanas de tratamento não encontraram diferenças (HALLEBEEK; BEYNEN, 2001). Assim, podemos inferir que essa diversidade de resultados pode estar relacionada ao tempo de suplementação com o óleo, pois a adaptação metabólica do organismo à dietas ricas em gordura ocorre em 14 dias nos equinos (JULIEN et al., 1995). Estes dados devem ser considerados quando se avaliam estudos realizados com delineamento em quadrado latino, principalmente quando há tratamentos sem a suplementação de fonte lipídica, pois a duração dos períodos com e sem o óleo podem influenciar os resultados.

Os resultados aqui reportados estão de acordo com Geelen et al. (1999) e Harris et al. (1999), que demonstram que a redução dos triglicérides plasmáticos de equinos alimentados com dietas ricas em gordura está relacionado tanto à dose de óleo como com o período de tratamento. O tipo de fonte lipídica utilizada não influencia neste efeito, como já relatado por Hallebeek e Beynen (2001).

Os valores ilustrados no gráfico 2 indicam que o colesterol total não foi alterado pelos tratamentos, porém sua fração HDL foi maior para o tratamento com soja, linhaça e arroz que para o mineral ($P=0,0042$), sem diferenças para o óleo de peixe. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que também observaram maior HDL, sem diferença para o LDL, com dietas ricas em óleos vegetais diferentes, como soja, arroz (FRANK et al. 2005; GOBESSO et al., 2011). Watson, Packard e Shepherd (1993) relataram que 61% do colesterol circulante no sangue de equinos é carregado por HDL, enquanto apenas 29% é encontrado em LDL. GEELEN (2001), atribuiu os maiores teores de HDL observados em cavalos alimentados com gordura à maior transferência do colesterol para HDL durante a lipólise, estes dois estudos estão de acordo com os resultados aqui relatados.

Como já demonstrado, dietas ricas em gorduras aumentam o teor de HDL no plasma. Neste contexto, Stanley (1986) relatou que a atividade da enzima Lipoproteína lipase (LPL) é diretamente correlacionada com o HDL, da mesma forma que, em equinos, dietas ricas em gordura aumentam a atividade LPL (HALLEBEEK; BEYNEN, 2001). Esta enzima libera os triglicerídeos transportados pelos quilomícrons, aumentando o fluxo de ácidos graxos no sangue, sem importar o tipo de gordura suplementada na dieta (HALLEBEEK; BEYNEN,

2001). O comportamento desta variável observado no tratamento com óleo de peixe deve ser decorrente da digestibilidade de lipídios ser maior para óleos vegetais que para os de origem animal (MEYER. 1995), o óleo de peixe não foi metabolizado na mesma proporção dos outros tratamentos e, por isso, seu efeito sobre o HDL foi intermediário, sem diferença marcante tanto em relação ao controle como em relação aos outros tratamentos.

3.5 CONCLUSÕES

Dietas balanceadas substituindo 5% da matéria seca, na forma de óleo de soja, linhaça, arroz e peixe, são seguras e eficazes para manutenção de equinos hígidos e sem atividade de lazer ou esportiva.

Dietas de manutenção compostas por 87,5% de volumoso sob a forma de feno de boa qualidade e 5% de óleos de soja, ou de linhaça, ou de arroz, ou ainda de peixe na matéria seca, por três semanas, reduzem o teor de triglicérides plasmático.

4 BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO EM EQUINOS ALIMENTADOS COM OS ÓLEOS MINERAL, DE SOJA, ARROZ, LINHAÇA OU PEIXE

4.1 INTRODUÇÃO

A nutrição de cavalos com dietas ricas em óleo é frequente em centros de treinamento, como forma de incrementar o aporte energético sem incorrer nos riscos do excesso de carboidratos. Esta dieta também poder ser utilizada para animais hospitalizados com distúrbios que prejudiquem a ingestão de alimento ou absorção de nutrientes, ou ainda que necessitem de maior aporte energético. Porém, o consumo de dietas ricas em gordura, principalmente insaturadas, induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo resultar em estresse oxidativo (IBRAHIM et al., 1997a). Situações em que a geração de substâncias pró-oxidantes aumentam ao ponto de o sistema antioxidante não ser mais capaz de equilibrar o processo, são conhecidas como estresse oxidativo (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005). O sistema antioxidante é um mecanismo complexo que o organismo utiliza para se proteger dos efeitos deletérios das ERO.

A oxidação sistemática de ácidos graxos no metabolismo da gordura ingerida é chamada lipoperoxidação (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005), no caso de dietas ricas em óleo, esse processo é exacerbado, favorecendo a formação de EROs. O sistema antioxidante atua reduzindo os efeitos oxidativos deste metabolismo, inibindo a lipoperoxidação e melhorando as defesas antioxidantes, por aumentar a produção de antioxidantes endógenos. Assim, esse processo pode ser estimado tanto pela mensuração das atividades de enzimas do sistema antioxidante como pelos produtos da reação, também considerados metabólitos da oxidação (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005).

O malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBARS) são substâncias mensuráveis resultantes da lipoperoxidação e têm sido frequentemente utilizados para avaliar danos causados por ERO a lipídios (SUN et al., 2010).

Pesquisas indicam que a glutathione tem papel importante na prevenção de danos causados pela lipoperoxidação relacionada ao estresse oxidativo, de forma que a manutenção de seu equilíbrio é fundamental para o equilíbrio oxidativo (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005). A glutathione reduzida (GSH) está presente tanto do citosol como na mitocôndria, sua

ressíntese ocorre principalmente no fígado, que supre cerca de 90% da GSH circulante. A enzima glutathione reductase (GR) restaura a GSH a partir da glutathione oxidada, usando hidreto de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (LAIRES et al., 1993; VIGUIE et al., 1993). A enzima eritocitária glutathione peroxidase (GPx) protege a hemácia de danos oxidativos, neutralizando hidroperóxidos (JANIÁK et al., 2010). A catalase atua, de forma semelhante à superóxido dismutase (SOD), neutralizando peróxido de hidrogênio (VÁSQUEZ-GARZÓN et al., 2009), está localizada no peroxissoma, organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (VASCONCELOS et al., 2007).

O superóxido é a ERO mais conhecida e estudada, é produzido na fosforilação oxidativa fisiológica. Esta substância é neutralizada pela enzima endógena SOD. Esta enzima existe em três formas diferentes, por sua ligação com ferro, manganês ou cobre e zinco (LERCH; AMMER, 1981).

O ácido úrico (AU) é um produto da oxidação de xantinas, no metabolismo das purinas. Trata-se de importante antioxidante não enzimático, sua concentração no plasma é maior que a de vitaminas antioxidantes como a C e E (VASCONCELOS et al., 2007).

A capacidade antioxidante do organismo pode ser estimada por diversos ensaios citados na literatura, que variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. Exemplo disto é o teste que indica a capacidade antioxidante total no plasma, conhecido como TAS. Nesta categoria também se pode incluir a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) ou FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) e o TAS, porém a redução detectada nos teores desta capacidade não deve ser interpretada necessariamente como estresse oxidativo, pode significar simplesmente que o sistema antioxidante foi usado para desempenhar sua função (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O valor de HRFP mensura o potencial antioxidante do plasma, com base no princípio de que a habilidade de um composto em produzir Fe^{+2} a partir de Fe^{+3} define seu poder antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007).

