

MÔNICA CRISTINA ZANDONÁ MELEIRO

**A influência do estresse experimentado por
cavalos de corrida, em determinados momentos
de sua rotina, sobre a função imune *in vitro***

SÃO PAULO

2006

MÔNICA CRISTINA ZANDONÁ MELEIRO

A influência do estresse experimentado por cavalos de corrida, em determinados momentos de sua rotina, sobre a função imune *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada

São Paulo

2006

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.1721
FMVZ

Zandoná Meleiro, Mônica Cristina

A influência do estresse experimentado por cavalos de corrida, em determinados momentos de sua rotina, sobre a função imune *in vitro* / Mônica Cristina Zandoná Meleiro. – São Paulo: M. C. Zandoná Meleiro, 2006.

108 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada.

1. Função imune. 2. Cortisol. 3. Exercício de alta intensidade. 4. Estresse. 5. Cavalos de corrida. I. Título.

Folha
12

Parágrafo
2

ERRATA
Linha
18

Onde se Lê
were

Leia-se
weren't



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

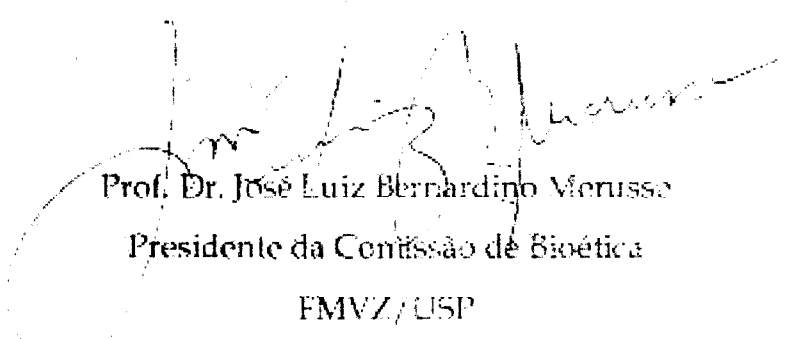
PARECER

Interessado: Mônica Cristina Zandoná Meleiro

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto já executado e protocolado sob o número 860/2006, intitulado: “Efeitos de exercício de diferentes intensidades sobre a função imune *in vitro* de cavalos de corrida”, no qual foram utilizados 30 (trinta) cavalos, sob responsabilidade da Profa. Dra. Irvênia Luiza de Santis Prada, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 22 de março de 2006



Prof. Dr. José Luiz Bernardino Verusse
Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome da autora: ZANDONÁ MELEIRO, Mônica Cristina

Título: A influência do estresse experimentado por cavalos de corrida, em determinados momentos de sua rotina, sobre a função imune *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo, ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Irvênia Luiza de Santis
Prada
Assinatura: _____ Instituição: VCI FMVZ-USP
Julgamento: _____

Prof. Dr. José Roberto Kfourir
Júnior
Assinatura: _____ Instituição: VCI FMVZ-USP
Julgamento: _____

Prof. Dr. Pedro Primo
Bombonato
Assinatura: _____ Instituição: VCI FMVZ-USP
Julgamento: _____

Prof. Dr. Cristina de Oliveira
Massoco Salles Gomes
Assinatura: _____ Instituição: U. Anhembi Morumbi
Julgamento: _____

Prof. Dr. Adele Caterino de
Araújo
Assinatura: _____ Instituição: Instituto Adolfo Lutz
Julgamento: _____

Dedico esta tese

Aos meus avós, Zélia (in memorian), Ricieri (in memorian), Zelinda e Antônio (in memorian), pela sorte da convivência, pelo carinho e aconchego,

Aos meus pais Elisabet e Osvaldo, pelo amor, pelo cuidado, pelo exemplo, pela educação e confiança,

Aos meus irmãos Ricieri e César, pela eterna proteção, pelo carinho e pelo respeito,

Aos meus padrinhos Cleide e Roque (in memorian) e ao meu primo Alessandro, pelo incentivo, pelo afeto e preocupação,

Ao Júlio, pelo amor, pela amizade, pelo respeito e pela compreensão, que aprendemos a cultivar em todos esses anos.

E aos belos e pacientes cavalos...

Azul da Guanabara, Belo da Guanabara, Bigorriho, Condesir, Double Cash, Ecstasy, El Beazon, Emdiadesol, Empire of Sun, Encanto de Birigui, Espoleta, Eternidade, Expertise, Face Lifting, Fantástico Carter, Fanzoca, Federada, Forewell to Arms, Fruit De La Passion, Galanteador, Genthry, Gigi da Guanabara, Guardrail, Hot Willie, Imigrante Latino, Infinito Desejo, Intenta, Internética, Isola Di Capri, Jagunço, Juma da Guanabara, Ketter, King Wish, Leme da Guanabara, Lucky Dance, Luna da Guanabara, Mac Bright, Mimo da Guanabara, Navegantes, Necka, Noctúcio, Oportunitas, Pan Comido, Pegador, Peri da Guanabara, Pericoloso, Piaggia, Pontocom, Popó da Guanabara, Quimilagrosa, Raloocá, Russianballet, Tequila Anis, Textura, Tupi da Guanabara, Ubatã Faighter, Velásquez e Xambuia.