Como a utilização de óleos na alimentação de equinos tem aumentado gradualmente e devido ao aumento no consumo de gordura insaturada, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição dos óleos de soja, arroz, linhaça, peixe ou ainda de óleo mineral sobre o metabolismo oxidativo de equinos em regime de manutenção.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O modelo estatístico utilizado foi o quadrado latino cinco por cinco, em que cinco equinos passaram por cinco tratamentos. Foram utilizados cinco equinos mestiços, machos castrados, com média de idade de 5,8 anos ($\pm 0,6$) e peso vivo inicial médio de 357,1kg ($\pm 11,5$). Os animais ficaram alocados nas dependências do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em baias individuais providas de cocho e bebedouro.

As cinco dietas experimentais diferiam pela fonte lipídica utilizada que podia ser ou óleo mineral (controle), ou óleo de soja, ou óleo de linhaça, ou óleo de peixe ou ainda óleo de arroz. O cálculo da exigência nutricional foi feito com base no NRC de equinos (1989), a energia foi calculada com base na matéria seca (MS) do alimento e peso vivo (PV) dos animais, e os óleos perfaziam 5% do requerimento do total de MS. As dietas foram compostas por feno de ótima qualidade, concentrado comercial, indicado para equinos em regime de manutenção e a fonte lipídica. Os alimentos foram fornecidos em duas refeições diárias.

As amostras de sangue foram coletadas ao final da terceira semana de cada tratamento, sempre pela manhã, antes da primeira refeição do dia. As amostras de sangue sem anticoagulante foram mantidas à temperatura ambiente, enquanto que as demais, com anticoagulante, foram homogeneizadas, prontamente refrigeradas e conduzidas ao laboratório para processamento. Todos os tubos foram submetidos à centrifugação, por período de 15 minutos a 500 G. Alíquotas de soro, plasma e papa de hemácias foram acondicionadas em tubos tipo “Eppendorf”[®] e armazenadas à temperatura de -20°C , para posterior análise laboratorial.

4.2.1 Preparação da Papa de hemácias

A papa de hemácias foi obtida após a separação do plasma e lavagem das hemácias. Inicialmente as amostras de sangue coletadas em tubos com anticoagulante heparina lítica e foram centrifugadas a 1831G, 4°C , por 15 minutos. Então o plasma foi retirado e o mesmo tubo foi completado com solução salina tamponada (PBS). Tomou-se o cuidado para que esse procedimento fosse feito sobre uma balança, para que todos os tubos ficassem com mesmo

peso e não houvesse problemas com o balanceamento da centrífuga. Após a adição do PBS os tubos foram homogeneizados em homogeneizador automático até que nenhuma placa de sangue estivesse aderida à parede do tubo. Só então os tubos foram novamente centrifugados, nas mesmas condições anteriores. Ao final da centrifugação era possível observar um botão sobrenadante de leucócitos, cobrindo as hemácias, essa camada foi gentilmente retirada com pipeta pasteur, junto com todo o PBS, sem tocar nas hemácias na parte inferior do tubo. Esse procedimento completo foi repetido outras duas vezes. Ao final da terceira lavagem o PBS foi retirado e a papa de hemácias acondicionada em microtubos âmbar e armazenados em ultra-freezer a -80°C , em duplicata.

Neste momento as papas de hemácia estavam prontas para posterior descongelamento e análise das enzimas superóxido dismutase, glutathione reductase e glutathione peroxidase no prazo máximo de 30 dias, segundo recomendação dos respectivos fabricantes dos kits de análise.

Para análise de catalase antes do congelamento retirou-se $200\mu\text{L}$ da papa de hemácias para ser adicionado a $1,8\text{ml}$ de mercaptoetanol, essa solução foi homogeneizada e congelada a -20°C . Assim que a solução congelou, foi retirada do freezer para descongelar em temperatura ambiente e então foi centrifugada a 1831G por 40 minutos. Em seguida a solução foi aliquoteada em tubos âmbar para congelamento a -80°C .

4.2.2 Métodos analíticos

O metabolismo oxidativo e eritrograma foram avaliados pela análise de enzimas e de produtos da oxidação; as variáveis, o método e o código do kit para analisador bioquímico automático estão relacionados a seguir.

A contagem de células vermelhas foi realizada no sangue total em analisador hematológico automático marca ABX, modelo ABC Vet.

O ácido úrico sérico foi mensurado por analisador bioquímico automático modelo Daytona, marca RANDOX, com kit UA3824 da mesma marca.

O estado antioxidante total, ou Total Antioxidant Status (TAS) em inglês, sérico foi mensurado por analisador bioquímico automático modelo Daytona, marca RANDOX, com kit NX2332 da mesma marca.

O índice de peroxidação lipídica foi determinado manualmente pelo método colorimétrico do ácido tiobarbitúrico, descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990).

O método foi realizado utilizando-se um tubo "branco", três tubos "padrão", com diferentes valores e em duplicata e cada amostra também foi analisada em duplicata. Cada tubo recebeu primeiramente 1000µL de solução de ácido tricloroacético e 500µL de água no tubo branco, padrões ou amostra de soro nos seus respectivos tubos. Todos os tubos foram homogeneizados no agitador automático e em seguida centrifugados a 1448G por 15 minutos. Em tubos maiores foi adicionado 750 µL de ácido tiobarbitúrio 1% (TBA). Então 750 µL do sobrenadante de cada um dos tubos centrifugados foi passado para o tubo maior que já continha TBA. Todos os tubos foram novamente homogeneizados em agitador automático e encubados em água fervente por exatos 10 minutos. Imediatamente ao final da incubação os tubos foram depositados em recipiente contendo água fria e gelo, para que a reação estagnasse. Após resfriamento de 20 minutos procedeu-se a leitura em espectrofotômetro digital, marca CELM[®] - modelo E225D, com comprimento de onda de 532 nm. O aparelho foi calibrado com água destilada, em seguida procedeu-se a leitura de todos os tubos em sequência.

Os resultados foram analisados matematicamente, de forma que em primeiro lugar se fez a regressão linear com as leituras de absorbância do branco e dos padrões, para que, em seguida se obtivesse a equação de reta. A média das leituras de cada amostra, em duplicata, foi substituída no valor de "x" na equação. O resultado deste cálculo foi o valor final do teor de MDA naquela amostra.

A atividade da glutatona reduzida foi determinada por método colorimétrico, descrito por Beutler; Duron; Kelly (1963). O método foi realizado utilizando-se um tubo "branco", três tubos "padrão" com diferentes valores, em duplicata e dois tubos para cada amostra, analisadas também em duplicata. Cada tubo recebeu primeiramente 1800µL de água purificada e 200µL de água no tubo branco, soluções padrão ou amostra nos seus respectivos tubos, em seguida foi adicionado 3000µL de solução precipitante em todos os tubos. Após descanso de 5 minutos os tubos foram homogeneizados no agitador automático e em seguida centrifugados a 1448G por 5 minutos. Em tubos menores foram adicionados 800µL de solução fosfato (SFosf); então, 200µL do sobrenadante de cada um dos tubos centrifugados foi passado para o tubo menor que já continha SFosf. Todos os tubos foram novamente homogeneizados em agitador automático. Adicionou-se 100 µL de solução de nitrofenil-disulfato (DTNB) em cada tubo e leu-se no espectrofotômetro em até 60s. A leitura foi feita em espectrofotômetro digital, marca Celm[®] - modelo E225D, com comprimento de onda de

412nm. O aparelho foi calibrado com água destilada, em seguida procedeu-se a leitura de todos os tubos em sequencia. Os resultados foram analisados matematicamente, de forma que em primeiro lugar se fez a regressão linear com as leituras de absorbância do branco e dos padrões para que, em seguida, se obtivesse a equação de reta. A média das leituras de cada amostra, em duplicata, foi substituída no valor de “x” da equação. O resultado deste cálculo foi o valor final do teor de GSH.

A habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) foi determinada pelo método colorimétrico, descrito por Benzie; Strain, (1996), em que descreve que a HRFP, em baixo pH, reduz o complexo tripiridiltiazina férrica (Fe^{+3} – TPTZ) à forma ferrosa (Fe^{+2}), apresentando um azul intenso, com possibilidade de leitura em absorbância de 593nm.

Para a realização desta análise as amostras de plasma, coletadas com anticoagulante EDTA, podem estar estocadas a -70°C por período máximo de 2 meses. Toda vidraria utilizada para preparo dos reagentes e diluição das amostras foi descontaminada em ácido nítrico a 30%, por pelo menos 24 horas. Então toda vidraria foi seca em estufa e posteriormente embalada e armazenada até o momento da utilização.

A análise teve início pela determinação da curva padrão. Foram utilizados seis concentrações-padrão: 200 μM , 400 μM , 600 μM , 800 μM e 1000 μM . Cada padrão foi analisado em duplicata, de forma que em 10 tubos foram adicionados 1,5mL de solução HRFP e 150 μL de água purificada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro digital, marca CELM[®] - modelo E225D, sensibilidade 1, função A e comprimento de onda de 593nm. Para calibrar o aparelho foi utilizada água purificada e a leitura “branco” foi feita com a solução HRFP após incubação por 3 minutos.

Para a determinação dos padrões, foram adicionados 50 μL do primeiro padrão em um dos tubos preparados e imediatamente incubado em banho-maria a 37°C por 3 minutos. Repetiu-se essa operação para a duplicata do mesmo padrão e continuou-se assim para todos os padrões. Para garantir o bom andamento e dinâmica da preparação das amostras, cada tubo foi completado com o padrão com intervalo de 30 segundos, para permitir a leitura em tempo adequado. Tendo as leituras dos padrões em mão, utilizou-se a média de cada duplicata para calcular a regressão linear. A fórmula desta reta foi usada para calcular o valor de HRFP das amostras.

Para a análise das amostras em cada tubo, em duplicata, adicionou-se 150 μL de solução HRFP e 50 μL da amostra, seguindo os mesmos passos descritos para as soluções padrão.

O cálculo dos valores de HRFP para as amostras foi realizado pelo uso de regressão linear com as leituras de absorbância do branco e dos padrões, para que, em seguida se obtivesse a equação de reta. A média das leituras de cada amostra, em duplicata, foi substituída no valor de “x” na equação.

A atividade da enzima SOD foi determinada, na papa de hemácias, utilizando-se o método descrito por Wooliams et al., (1983), antes de se completarem 30 dias de armazenagem das amostras. No dia da análise, enquanto as amostras descongelavam, o material de análise era preparado. Um microtubo âmbar para cada amostra foi preenchido com 400µL de água purificada gelada. Também foi preparada a diluição com solução tampão de fosfato (STF), em tubos de vidro, de forma que a amostra final estivesse diluída 200 vezes. Neste caso, a diluição foi feita em duas etapas, um tubo com 900µL de STF e outro com 950µL de STF.

Quando as papas já estavam descongeladas, foram homogeneizadas, dentro do próprio microtubo, em agitador automático e em seguida, centrifugado a 16060G por 3min. Foram adicionados 400µL de papa aos 400 µL de água fria já preparada no novo microtubo. A solução foi então homogeneizada em agitador e incubada por 10min em geladeira, a 5°C. Então se seguiu com nova homogeneização e nova centrifugação, nas mesmas condições da anterior. Uma alíquota de 100µL da papa diluída em água foi passada para o tubo contendo 900µL de STF, depois de homogeneizado, 50µL desta solução foi passada ao tubo contendo 950µL de STF. Esta solução final foi analisada em analisador bioquímico automático modelo Daytona, marca RANDOX, com kit SD125 da mesma marca.

Para a obtenção do resultado final foi necessário analisar a concentração de hemoglobina contida em cada amostra de papa de hemácias. Para tanto utilizamos o Líquido de Drabkin marca Labtest, código 43. A reação foi feita com 2,5mL do reagente e 10µL de papa de hemácias, em sua primeira diluição, em duplicata. Após a homogeneização e descanso de 10 minutos, a leitura foi feita em analisador bioquímico semi-automático, modelo Bio200 da marca Bioplus.

Para a obtenção do valor real de atividade de SOD, o cálculo foi feito utilizando o valor de leitura de SOD, multiplicado pela diluição das amostras e a média de leitura da hemoglobina:

$$\text{SOD (U/g He)} = \frac{\text{Atividade SOD x 200 (diluição)}}{\text{média da concentração da hemoglobina}}$$

A atividade da GPx foi determinada, na papa de hemácias, utilizando-se o método descrito por Anderson, Berret e Patterson (1978), antes de se completarem 30 dias da coleta dessas amostras. O tipo e processamento das amostras utilizadas e os procedimentos para seu preparo são os mesmos utilizados e já descritos para a SOD. A diferença está na solução tampão utilizada na diluição, neste caso foi utilizada solução tampão EDTA/fosfato contida no kit, utilizando-se a mesma diluição feita para SOD. A leitura foi feita em analisador bioquímico automático modelo Daytona, marca RANDOX, com kit RS505 da mesma marca.

Da mesma forma que a SOD, para a obtenção do resultado final é necessário analisar a hemoglobina contida em cada amostra de papa de hemácias. Esse procedimento foi realizado da mesma forma que na análise de SOD.

A atividade da GR foi determinada, na papa de hemácias, utilizando-se o método descrito por Spooner, Delides e Goldberg (1976), antes de se completarem 30 dias da coleta dessas amostras. As papas já descongeladas foram homogeneizadas em agitador automático, dentro do próprio microtubo e em seguida foram centrifugadas a 16060 g por 3min. Foram adicionados 400µL de papa aos 400 µL de água fria já colocada em outro microtubo, a solução foi homogenizada em agitador e encubada por 10min em geladeira, a 4°C. Em seguida foram adicionados 50µL desta papa diluída 200µL de solução salina 0,9%. A leitura foi feita em analisador bioquímico automático marca RANDOX, com kit GR2368 da mesma marca.

Esta variável também requer a correção pelo teor de hemoglobina, que foi como descrito acima. O cálculo final também foi feito usando a seguinte fórmula:

$$\text{GR (U/ g He)} = \frac{\text{atividade GR x 5 (diluição)}}{\text{média da concentração de hemoglobina}}$$

A análise da catalase foi feita pela metodologia colorimétrica dinâmica descrita por Aebi (1984). Para tanto, foi utilizada papa de hemácias previamente congelada com mercaptoetanol, antes de completarem 30 dias de armazenamento. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, a primeira diluição foi feita em tubos de vidro, com 2,9mL de água ultra-purificada e 100µL de papa de hemácia. A leitura foi feita em cubetas de quartzo de 1,5mL (Z600296, Sigma). No momento da análise, adicionou-se 1mL de uma mistura de solução de H₂O₂/TRIS-HCl /EDTA na cubeta e 20µL de amostra. A leitura foi feita de forma dinâmica no espectrofotômetro modelo Cary 50, da marca Varian, da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, no Laboratório de Alimentos e Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos.