AGRADECIMENTOS

Esta tese não teria sido possível sem a ajuda de um grande número de pessoas e espero conseguir traduzir minha gratidão a todos que tiveram participação na sua realização, de forma direta ou não.

Devo muito às instituições Universidade de São Paulo e Jockey Club de São Paulo que me forneceram condições e apoio indispensáveis para a execução deste trabalho.

*Agradeço à Prof^a. Dra. **Irvênia Luiza de Santis Prada**, pela orientação, pela confiança, pela paciência e por ter me dado a oportunidade de dividir momentos difíceis com uma pessoa tão querida e admirada pela sua postura pessoal e profissional, desde a minha graduação. Agradeço por permitir-me escolher trabalhar com a espécie equina, que sempre me despertou um grande interesse, e por apresentar-me às pessoas certas, no momento certo, contatos imprescindíveis que simplificaram muito o meu percurso.*

*Ao Dr. **Thiago Luiz Salles Gomes** pela proposta do trabalho, pelo crédito e pelas pertinentes perguntas e sugestões, que direcionaram o processo de confecção do trabalho escrito. Agradeço também sua compreensão nos momentos em que a Cris esteve ausente, enquanto me orientava no laboratório.*

*À Dra. **Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes** pelas inúmeras sugestões, pela paciência, pela co-orientação, por seu incansável interesse, por estar sempre disposta a compartilhar conhecimento, experiência, tempo e, como se isto não bastasse, material de laboratório. Agradeço, ainda, por ter sido a maior incentivadora para concretização deste trabalho e por efetuar o providencial contato com o Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Obrigada pela amizade, pelo carinho e por entender meu “priming”.*

*Ao Dr. **André Anzanello T. A. Carrascoza**, pelas sugestões no planejamento do projeto, pelo contato com os proprietários, os treinadores, os gerentes, os tratadores, bem como outros colegas médicos veterinários, e, mais ainda, por tornar muito fácil para mim o convívio com todas estas pessoas. Agradeço a confiança e a permissão de utilizar os cavalos que se encontravam sob sua responsabilidade. Obrigada, ainda, por dedicar seu tempo, sua paciência e por fornecer todas as informações necessárias a respeito dos animais.*

À **Dra. Maria Lourdes dos Santos**, coordenadora da Divisão de Assistência Veterinária do JCSP pela receptividade e credibilidade no trabalho. A convivência com sua equipe tornou a espera entre os páreos bastante agradável e divertida.

Ao **Dr. Regis Pio Monteiro da Silva**, chefe do setor de coleta de material biológico do Departamento de Controle e Pesquisa Antidopagem pelo acesso ao material dos cavalos encaminhados ao anti-dopping, e, principalmente, pela paciência e confiança.

À **Prof^a. Dra. Maria Angélica Miglino** pela oportunidade e pela dedicação na condução do Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, do VCI.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior** pelo crédito, pela forma acolhedora que recebe seus pós-graduandos, pelo respeito e pela complacência que teve diante dos meus horários e contratemplos, enquanto estive sob sua orientação.

Ao **Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato** pelas advertências, pela percepção criteriosa do texto e pelas sugestões que auxiliaram na confecção do trabalho escrito.

À **Prof^a. Dra. Paula de Carvalho Papa** pela amizade, pelos sábios conselhos de convivência, pela confiança e abertura que oferece aos seus pós-graduandos e que estendeu a mim, em momentos bastante oportunos.

Ao **Prof. Dr. Luís Carlos de Sá Rocha**, do VPT, pela credibilidade e por permitir a utilização do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia.

À **Dra. Adele Caterino de Araújo**, pela revisão do trabalho escrito, pelas sugestões, pela amizade e, principalmente, pelo entusiasmo que sempre transmitiu em relação à pesquisa científica e que continua a contagiar quem tem a sorte de conhecê-la.

Aos professores, colegas de pós-graduação e funcionários do VCI pelo agradável convívio e companheirismo.

Ao **Maicon Barbosa da Silva** e à **Jaqueline Martins de Santana** pela dedicação, pela constante atenção aos procedimentos burocráticos e pela forma afetuosa com que tratam os pós-graduandos do departamento.

À **Laura Artoni** pelo carinho, pelo apoio, pela amizade e confiança.

Alexandre Lourenço, César Augusto Dinola, e Jefferson Victor Russo pela convivência agradável e pela compreensão da priorização dada a este trabalho, quando se fez necessário.

À Monica Akemi Sato pela paciência, pelo convívio, pelo auxílio nas desafiantes aulas de bioquímica e pelas sugestões de estatística e inglês.

À Sandra Mayumi Nishi pela amizade, pela paciência e pelo apoio nos momentos de incerteza, além da ajuda imprescindível e prontidão nos cálculos estatísticos.