4.2.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por “outliers” através do procedimento UNIVARIATE do programa. Os dados que não atenderam à premissa da normalidade dos resíduos foram submetidos à transformação logarítmica ou pela raiz quadrada. Os dados, transformados ou não, foram submetidos à análise de variância para delineamento em quadrado latino 5 x 5. O modelo contemplou, como causas de variação, o efeito de tratamento como efeito fixo e efeito de animal e de período como efeitos aleatórios. A separação dos efeitos de tratamento foi realizada pelo teste de Tukey. Para todos os testes avaliados considerou-se o nível de significância de 5%

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Equinos podem ser alimentados, sem risco de distúrbios digestivos, com dietas contendo até 30% de energia digestível em gordura, a adição de óleo é um excelente meio de aumentar a energia da dieta sem aumentar o volume de alimento consumido (HARKING et al., 1992). Porém o consumo de dietas ricas em gordura aumenta a lipoperoxidação, com a formação de ERO e predispõe ao estresse oxidativo (IBRAHIM et al., 1997b). O perfil dos lipídios que compõem a dieta também influencia no organismo, pois as membras celulares são responsivas ao tipo de ácidos graxos da dieta, de forma que enquanto os AG saturados e MUFAs não alteram a membrana, os PUFAs são rapidamente incorporados à membrana citoplasmática, especialmente os ω -3 (HULBERT et al., 2005). Como moléculas com maior insaturação são mais predispostas à oxidação, essa composição pode aumentar a lipoperoxidação (SAPATA, 2008).

A partir da última década, muitos estudos foram publicados descrevendo o equilíbrio oxidativo em equinos relacionado à reprodução e esporte, porém poucos se dedicaram ao efeito de aditivos nutricionais sobre esse sistema (KIRSCHVINK; DE MOFFARTS; LEKEUX, 2008), portanto dados a respeito do efeito nutricional sobre esse sistema são escassos.

A análise do eritrograma, demonstrado na tabela 6, revelou menor contagem de eritrócitos e valor do volume globular (VG) para o tratamento com óleo de soja que para o controle com óleo mineral. Os AG PUFA são mais sensíveis à oxidação, de forma que a sua incorporação à membrana das hemácias as tornou mais suscetíveis. Todos os tratamentos com óleo tiveram valores numéricos menores que o controle, embora apenas a soja tenha apresentado efeito estatístico. O óleo de soja utilizado neste experimento foi de consumo humano comercial, enquanto os óleos de linhaça e peixe foram para uso industrial, então poderiam conter antioxidantes adicionais e o óleo de arroz continha vitamina E como antioxidante. Portanto, o tempo em que o frasco transparente do óleo de soja permanecia exposto à luz, pode ter oxidado parte de seu conteúdo de ω -3. A hemoglobina é normalmente oxidada nas hemácias durante o transporte de elétrons, esse processo é controlado pela metaemoglobina redutase, de forma que a hemoglobina pode ser considerada como um fator antioxidante (SMITH; KIEFER; LEE, 1972). O maior desafio oxidante do tratamento com óleo de soja se refletiu na hemoglobina, que foi menor para o óleo de soja que para o controle e a linhaça. É importante ressaltar que todos os valores permaneceram dentro do intervalo fisiológico para a espécie, de forma que o efeito sobre os eritrócitos, apesar de significativo, é pouco relevante metabolicamente para cavalos hígidos.

Tabela 6 – Valores de médias e desvios padrão do eritrograma de equinos alimentados com óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. - São Paulo - 2012

		MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	Média	7,06 ^A	6,30 ^B	6,85 ^{AB}	6,98 ^{AB}	6,90 ^{AB}	0,0346
	DP	0,51	0,85	0,97	0,81	0,32	
Hemoglobina (g/dL)	Média	11,16 ^A	9,98 ^B	10,94 ^{AB}	11,1 ^A	10,96 ^{AB}	0,0178
	DP	0,51	0,85	0,97	0,81	0,32	
Volume Globular (%)	Média	35 ^A	31 ^B	33 ^{AB}	34 ^{AB}	34 ^{AB}	0,0237
	DP	2,37	1,74	2,10	1,60	1,02	
VCM	Média	47,78	47,86	48,38	48,44	47,04	0,1961
	DP	4,70	5,04	5,29	5,21	1,96	
HCM (pg)	Média	15,86	16,06	16,14	16,04	15,84	0,5053
	DP	1,28	1,64	1,64	1,63	0,83	
CHCM (g/dL)	Média	33,26	33,62	33,46	33,36	33,50	0,8096
	DP	1,43	1,54	1,27	1,33	1,10	
RDW (%)	Média	18,54	18,58	18,60	18,46	18,98	0,9308
	DP	1,02	1,55	1,01	0,78	0,76	

Nota: HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: índice de anisocitose

Não obstante os efeitos dos tratamentos sobre as células sanguíneas, o desafio oxidante potencialmente gerado pela alimentação rica em gordura não foi suficiente para desequilibrar o sistema antioxidante dos animais, uma vez que nenhum dos marcadores do metabolismo oxidativo aqui considerados foi influenciado por qualquer um dos tratamentos utilizados (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de média e desvio padrão do estado antioxidante total sérico (TAS); habilidade de redução férrica plasmática (HRFP); das atividades eritrocitárias das enzimas glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase; dos teores séricos de malondialdeído (MDA) e ácido úrico de equinos mestiços alimentados com dietas contendo óleo mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. – São Paulo - 2012

		MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
GSH (mg/dL)	Média	36,93	33,41	37,72	35,80	36,73	0,5792
	DP	3,97	11,33	9,22	15,89	6,82	
GPx (UI/g de He)	Média	235,72	346,33	236,30	289,72	231,63	0,2814
	DP	115,86	318,13	27,76	132,27	41,82	
GR (UI/g de He)	Média	1,44	1,99	1,87	1,77	0,94	0,1557
	DP	0,62	0,51	1,22	0,64	0,40	
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Média	0,48	0,43	0,46	0,59	0,46	0,1904
	DP	0,23	0,17	0,17	0,34	0,20	
SOD (U/g de He)	Média	1778,87	1697,39	2008,99	2125,54	1990,89	0,2525
	DP	401,97	332,15	462,22	540,32	258,85	
TAS (mmol/L)	Média	1,09	1,06	1,06	1,06	1,13	0,6451
	DP	0,06	0,08	0,10	0,17	0,02	
FRAP ($\mu\text{mol/L}$)	Média	1795,27	1944,79	1858,95	1683,14	1838,19	0,7385
	DP	406,96	429,54	324,30	278,13	514,04	
Catalase (UI/mg)	Média	4,37	5,40	5,11	5,54	5,42	0,6231
	DP	1,78	2,30	1,22	1,42	1,81	
Ácido Úrico ($\mu\text{mol/L}$)	Média	9,57	11,46	11,04	8,77	9,21	0,3831
	DP	3,24	3,09	2,86	1,36	4,20	

Além do regime alimentar, as variáveis oxidativas de equinos podem sofrer influência do gênero, idade e temperatura ambiente (KIRSCHVINK et al., 2006a; GEORGIEVA; BARZEV, 2011). O presente estudo foi realizado com animais do mesmo gênero e com idades próximas, durou cerca de cinco meses, em clima tropical variando do verão ao outono, ainda assim os valores encontrados estiveram dentro dos parâmetros encontrados na literatura (KIRSCHVINK et al., 2006b; KIRSCHVINK; DE MOFFARTS; LEKEUX, 2008; GEORGIEVA; BARZEV, 2011; KANG et al., 2012). Os tratamentos com óleo não influenciaram as enzimas e produtos do metabolismo oxidativo analisados neste estudo, apenas a hemoglobina, que se mostrou um parâmetro mais sensível. De forma que a nutrição de equinos com esta quantidade de óleo não aumentou o desafio oxidante aos animais.

4.4 CONCLUSÃO

Dietas de manutenção constituídas por 5% de óleo da MS não oferecem risco oxidativo a equinos hípidos.

A hemoglobina é um parâmetro sensível do metabolismo oxidativo para equinos alimentados com 5% da matéria seca com óleo ou de soja, ou de arroz, ou de linhaça, ou de peixe ou ainda mineral

Eritrócitos equinos foram responsivos ao aumento de gordura na dieta, porém de maneira branda e sem alterar a higidez do animal.

5 EFEITO DA ALIMENTAÇÃO COM ÓLEO MINERAL, DE SOJA, ARROZ, LINHAÇA OU PEIXE SOBRE A IMUNIDADE INATA DE EQUINOS

5.1 INTRODUÇÃO

A utilização de óleo na nutrição de equinos, como fonte de energia, pode alterar o perfil de lipídios das membranas celulares segundo o perfil contido do óleo utilizado, especialmente óleos ricos em PUFA's (WASSALL; STILLWELL, 2009). As características físicas e químicas das membranas celulares são determinadas pela sua composição lipídica mudanças neste perfil podem resultar em alterações de suas funções imunológicas (WASSALL; STILLWELL, 2009).

A imunidade mediada por células ocorre em duas etapas, a fagocitose do agente infeccioso e a produção de substâncias tóxicas, EROs, no “burst” respiratório que irão eliminá-lo. Porém, essas substâncias podem ser citotóxicas, em processos prolongados e, por isso, representam parte importante da morte celular e dos danos teciduais (PARK et al., 2007) resultantes deste processo. Assim, a modulação deste sistema tem se tornado um foco de atenção importante de pesquisadores em doenças crônicas (ALDRIDGE et al., 2008).

Pesquisas com células de humanos suplementados com PUFA's, utilizando o agente *Rhodococcus equi* como desafio in vitro relataram que há correlação positiva entre o teor de instauração dos PUFA's e função de fagocitose das células imunológicas e também aumento na produção de EROs (SCHUMANN, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da alimentação com diferentes fontes lipídicas sobre as funções de fagocitose e produção de EROs, por burts-respiratório, de células polimorfonucleares de equinos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco equinos mestiços, machos e castrados, com média de idade de 5,8 anos ($\pm 0,6$); peso vivo inicial médio de 357,1kg ($\pm 11,5$), que ficaram alojados nas

dependências do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em baias individuais providas de cocho e bebedouro.

As 5 dietas experimentais diferiam pela fonte lipídica utilizada, que era óleo mineral, de soja, de linhaça, de peixe ou ainda óleo de arroz. O cálculo da dieta foi feito com base na exigência para manutenção do NRC de equinos (1989). A energia foi calculada com base na matéria seca (MS) do alimento e peso vivo (PV) dos animais. Os óleos perfaziam 5% do requerimento total de MS e entrava substituindo o concentrado. O perfil de ácidos graxos de cadeia longa de todos os óleos (tabela 2) foi determinado no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As dietas foram compostas de feno de ótima qualidade e concentrado comercial, indicado para equinos em regime de manutenção, acrescidos da fonte lipídica. Esses alimentos foram oferecidos em duas refeições diárias.

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino cinco por cinco, os cinco cavalos passaram pelos cinco tratamentos. Cada período experimental foi composto por três semanas, duas de adaptação ao óleo e a terceira para coleta de dados. As amostras de sangue foram coletadas sempre pela manhã, com os animais em jejum. As amostras de sangue com anticoagulante heparina lítica foram homogeneizadas, prontamente refrigeradas e conduzidas ao laboratório para processamento.

A metodologia utilizada para analisar o “burst” respiratório destes animais foi a descrita por Hasui (1989) e realizada no laboratório de Imunologia do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP. Para tanto, foram identificados seis tubos de citometria de fluxo, marca BD com filtro (código 352235), com letras de A a F, para cada amostra coletada. Cada tubo recebeu soluções de natureza e proporções diferentes, para a realização dos desafios *in vitro* do Burst respiratório. Os reagentes marcadores utilizados foram:

- LPS: Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (Sigma Aldrich®, código L6529). Usado como estímulo ao leucócitos para produção de EROs.
- PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol, em inglês Phorbol 12-Myristate 13-acetate (Sigma Aldrich®, código P8136). Usado também como estímulo aos leucócitos produzirem EROs.
- DCFH: Diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína (Sigma Aldrich®, código D6883). Foi usado como reagente fluorescente, para detecção da produção de EROs, ele emite luz verde em resposta à produção celular de EROs.
- Sa-PI: Trata-se da bactéria *Staphylococcus aureus* conjugada com iodeto de propídio (Sigma Aldrich®, código P3566). Usada como estímulo aos leucócitos a fagocitose. Ao fagocitarem a bactéria marcada emite a fluorescência vermelha detectada pelo citômetro.

O volume final de todos os tubos foi de 1 mL, e em todos a primeira substância adicionada foi o PBS seguido do sangue. O volume de sangue adicionado foi igual para todos, 100µL. O volume utilizado em cada tubo de PBS e dos demais reagentes marcadores foram descritos a seguir, na ordem em que foram adicionados:

- No tubo A foi adicionado 900µL de PBS e 100µL sangue
- No tubo B foi adicionado 700µL de PBS, 100µL de sangue e 200 µL de DCFH
- No tubo C foi adicionado 800µL de PBS, 100µL de sangue e 100 µL de SaPI
- No tubo D foi adicionado 600µL de PBS, 100µL de sangue, 200µL de DCFH e 100µL de SaPI
- No tubo E foi adicionado 600µL de PBS, 100µL de sangue, 200µL de DCFH e 100µL de LPS
- No tubo F foi adicionado 600µL de PBS, 100µL de sangue, 200µL de DCFH e 100µL de PMA.

Uma vez que todos os 6 tubos de cada uma das 5 amostras coletadas estavam completos, estes foram incubados em banho-maria, sob agitação, a 37°C, por 20 minutos. Neste tempo ocorria a reação entre os leucócitos e os reagentes adicionados. Ao final da incubação, adicionava-se 2mL de solução EDTA 3mM gelada, para interromper a reação. Todos os tubos foram então centrifugados em centrífuga refrigerada a 1855G por 10 minutos. Ao final da centrifugação formava-se um botão celular no fundo dos tubos, toda a solução foi desprezada virando os tubos para baixo de uma vez em movimento rápido, sem manipular o botão nem sacudir o tubo. Uma vez em posição ortogonal e sem solução, o botão celular foi desprendido com agitação manual. Então foi feita lise hipotônica das hemácias. Primeiro adicionava-se 2mL de solução NaCl a 0,2%, após 20 segundos adicionava-se 2mL de solução de NaCl a 1,6%. Com essa nova solução, os tubos foram centrifugados novamente, da maneira já descrita e ao final da centrifugação a solução foi desprezada. Esse processo de lise foi repetido mais duas vezes. Após a última centrifugação, a solução foi desprezada e o botão ressuspenso em 1mL de PBS. Neste momento, as amostras estavam prontas para serem lidas no aparelho de citometria de fluxo, (citômetro).