À Sandra Kitamura pelo convívio, pelas sugestões na apresentação dos resultados e pela execução da etapa final da análise estatística.

Aos pós-graduandos do VPT pela acolhida; em especial, Glaucie Jussilane Alves, Renato Couto de Moraes e Mônica Sakai pelo auxílio em importantes etapas e por me ensinarem valiosos “atalhos”.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT: Magali Caetano de Souza, Priscila Sales Correa e Ricardo Batista de Souza, que estiveram sempre presentes e tornaram o trabalho mais simples e descontraído.

À Priscila Viau Furtado, do Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP pela paciência e pela realização dos testes de dosagem da concentração sérica de cortisol.

A todos os funcionários do JCSP, em especial, aos enfermeiros Antônio de Carvalho, Francisco Soares Pereira, Josivaldo Macedo e Rogério Puig Prado, pelo convívio e respeito.

Aos proprietários, aos treinadores, aos gerentes e aos tratadores, pela confiança.

Às secretárias Cláudia Lima, Dayse Maria Alves Flexa, Joana Ferreira e Sandra Marceo do serviço de Pós-graduação e à bibliotecária Elza Maria Faquim da Biblioteca Virgínia Buff D'Apice da FMVZ-USP pela paciência, presteza e orientação dos procedimentos administrativos.

À seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, onde aprendi sobre a vida profissional, da perseverança diante da escassez de recursos e da ética necessária para que haja ciência.

*“Um quadro nunca é terminado – ele
simplesmente pára em lugares interessantes”*

Paul Gardner

RESUMO

ZANDONÁ MELEIRO, M. C. **A influência do estresse experimentado por cavalos de corrida, em determinados momentos de sua rotina, sobre a função imune *in vitro*.** [Influence of stress on *in vitro* immune function in *Thoroughbred* racehorses]. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Embora os cavalos apresentem características excepcionais frente a situações de estresse na natureza, foi considerada a possibilidade do cavalo de corrida ser submetido, por vezes, a alguma situação de estresse, que afetasse sua saúde e bem estar. Foram verificadas alterações do número e da função de populações celulares implicadas com a defesa, principalmente neutrófilos e linfócitos. Trinta cavalos de corrida da raça puro-sangue inglês, locados no Jockey Club de São Paulo, na cidade de São Paulo, foram utilizados. Os animais foram divididos em dois grupos e as amostras de sangue foram coletadas em momentos diferentes da rotina dos animais. No grupo I, foram coletadas amostras onze dias antes da corrida (-11d), imediatamente após a corrida (0d), um dia após a corrida (+1d), dois dias após a corrida (+2d) e três dias após a corrida (+3d). Enquanto, no grupo II as amostras foram coletadas oito dias antes da corrida (-8d), imediatamente após a corrida (0d), um dia após a corrida (+1d) e cinco dias após a corrida (+5d). Foram realizados ensaios de fagocitose e *burst* oxidativo dos neutrófilos, determinação de cortisol sérico, ensaios de apoptose, linfoproliferação e hemograma. A função de fagocitose, tanto em porcentagem, quanto em intensidade, mostrou-se diminuída nas amostras coletadas imediatamente após a corrida, nos dois grupos de animais. Os valores médios de *burst* oxidativo das amostras coletadas imediatamente após a corrida, dos animais do grupo I apresentaram-se diminuídos. Não foram encontradas diferenças

estatísticas significantes entre os resultados obtidos em relação às células apoptóticas, quando os diferentes momentos foram comparados; o mesmo ocorreu quando foi realizado o confronto dos valores do ensaio de linfoproliferação. Os valores médios dos níveis séricos de cortisol apresentaram-se aumentados no momento imediatamente após a corrida, em relação aos valores dos outros momentos, nos dois grupos de animais. Quanto aos dados de hemograma, houve aumento do número percentual de neutrófilos no momento imediatamente após a corrida quando foi realizada comparação com os demais momentos. Nos cavalos estudados, ainda que tenha sido encontrada uma diminuição transitória na função dos neutrófilos, a função adaptativa não chegou a ser acometida, que sugere que, embora se constitua em um exercício de alta intensidade, a fugacidade da corrida acabe por evitar danos maiores, em animais bem condicionados e adaptados a situações de estresse.

Palavras-chave: Função imune. Cortisol. Exercício de alta intensidade. Estresse. Cavalos de corrida.

ABSTRACT

ZANDONÁ MELEIRO, M. C. **Influence of stress on *in vitro* immune function in Thoroughbred racehorses.** [A influência do estresse experimentado por cavalos de corrida, em determinados momentos de sua rotina, sobre a função imune *in vitro*]. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Although horses can present exceptional responses during stress situations in nature, it was raised the possibility that racehorses under certain stress conditions could develop changes that may affect their health and welfare. Alterations of the number and function of cells that are involved with the defense response, mainly neutrophils and lymphocytes populations were verified. Thirty *Thoroughbred* racehorses housed at the *Jockey Club de São Paulo*, in São Paulo, Brazil, were used in the present study. The animals were divided in two groups and blood samples were collected at different moments of their routine. In group I, the samples were collected eleven days before race (-11d), immediately after race (0d), one day (+1d), two days (+2d) and three days after race (+3d). In group II, the samples were collected eight days before race (-8d), immediately after race (0d), one day (+1d) and five days after race (+5d). Phagocytosis assay and oxidative burst activity of neutrophils, serum cortisol determination, apoptosis and lymphocyte proliferation assay and haematology tests were performed. The percentage and intensity of phagocytosis functions decreased in samples collected immediately after race, in both groups of animals. The mean values of oxidative burst activity of samples collected immediately after race, from animals of group I also decreased. Statistically significant differences between the results were obtained in relation to the apoptotic cells, when compared on different moments and the same occurred in

Relation to the lymphocyte proliferation values. The mean values of serum cortisol levels increased at the moment immediately after race when compared with the values of the other moments, in both groups of animals. In relation to the haematological values, the percentage of neutrophils was increased at the moment immediately after race when compared with the other moments. Even though a transitory reduction in the neutrophils function has occurred, the adaptive function was not impaired, which suggest that, in spite of the high intensity of this exercise, the short-term race can prevent further damages in well-conditioned and stress-adapted animals.

Key words: Immune function. Cortisol. High intensity exercise. Stress. Racehorses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1	Fluxograma representativo do ensaio de fagocitose	48
Figura 4.2	Fluxograma representativo do ensaio do <i>burst</i> oxidativo	50
Figura 4.3	Fluxograma representativo do ensaio de apoptose	51
Figura 4.4	Fluxograma representativo do preparo das células e cultura <i>in vitro</i> do ensaio de linfoproliferação	54
Figura A1	Esquema do módulo de treinamento A	104
Figura A2	Esquema da citometria de fluxo	105
Figura A3	Esquema da interação entre sistema nervoso, sistema endócrino e sistema imune	106
Figura A4	Esquema dos mecanismos moleculares dos efeitos dos glicocorticóides sobre a função da célula imune	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1	Momentos de coleta determinados em relação ao dia da corrida, nos dois grupos de cavalos	57
------------	--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1	Representação dos dados de citometria de fluxo dos leucócitos do sangue periférico dos cavalos participantes do estudo, após lise dos eritrócitos, em um <i>dot plot</i>	61
Gráfico 5.2.A	Valores referentes aos resultados de porcentagem de fagocitose realizada pelos neutrófilos das amostras dos animais do grupo I (1 a 15).....	64
Gráfico 5.2.B	Valores referentes aos resultados de porcentagem de fagocitose realizada pelos neutrófilos das amostras dos animais do grupo II (16 a 30).....	64
Gráfico 5.2.C	Valores de intensidade de fagocitose dos neutrófilos, expressos em intensidade média de fluorescência das amostras dos animais do grupo I (1 a 15).....	64
Gráfico 5.2.D	Valores de intensidade de fagocitose dos neutrófilos, expressos em intensidade média de fluorescência das amostras dos animais do grupo II (16 a 30).....	64
Gráfico 5.2.E	Valores obtidos no ensaio de <i>burst</i> oxidativo expressos em intensidade média de fluorescência em escala logarítmica dos neutrófilos das amostras dos animais do grupo I (1 a 15).....	64
Gráfico 5.2.F	Valores obtidos no ensaio de <i>burst</i> oxidativo expressos em intensidade média de fluorescência em escala logarítmica dos neutrófilos das amostras dos animais do grupo II (16 a 30).....	64
Gráfico 5.3	Representação dos valores médios do total de células apoptóticas encontradas nas amostras dos animais do grupo II (16 a 30), nos diferentes momentos de colheita.....	68
Gráfico 5.4	Representação dos dados de citometria de fluxo, em um <i>dot plot</i> , dos leucócitos mononucleares do sangue periférico dos cavalos participantes do estudo, após cultura de 72h.....	69
Gráfico 5.5	Histograma da fluorescência do CFSE (diacetato de carboxifluoresceína) dos linfócitos do sangue periférico eqüino após cultura de 72h, sem utilização de mitógenos (controle).....	70