No citômetro, FACSCalibur® (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Diego, CA), as células foram identificadas como granulócitos segundo suas características de tamanho, referida no equipamento como FSC; e granulocidade, referida como SSC. O tubo A, sem estímulo ou marcador algum foi utilizado para calibrar o aparelho. Todos os dados de leitura foram gravados para serem analisados no programa FlowJo®, versão 7.1.3 (Three

Star[®], INC., Ashland, OR). A fluorescência verde foi lida pelo detector FL1 e a fluorescência vermelha pelo detector FL2. Foram lidos 30.000 eventos, ou células, por leitura.

Neste programa foram geradas planilhas com os dados de leitura do burst respiratório, a produção de EROs foi interpretada pela intensidade de fluorescência detectada e expressada em média geométrica. Também foram geradas planilhas com dados de atividade de fagocitose da população celular, expressa em porcentagem e dados da intensidade da atividade de fagocitose, expressa em média geométrica.

5.2.1 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por “outliers” através do procedimento UNIVARIATE do programa. Os dados que não atenderam à premissa da normalidade dos resíduos foram submetidos à transformação logarítmica ou pela raiz quadrada. Os dados, transformados ou não, foram submetidos à análise de variância para delineamento em quadrado latino 5 x 5. O modelo contemplou, como causas de variação, o efeito de tratamento como efeito fixo e efeito de animal e de período como efeitos aleatórios. A separação dos efeitos de tratamento foi realizada pelo teste de Tukey. Para todos os testes avaliados considerou-se o nível de significância de 5%.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunidade celular depende de inúmeros fatores externos e internos ao animal, um fator importante na função imunológica é a dieta. As propriedades químicas e físicas das membranas são determinadas por sua composição lipídica e os AG dietéticos, principalmente os PUFAs, exercem grande impacto na composição lipídica das membranas (WASSALL; STILLWELL, 2009).

A imunidade inata não tem memória, ou seja, não é influenciada por uma exposição primária ao agente infeccioso, seu sistema de células fagocíticas são a primeira linha de

defesa, ligando-se e fagocitando os agentes para em seguida destruí-los com substâncias tóxicas, como radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (CALDER, 2007). A alteração no perfil de AG da membrana celular também foi associada a alteração da capacidade de fagocitose, porém os resultados de estudos com suplementação de ω -3 dietético em humanos e ratos ainda são controversos (CALDER, 2007).

No presente estudo, o tratamento com maior quantidade de gordura insaturada foi o de linhaça, seguido pelos óleos de soja, de peixe e de arroz, demonstrado na Tabela 2. Da mesma forma o óleo de linhaça apresentou a maior quantidade de PUFA, e determinou maior teor de ácido linolênico ω -3 no plasma ($p = 0,0001$), como demonstrado na Tabela 5. A avaliação da fagocitose *in vitro* segundo os parâmetros de porcentagem de células fagocitando Sa-PI e a intensidade desta atividade não revelou diferenças entre os tratamentos, como demonstrado na tabela 8. Nota-se que a variação de células fagocitando e a intensidade de fagocitose não se assemelham, indicando que o aumento de células fagocitando não significa, necessariamente, que a magnitude deste processo também está aumentada.

A fagocitose está negativamente relacionada com a proporção AGS (ácidos graxos saturados):PUFA e positivamente com PUFA total alto, e altos teores de ω -3 e ω -6 nas membranas celulares de células imunológicas (KEW et al., 2003). No presente estudo não foi possível identificar diferenças na intensidade de fagocitose entre os tratamentos devido ao desvio padrão, talvez esse efeito pudesse ser percebido com um número maior de observações.

Tabela 8 – Avaliação da fagocitose de granulócitos de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça e peixe, analisado por citometria de fluxo. Quantidade de células (%) e Intensidade de fagocitose, em valores arbitrários. – São Paulo - 2012

		MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
Porcentagem de células fagocitando Sa-PI	Média	75,41	82,90	86,19	84,68	85,98	0,7828
	DP	25,37	26,64	16,57	17,72	18,63	
Intensidade de Fagocitose Sa-PI	Média	151,24	209,28	164,56	144,28	173,96	0,1284
	DP	73,88	82,87	81,84	49,60	67,62	

A avaliação da produção intracelular de EROs por citometria de fluxo frente aos três estímulos está demonstrada segundo a quantidade de células fagocitando, na tabela 9, e segundo a intensidade deste processo, na Tabela 10.

Tabela 9 – Valores de médias e desvios padrão de granulócitos (%) produzindo ERO, *in vitro*, de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. Valores basais e frente a estímulos Sa-PI, LPS e PMA, analisados por citometria de fluxo. - São Paulo - 2012

		MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
Basal	Média	374,58	297,90	295,08	245,82	313,13	0,4969
	DP	235,14	145,61	139,20	121,33	181,54	
Estímulo Sa-PI	Média	1399,36^A	1353,68^{AB}	1238,16^{AB}	822,25^B	1310,60^{AB}	0,0418
	DP	989,26	702,16	669,30	356,24	796,65	
Estímulo LPS	Média	318,82	309,47	310,00	273,43	268,87	0,5225
	DP	70,61	204,88	145,63	137,83	130,36	
Estímulo PMA	Média	3940,24	3437,98	3744,24	3578,86	3647,31	0,9268
	DP	2200,34	2321,04	1999,30	2634,85	2604,71	

Tabela 10 – Valores de médias e desvios padrão da intensidade de produção de ERO por granulócitos, *in vitro*, de equinos alimentados com óleos mineral, de soja, arroz, linhaça ou peixe. Valores basais e frente a estímulos Sa-PI, LPS e PMA, analisados por citometria de fluxo. - São Paulo - 2012

		MINERAL	SOJA	ARROZ	LINHAÇA	PEIXE	p
Basal	Média	98,97	98,65	98,61	97,90	98,08	0,1229
	DP	0,42	0,87	0,41	0,92	1,28	
Estímulo Sa-PI	Média	98,65	98,04	97,75	97,90	98,33	0,4997
	DP	0,76	1,56	1,35	0,98	0,59	
Estímulo LPS	Média	98,64	97,73	98,39	98,14	98,47	0,7678
	DP	1,28	2,76	0,74	0,86	1,02	
Estímulo PMA	Média	99,25	99,05	97,97	98,57	98,94	0,4856

Não houve efeito do tratamento na quantidade de células produzindo EROs frente a qualquer estímulo. Já a intensidade de produção de EROs foi menor para o óleo de linhaça em relação ao controle, não havendo diferenças entre os outros tratamentos. Provavelmente não foi possível identificar efeito dos tratamentos de soja, arroz e peixe devido aos desvios padrão elevados, pois os teores são visivelmente mais próximos do mineral que da linhaça.

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidos durante o burst respiratório são importantes para a eliminação de patógenos no interior dos macrófagos, porém esses radicais também tem efeitos citotóxicos (POUROVA et al., 2010). Em particular durante inflamações crônicas, morte celular e lesões celulares são atribuídas, pelo menos em parte, à superprodução de EROs (AMBROZOVA; PEKAROVA; LOJEK, 2010). Neste sentido, a modulação do “burst” respiratório por meio da dieta vem sendo o foco de muitas pesquisas (ALDRIDGE et al., 2008; AMBROZOVA; PEKAROVA; LOJEK, 2010; ADOLPH et al., 2012). Os PUFA, que são facilmente introduzidos na dieta, já foram descritos influenciando o sistema imunológico, o que os torna potenciais agentes terapêuticos (SCHUMANN, 2013).