Gráfico 5.6	Histograma da fluorescência do CFSE (diacetato de carboxifluoresceína) dos linfócitos do sangue periférico eqüino após cultura de 72h, com utilização de concanavalina A.....	71
Gráfico 5.7	Representação dos resultados de hemograma referentes à contagem do número relativo (%) de neutrófilos (NØ) nos diferentes momentos de coleta.....	74
Gráfico 5.8	Representação dos resultados de hemograma referentes à contagem do número relativo (%) de linfócitos (LØ) nos diferentes momentos de coleta.....	74
Gráfico 5.9	Representação dos valores médios de níveis séricos de cortisol das amostras provenientes dos animais 1 a 15, obtidos nos diferentes momentos de coleta.....	78
Gráfico 5.10	Representação dos valores médios de níveis séricos de cortisol das amostras provenientes dos animais 16 a 30, obtidos nos diferentes momentos de coleta.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Valores representativos da média \pm desvio-padrão da porcentagem de células que realizaram fagocitose e da intensidade do processo das amostras coletadas dos animais do grupo I (1 a 15)	63
Tabela 5.2	Valores representativos da média \pm desvio-padrão da porcentagem de células que realizaram fagocitose e da intensidade do processo das amostras coletadas dos animais do grupo II (16 a 30)	63
Tabela 5.3	Valores representativos da média \pm desvio-padrão do <i>burst</i> oxidativo realizado com amostras coletadas dos animais do grupo I (1 a 15).....	66
Tabela 5.4	Valores representativos da média \pm desvio-padrão do <i>burst</i> oxidativo realizado com amostras coletadas dos animais do grupo II (16 a 30)	66
Tabela 5.5	Valores representativos da média \pm desvio-padrão dos resultados do ensaio de apoptose realizado com amostras coletadas dos animais do grupo II (16 a 30)	68
Tabela 5.6	Valores representativos da média \pm desvio-padrão dos resultados do ensaio de linfoproliferação realizado com amostras coletadas dos animais do grupo II (16 a 30)	72
Tabela 5.7	Valores representativos da média \pm desvio-padrão dos resultados do hemograma realizado com amostras coletadas dos animais do grupo II (16 a 30)	75
Tabela 5.8	Valores representativos da média \pm desvio-padrão da concentração sérica de cortisol em amostras coletadas dos animais do grupo I (1 a 15)	77
Tabela 5.9	Valores representativos da média \pm desvio-padrão da concentração sérica de cortisol em amostras coletadas dos animais do grupo II (16 a 30)	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Contagem do número relativo (porcentagem)
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AIF	Fator indutor de apoptose
AMPK	Proteína-quinase A ativada por adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina 5'trifosfato
Bø	Basófilos
CFSE	Carboxifluoresceína
CFR	Fator liberador de corticotrofina
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
ConA	Concanavalina A, lectina da <i>Conavalia ensiformis</i>
CR	Receptor para componente do sistema complemento
DAV	Divisão de Assistência Veterinária
DCFH-DA	2,7 Diacetato de diclorofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diaminotetracetato sódico
Eø	Eosinófilos
Fc	Fragmento da molécula de anticorpo resultante da digestão pela papaína
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos
Hb	Hemoglobina
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hct	Volume globular (hematócrito)
He	Hemácias
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IFN	Interferon
IL	Interleucina
JCSP	Jockey Club de São Paulo
LDH	Laboratório de Dosagens Hormonais
Leu	Número total de leucócitos

Lø	Linfócitos
MCHC	Concentração hemoglobínica corpuscular média
Mø	Macrófagos
NFκB	Fator nuclear de transcrição
Nø	Neutrófilos
PBS	Solução salina tamponada
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Iodeto de propídeo
PSI	Puro sangue inglês
PWM	<i>Pokeweed</i>
R-10	Meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal eqüino
SaPi	<i>Staphylococcus aureus</i> marcadas com iodeto de propídeo
SFE	Soro fetal eqüino
SNS	Sistema nervoso simpático
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μL	microlitro
Ca^{2+}	ions càlcio
CO_2	diòxido de carbono
dL	decilitro
g	(centrífuga)
m	metro
mL	mililitro
mM	milimolar
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
3	OBJETIVOS	42
4	MATERIAL E MÉTODO	43
4.1	LOCAL	43
4.2	ANIMAIS	43
4.2.1	Módulo de treinamento A	45
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS	46
4.4	ENSAIO DE FAGOCITOSE	47
4.5	ENSAIO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO	49
4.6	ENSAIO DE APOPTOSE	50
4.7	ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO	52
4.7.1	Preparo das células	52
4.7.2	Cultura <i>in vitro</i>	55
4.8	CITOMETRIA DE FLUXO	55
4.9	HEMOGRAMA	56
4.10	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CORTISOL	57
4.11	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	57
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5	RESULTADOS	60
5.1	PREPARAÇÃO CELULAR E CITOMETRIA DE FLUXO PARA OS ENSAIOS DE FAGOCITOSE, <i>BURST</i> OXIDATIVO E APOPTOSE	60
5.1.1	Ensaio de Fagocitose	61
5.1.2	Ensaio do <i>Burst</i> Oxidativo	65

5.1.3	Ensaio de Apoptose	67
5.2	ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO	69
5.3	HEMOGRAMA	72
5.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CORTISOL	75
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	96
	APÊNDICES	103
	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

Particularmente bem projetados para um exercício de alta intensidade, os cavalos sempre se apresentaram na natureza como atletas singulares, com capacidade de prover um esforço explosivo na fuga de seus predadores. Desde o final da Idade Média, na Inglaterra, esta característica tem sido explorada através de corridas de cavalos.

Com a concepção do Jockey Club inglês, em 1750, iniciou-se a importação de garanhões árabes e bérberes que, junto às éguas inglesas de batalha, fixaram os pilares da criação da raça *Thoroughbred* ou puro-sangue inglês de corridas (BARCELLOS, 2002).

Embora os cavalos apresentem características excepcionais, como a capacidade de aumentar seu consumo de oxigênio e sua ventilação muito rapidamente, quando necessário; ou mesmo de contrair o baço ao início do exercício e dobrar sua capacidade de transporte de oxigênio sangüíneo; ou ainda, de suportarem uma hipóxia arterial, e, por vezes, até mesmo hipercapnia, durante um grande esforço, no momento em que foram designados à competição, acabaram por serem submetidos a situações de estresse, que não ocorreriam, nem de maneira crônica, no ambiente selvagem.

Eles permanecem confinados durante grande parte do tempo e submetidos a uma rotina de exercícios pré-estabelecida. Frente a este cenário, característica de grandes centros de treinamento, considerou-se a possibilidade do cavalo de corrida experimentar, por vezes, alguma situação de estresse, que acabasse por afetar sua saúde e bem estar, e, conseqüentemente, sua performance.

Diante do conhecimento da interação entre as respostas do sistema neuroendócrino e do sistema imunológico (BESEDOVSKY et al., 1983), e da reconhecida suscetibilidade de cavalos de corridas a infecções respiratórias, surgiu a preocupação de se verificar o *status* em que se encontravam alguns componentes sangüíneos - solúveis e celulares - implicados com a capacidade de defesa dos cavalos frente a eventuais adversidades, em resposta ao exercício que praticavam no seu dia-a-dia.

O sistema imune tem como função principal restabelecer a homeostasia através de vários mecanismos de defesa. De acordo com suas características funcionais, os componentes deste sistema podem ser classificados em duas categorias principais: inatos e adaptativos ou adquiridos. Os primeiros respondem a estímulos de maneira pouco específica frente aos antígenos e estão sempre presentes em níveis basais. Os segundos atuam de modo altamente específico, com indução de memória (PIER et al., 2004).

Perante a prontidão do neutrófilo polimorfonuclear e seu importante papel na defesa não-específica do hospedeiro, através da fagocitose de patógenos e da síntese de citocinas, e, somando-se a isto, a constatação de que o exercício é capaz de influenciar direta e indiretamente a função e a distribuição destas células no organismo (PYNE, 1994), optou-se, neste trabalho, por avaliar a atividade de englobamento de antígenos e a ação microbicida desta população celular, respectivamente atividade fagocítica e de *burst* oxidativo, nas amostras coletadas dos cavalos de corrida. A citometria de fluxo, metodologia que permite averiguar a atividade das células através da realização de ensaios simultâneos e com uma pequena quantidade de material, foi o instrumento escolhido para esta análise. Além de permitir a avaliação da cinética celular de um grande número de células de forma

rápida e individual, o uso de anticorpos monoclonais marcados com substância fluorescente, com especificidade para antígenos de superfície celular, torna desnecessária a etapa de separação das células, que poderia consumir tempo e alterar sua função (Anexo A).

Ainda com o uso de citometria de fluxo, pretendeu-se avaliar a resposta proliferativa de linfócitos frente a mitógenos, a fim de se verificar a capacidade funcional desta população em resposta a diferentes intensidades de exercício, uma vez que a atividade física é capaz de induzir um estado semelhante a uma resposta inflamatória deflagrada por um antígeno.

Também em relação aos linfócitos, com o propósito de investigar a regulação da resposta desencadeada frente ao exercício, foram incluídos neste estudo, ensaios de apoptose, principal mecanismo responsável por regular a homeostase do sistema imune, ao promover o término da sua ativação.

A determinação do cortisol sérico e a realização de hemograma foram consideradas relevantes, uma vez que o exercício promove, nos eqüinos, um aumento da concentração deste hormônio no plasma e alteração do número total de determinados grupos celulares (HODGSON; ROSE, 1994).

O fato de se utilizar o cavalo no seu contexto habitual, neste estudo, foi sugerido em um momento oportuno, quando muito do conhecimento atual, no que se refere à resposta fisiológica ao exercício em eqüinos, consiste no resultado de estudos da avaliação de funções de diferentes sistemas corpóreos diante de um exercício controlado, praticado sobre esteiras ergométricas. O exercício realizado em tais aparelhos constitui-se em um método artificial que traz muitas vantagens para um sistema de treinamento; porém, os dados obtidos desta forma não devem ser extrapolados para um evento competitivo, uma vez que não há reprodução dos

efeitos do movimento do ar, da superfície do solo, do impacto e do controle de posicionamento exercido pelo jóquei no momento em que os animais são exercitados sobre a grama ou a areia e, tampouco, de eventuais alterações comportamentais produzidas por estímulos provenientes do ambiente ou da própria competição.