O enriquecimento de macrófagos com PUFAS ω -6 e ω -3 influencia a síntese de ERO destas células. O efeito da suplementação de PUFA no “burst” depende do nível de ativação dos macrófagos. A suplementação de PUFA, causou aumento significativo na produção de EROS em macrófagos não estimulados em relação a macrófagos não suplementados. Na mesma pesquisa, a suplementação reduziu a produção de EROS em macrófagos ativados, indicando o abrandamento da reação (ADOLPH et al., 2012). Os resultados aqui relatados comprovam esse efeito também em equinos, em que o tratamento com óleo de linhaça, rico em PUFA, modulou a intensidade de produção de EROS frente a estímulos, mesmo sem alterar a quantidade de células em “burst”-respiratório.

5.4 CONCLUSÃO

O óleo de linhaça, rico em PUFA, aumentou o teor plasmático de ácido linolênico (Omega 3) e tem efeito *in vitro* na produção de EROS por granulócitos de equinos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ADOLPH, S.; SCHOENIGER, A.; FUHRMANN, H.; SXHUMANN, J. Unsaturated fatty acids as modulators of macrophage respiratory burst in the immune response against *Rhodococcus equi* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n. 11-12, p. 2246–2253, 2012.
- ALDRIDGE, C.; RAZZAK, A.; BABCOCK, T. A.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J. Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production is decreased by an omega-3 fatty acid lipid emulsion. **The Journal of Surgical Research**, v. 149, n. 2, p. 296–302, 2008.
- AMBROZOVA, G.; PEKAROVA, M.; LOJEK, A. Effect of polyunsaturated fatty acids on the reactive oxygen and nitrogen species production by raw 264.7 macrophages. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 133–139, 2010.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “ antioxidant power ”: **The FRAP Assay**, v. 76, p. 70–76, 1996.
- BERGAMO, P.; LUONGO, D.; MAURANO, F.; MAZZARELLA, G.; STEFANILE, R.; ROSSI, M. Conjugated linoleic acid enhances glutathione synthesis and attenuates pathological signs in MRL/MpJ-Fas(lpr) mice. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 11, p. 2382–2391, 2006.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved methods for determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory Clinics Medicine**, v. 61, p. 882–888, 1963.
- CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 5-6, p. 327–335, 2007.
- CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation , and immunity. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 1007–1024, 2001.
- CICERO, A. F.; GADDI, A. Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 15, n. 4, p. 277–289, 2001.
- DE MOFFARTS, B.; PORTIER, K.; KIRSCHVINK, N.; COUDERT, J.; FELLMANN, N.; VAN ERCK, E.; LETELLIER, C.; MOTTA, C.; PINCEMAIL, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. **Veterinary Journal**, v. 174, p. 113–121, 2007.
- DITTRICH, J. R.; MELO, H. A.; AFONSO, A. M. C. F.; DITRICH, R. L. Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais Equine feeding behavior and its relation with forage use and animal welfare. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 130–137, 2010. Suplemento.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal Methods in Enzymology. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

FERRAZ, A. C.; DELATTRE, A. M.; ALMENDRA, R. G.; SONAGLI, M.; BORGES, C.; ARAUJO, P.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S.; LIMA, M. M. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 1, p. 116–122, 2011.

FRANK, N.; ANDREWS, F. M.; ELLIOTT, S. B.; LEW, J.; BOSTON, R. C. Effects of rice bran oil on plasma lipid concentrations, lipoprotein composition, and glucose dynamics in mares. **Journal Animal Science**, v. 83, n. 11, p. 2509–2518, 2005.

GEELEN, S. N.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; BEYNEN, A. C. Dietary fat supplementation and equine plasma lipid metabolism. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 30, p. 475–478, 1999.

GEORGIEVA, N.; BARZEV, G. Changes in blood antioxidant status of Hanoverian horses during four year seasons. **Trakia Journal of Sciences**, v. 9, n. 3, p. 39–44, 2011.

GILLHAM, S. B.; DODMAN, N. H.; SHUSTER, L.; KREAM, R.; RAND, W. The effect of diet on cribbing behavior and plasma β -endorphin in horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 41, n. 3/4, p. 147–153, 1994.

GOBESSO, A. A. O.; MOREIRA, A. M. F. O.; TAMAS, W. T.; RIBEIRO, R. A.; PREZOTTO, L. D.; GONZAGA, I. V. F.; ETCHICHURY, M.; BRANDI, R. A. Digestibilidade aparente e concentração plasmática de triglicérides e colesterol em equinos alimentados com fontes de óleo vegetal. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, p. 254–263, 2011.

HALL, J. A.; VAN SAUN, R. J.; TORNQUIST, S. J.; GRADIN, J. L.; PEARSON, E. G.; WANDER, R. C. Effect of type of dietary polyunsaturated fatty acid supplement (corn oil or fish oil) on immune responses in healthy horses. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 880–886, 2004.

HALL, J. A.; VAN SAUN, R. J.; WANDER, R. C. Dietary (n-3) fatty acids from menhaden fish oil alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis in healthy horses. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 871–879, 2004.

HALLEBEEK, J. M.; BEYNEN, A. C. A preliminary report on a fat-free diet formula for nasogastric enteral administration as treatment for hyperlipaemia in ponies. **The Veterinary Quarterly**, v. 23, n. 4, p. 201–205, 2001.

HARKING, J. D.; MORRIS, G. S.; TYLLEY, R. T.; NELSON, A. G.; KAMERLIN, S. G. Effect of added dietary fat on racing performance in thoroughbred horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 123–129, 1992.

HARRIS, P. A. T. A.; PAGAN, J. D.; CRANDELL, K. G.; DAVIDSON, N. Effect of feeding thoroughbred horses a high unsaturated or saturated vegetable oil supplemented diet for 6

months following a 10 month fat acclimation. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 30, p. 468–474, 1999.

HOFFMAN, R. M.; BOSTON, R. C.; STEFANOSKI, D.; KRONFELD, D. S.; HARRIS, P. A. Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 9, p. 2333–2342, 2003.

HOTHERSALL, B.; NICOL, C. Role of diet and feeding in normal and stereotypic behaviors in horses. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 25, n. 1, p. 167–181, 2009.

HULBERT, A. J.; TURNER, N.; STORLIEN, L. H.; ELSE, P. L. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 80, n. 1, p. 155–169, 2005.

IBRAHIM, W.; LEE, U. S.; YEH, C. C.; SZABO, J.; BRUCKNER, G.; CHOW, C. K. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver : effects of dietary lipid , vitamin e and iron^{1,2}. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 7, p. 1401–1406, 1997.

JANIAK, M.; SUSKA, M.; DUDZINSKA, W.; SKOTNICKA, E. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 2, p. 137–45, 2010.

JOHNSON, K. G.; SUSKA, M.; DUDZINSKA, W.; SKOTNICKA, E. Behavioural changes in stabled horses given nontherapeutic levels of virginiamycin. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 2, p. 139–143, 1998.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, n. 1-2, p. 146–154, 2005.