Com a intenção de verificar as condições em que se encontravam alguns componentes sanguíneos - relacionados com potencial de defesa - diante do estímulo do exercício, foram utilizadas amostras de sangue periférico, provenientes de eqüinos atletas locados no Jockey Club de São Paulo, em determinados momentos de sua rotina, representados como períodos em que foram submetidos a diferentes distâncias e intensidades de exercício. Tais amostras foram destinadas aos ensaios de fagocitose, de *burst* oxidativo, de apoptose e linfoproliferação, bem como à determinação da concentração de cortisol e à realização do hemograma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No momento em que se realiza um retrospecto da literatura científica a respeito dos efeitos do exercício sobre o sistema imune, encontram-se artigos que, aparentemente, apresentam resultados paradoxais. Ao verificar estas publicações, o que se nota, é que a maneira como o exercício afeta o sistema imune depende de vários fatores, como a função imune analisada, a duração e a intensidade do exercício, bem como o momento da mensuração da função imune em relação à prática física.

Em geral, em seres humanos, o exercício de alta intensidade, com uma duração curta, causa uma imunossupressão transitória, com tendência a exacerbar conforme aumentam a intensidade e a duração do exercício. Já, o treinamento moderado está tipicamente associado a um aumento da resposta imune e uma melhora da resistência à doença (FERRY et al., 1990; KENDAL et al., 1990; MACNEIL et al., 1991; NIEMAN et al., 1989; NIEMAN et al., 1990; NIEMAN et al., 1992; PEDERSEN et al., 1988).

Em várias espécies, incluindo a eqüina, o exercício provoca mudanças no número e na distribuição de leucócitos circulantes. A leucocitose está entre as respostas mais consistentes frente ao exercício e, de forma geral, ocorre após todos os tipos de exercício (FIELD et al., 1991; KEAST et al., 1988; MCCARTHY; DALE, 1988). A magnitude da leucocitose tende a aumentar com a intensidade e a duração do exercício, e diminuir com um melhor estado de condicionamento (GIMENEZ et al., 1986; MCCARTHY; DALE, 1988). É freqüente que a leucocitose observada em associação com o exercício de alta intensidade seja bifásica, com uma mobilização

inicial dos linfócitos, seguida dos neutrófilos e monócitos (MCCARTHY; DALE, 1988). Normalmente, o número de leucócitos retorna aos níveis basais dentro de vinte e quatro horas ou menos. Durante a recuperação, o número total de linfócitos chega aos valores pré-exercício antes dos neutrófilos, o que resulta em um aumento da taxa neutrófilo:linfócito (N:L). Em alguns casos, o número de linfócitos pode chegar a assumir valores inferiores aos níveis basais, antes de alcançá-los (HINES et al., 1996).

Em um experimento realizado em cavalos sob treinamento, as alterações encontradas na taxa N:L frente ao exercício apresentaram-se similares às variações ocorridas nesta taxa após administração de ACTH₁₋₂₄. Esta observação levou os autores do trabalho a concluir que as modificações da taxa N:L poderiam ser utilizadas como um índice da atividade adrenocortical em cavalos adultos (ROSSDALE et al., 1982).

Ao vivenciarem uma situação real, como participantes de uma corrida, ou em uma rápida sessão de treinamento, cavalos *Thoroughbred* condicionados apresentaram um aumento inicial no número de linfócitos associado a um declínio na taxa N:L, que foi seguido de um aumento no número de neutrófilos e na taxa N:L durante a recuperação (SNOW et al., 1983).

Quando submetidos a um exercício de alta intensidade, durante um período breve, sobre esteira, cavalos *Thoroughbred* tiveram um aumento significativo na contagem de leucócitos totais, na contagem de neutrófilos e na taxa N:L, em amostras coletadas de quatro a seis horas após o exercício. Estas observações

foram feitas tanto em animais condicionados (CHURCH et al., 1987 apud HINES et al., 1996)¹, quanto em não condicionados (WONG et al., 1992).

Em exercícios com duração prolongada, como ocorre em provas de enduro, o número de neutrófilos apresentou-se aumentado logo após o término da prova, contudo, houve também um declínio significativo no número de linfócitos (CARLSON et al., 1976; HINES et al., 1994 apud HINES et al., 1996)². Uma neutrofilia significativa foi também encontrada em amostras coletadas de cavalos condicionados, após uma hora e após um dia de participação em um enduro de oitenta quilômetros. Nas amostras coletadas três dias após o evento, os valores já haviam retornado ao normal. Foi encontrada uma diminuição do número de linfócitos em todas as amostras coletadas após o término da prova, que foi mais evidente nas amostras coletadas depois de uma hora (ROBSON et al., 2003).

Ao se avaliar o número total de leucócitos em cavalos não condicionados, que passaram por um período de treinamento, não foram demonstradas alterações significativas sobre seus valores basais, ou seja, os valores encontrados ao repouso antes e após o treinamento (ROSE; HODGSON, 1982; SNOW et al., 1983).