JULIEN, T. R.; POTTER, G. D.; GREENE, L. W.; STOTT, G. G. Adaptation to a fat-supplemented diet by cutting horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 15, n. 10, p. 436–440, 1995.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 259–285.

KANG, M. Y.; KIM, S. M.; RICO, C. W.; LEE, S. C. Hypolipidemic and antioxidative effects of rice bran and phytic acid in high fat-fed mice. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 123–128, 2012.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 38–44, 2005.

KEW, S.; BANERJEE, T.; MINIHANE, A. M.; FINNEGAN, Y. E.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood

mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25-72 y. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1278–1286, 2003.

KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; FARNIR, F.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breeds. **Equine Veterinary Journal. Supplement**, v. 36, n. 36, p. 239–244, 2006a.

KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **Veterinary Journal (London, England : 1997)**, v. 177, n. 2, p. 178–191, 2008.

LAIRES, M. J.; MADEIRA, F.; SÉRGIO, J.; COLAÇO, C.; VAZ, C.; FELISBERTO, G. M.; NETO, I.; BREITENFELD, L.; BICHO, M.; MANZO, C. Preliminary study of the relationship between plasma and erythrocyte magnesium variations and some circulating pro-oxidant and antioxidant indices in a standardized physical effort. **Magnesium Research: Official Organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium**, v. 6, n. 3, p. 233–238, 1993.

LERCH, K.; AMMER, D. Amino acid sequence of copper-zinc superoxide dismutase from horse liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 22, p. 11545–11551, 1981.

MARCHELLO, E. V.; MARCHELLO, I. A.; CUNEO, S. P. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 7, p. 453–458, 2000.

MARCHELLO, E. V.; SCHURG, W. A.; MARCHELLO, J. A.; CUNEO, S. P. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 7, p. 453–458, 2000.

MARQUEZE, A.; KESSLER, A. M.; BERNARDI, L. M. Aumento do nível de óleo em dietas isoenergéticas para cavalos submetidos a exercícios. **Ciencia Rural de Santa Maria**, v. 31, n. 3, p. 491–496, 2001.

MARTINS, C. A.; ALMEIDA, V. V. de; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

MCGREEVY, P. D.; CRIPPS, P. J.; FRENCH, N. P.; GREEN, L. E.; NICOL, C. J. Management factors associated with stereotypic and redirected behaviour in the thoroughbred horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, n. 2, p. 86–91, 1995.

MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTO, E.; JULLIAND, V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 10, p. 2600–2609, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. [S. l.]: W. H. Freeman, 2005. 1100 p. (Lehninger principles of biochemistry).

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of horses**. 5th rev. Washington DC: NRC, 1989. 112 p.

OLIVEIRA, R. N.; MARQUES JR., A. P.; XAVIER, P. R.; ALVES, G. E. S.; PAES, P. R. O.; GOBESSO, A. A. O. Avaliação hematológica e bioquímica de equinos suplementados com óleo de arroz semirrefinado, rico em gamaorizanol. **Arquivos Brasileiros de Medicina veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1043–1047, 2010.

PARK, J.-S.; LEE, E. J.; LEE, J. C.; KIM, W. K.; KIM, H. S. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 70–77, 2007.

POUROVA, J.; KOTTOVA, M.; VOPRSALOVA, M.; POUR, M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. **Acta Physiologica** (Oxford, England), v. 198, n. 1, p. 15–35, 2010.

RESENDE JÚNIOR, T.; RESENDE, A. S. C.; LACERDA JÚNIOR, O. V.; BRETAS, M.; LANA, A.; MOURA, R. S.; RESENDE, H. C. Efeito do nível de óleo de milho adicionado à dieta de eqüinos sobre a digestibilidade dos nutrientes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 69–73, 2004.

RIBEIRO, R. M.; PASTORI, W. T.; FAGUNDES, M. H. R.; PREZOTTO, L. D.; GOBESSO, A. A. O. Efeito da inclusão de diferentes fontes lipídicas e óleo mineral na dieta sobre a digestibilidade dos nutrientes e os níveis plasmáticos de gordura em equinos¹. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 10, p. 1989–1994, 2009.

SAPATA, K. B. **Efeitos da suplementação de ômega-3 e do exercício sobre parâmetros de estresse oxidativo e proteína c reativa em diabéticos tipo 2**. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

SCHUCHARDT, J. P.; HUSS, M.; STAUSS-GRABO, M.; HAHN, A. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. **European Journal of Pediatrics**, v. 169, n. 2, p. 149–64, 2010.

SCHUMANN, J. Modulation of macrophage response mechanisms against persistent pathogens by PUFA. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. [S.l]: Formatex Research Center, 2013. v. 3, p. 1799–1804. (Microbiology book series, 4).

SHAPIRO, H. Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct actions on the nervous system? **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 3, p. 219–224, 2003.

SMITH, J. E.; KIEFER, S.; LEE, M. Glutathione reduction and other enzyme activities in equine erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology of Biochemi**, v. 43, n. 2, p. 413–417, 1972.

SOFFLER, C. Oxidative stress. **The Veterinary clinics of North America. Equine Practice**, v. 23, n. 1, p. 135–157, 2007.

SPOONER, R. J.; DELIDES, A.; GOLDBERG, D. M. Anomalous behavior of glutathione reductase on dilution. **Clinical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 1005–1008, 1976.

SUN, L.; SHEN, W.; LIU, Z.; GUAN, S.; LIU, J.; DING, S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sciences**, v. 86, n. 1-2, p. 39–44, 2010.

SWIFT, L. L.; HILL, J. O.; PETERS, J. C.; GREENE, H. L. Plasma lipids and lipoproteins during 6d of maintenance feeding with long-chain medium-chain and mixed-chain triglycerides. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 5, p. 881–886, 1992.

TINKER, M. K.; WHITE, N. A.; LESSARD, P.; THATCHER, C. D.; PELZER, K. D.; DAVIS, B.; CARMEL, D. K. Prospective study of equine colic risk factors. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 6, p. 454–458, 1997.

VANSCHOONBEEK, K.; MAAT, M. P. M.; HEEMSKERK, W. M. Fish oil consumption and reduction of arterial disease. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 657–660, 2003.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VÁSQUEZ-GARZÓN, V. R.; ARELLANES-ROBLEDO, J.; GARCIA-ROMÁN, R.; APARICIO-RAUTISTA, D. I.; VILLA-TREVIÑO, S. Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. **Free Radical Research**, v. 43, n. 2, p. 128–37, 2009.

VIGUIE, C. A.; FREI, B.; SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N.; PACKER, L.; BROOKS, G. A. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. **Journal of Applied Physiology** (Bethesda, Md. : 1985), v. 75, n. 2, p. 566–572, 1993.

WASSALL, S. R.; STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 1, p. 24–32, 2009.

WATSON, T. D. G.; PACKARD, C. J.; SHEPHERD, J. Plasma lipid transport in the horse (*Equus caballus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 1, p. 27–34, 1993.

WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J.; WOOLFREY, B.; KRITCHEVSKY, D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 105–112, 2007.

WOOLLIAMS, J. A.; WIENER, G.; ANDERSON, P. H.; MCMURRAY, C. H. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of

copper in the blood in various breed crosses of sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 34, n. 3, p. 253–256, 1983.

XU, Z.; HUA, N.; GODBER, J. S. Antioxidant activity of tocopherols , tocotrienols , and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2 , 2 ' - azobis (2-methylpropionamidine). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 2077–2081, 2001.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 111–120, 2007.