Além da observação de mudanças em relação ao número de leucócitos circulantes, ao se consultar vários artigos, notam-se também alterações na função destas células. A maior parte das investigações teve como foco a imunidade inata, já que estas respostas iniciais frente aos patógenos desempenham um papel central na resistência à doença e no desenvolvimento subsequente da resposta imune adaptativa ou específica. Uma atenção preferencial foi destinada à avaliação da

1 CHURCH, D.B.; EVANS, D.L.; LEWIS, D.R. The effect of exercise on plasma adrenocorticotrophin, cortisol and insulin in the horse and adaptations with training. In: GILLESPIE, J.R.; ROBINSON, N.E. *Equine Exercise Physiology*. Davis: ICEEP, 1987. p. 506-515.

2 HINES, M.T.; LEROUX, A.J.; SCHOTT, H.C. Changes in lymphocyte subpopulations following prolonged exercise in horses. *Proceedings of the 12th Annual Veterinary Medical Forum*, San Francisco, 1994, p. 1016.

função do neutrófilo e da célula *natural killer* (NK) (WONG et al., 1992; HOROHOV et al., 1996).

Os neutrófilos representam a principal subclasse de granulócitos, em termos de número de células circulantes, bem como de importância quanto à capacidade de realizar fagocitose. Possuem núcleo multilobulado e seu citoplasma contém três tipos de grânulos, onde ocorre armazenamento de enzimas. Sua membrana plasmática caracteriza-se por um conjunto de moléculas de superfície que incluem moléculas de adesão, receptores para porção Fc de imunoglobulinas e receptores para complemento. Assim, a fagocitose é facilitada quando os alvos fagocíticos estão ligados a proteínas do complemento ou anticorpos presentes no soro do hospedeiro (PIER, 2004).

A fagocitose constitui um processo pelo qual uma célula pode internalizar e digerir material particulado. Em mamíferos, este mecanismo está implicado com a defesa contra agentes infecciosos, o remodelamento dos órgãos no desenvolvimento embrionário, a reparação tecidual após uma lesão e a remoção de células senescentes. Como suas funções são essenciais para sobrevivência e homeostasia, há uma complexa rede de sinalização envolvida para regulação deste processo (PAUL, 2003).

Quando os neutrófilos fagocitam partículas, o fagossomo funde com o lisossomo e produz uma estrutura denominada fagolisossomo. Os grânulos de estoque fundem-se ao fagolisossomo e o material englobado é degradado. Há liberação de defensinas, enzimas que tornam a membrana de patógenos permeável; e oxidases, que geram espécies reativas de oxigênio (ERO), que destroem os patógenos, em um processo referido como *burst* oxidativo. Os neutrófilos produzem citocinas com função pró-inflamatória, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8; e citocinas

que modulam as atividades de linfócitos T e B, como o antagonista do receptor de IL-1 e TGF- β (PIER, 2004).

Em cavalos não condicionados, submetidos a um treinamento intenso de quatro a sete semanas, com o objetivo de participarem de um enduro de três dias, percebeu-se uma diminuição da função fagocítica dos neutrófilos para valores menores que os encontrados antes do início do programa ou em um treinamento leve - tanto no período de repouso quanto no pós-exercício - em amostras coletadas semanalmente, nas diferentes fases do treinamento. A atividade de *burst* oxidativo destas células, no entanto, permaneceu inalterada (BUSCHMANN; BAUMANN, 1991).

Ainda em cavalos não condicionados, submetidos a exercícios de alta intensidade, por períodos curtos (seis minutos de exercício ao passo, ao trote e *canter*, seguidos de dois a quatro minutos e meio de exercício de alta velocidade), sobre esteiras, houve uma diminuição transitória da atividade de *burst* oxidativo e do índice quimiotático dos neutrófilos, após vinte e quatro horas da execução do exercício (WONG et al., 1992); enquanto, em um outro experimento, foi encontrada também uma inibição significativa da atividade do *burst* oxidativo, já aos trinta minutos após a realização do exercício (HINES, 1994 apud HINES, 1996)³.

A avaliação de neutrófilos de sangue periférico equino, com a utilização de citometria de fluxo, foi realizada inicialmente com a utilização de *beads* (FOERSTER; WOLF, 1990) ou de leveduras, marcados com substância fluorescente (JOHANNISSON et al., 1995). O uso de espécies bacterianas conhecidas, combinadas à substância fluorescente, foi estabelecido mais tarde em ensaios de

3 HINES, M.T.; LEROUX, A.J.; SCHOTT, H.C. Changes in lymphocyte subpopulations following prolonged exercise in horses. Proceedings of the 12th Annual Veterinary Medical Forum, San Francisco, 1994, p. 1016.

sangue periférico equino, com o propósito de aumentar a importância dos achados experimentais no entendimento de eventos relacionados com a patogênese de doenças (RAIDAL et al., 1998).

A atividade do *burst* oxidativo, estimulada pela fagocitose ou por estímulos solúveis, promove um aumento no consumo de oxigênio não-mitocondrial e a geração de metabólitos reativos do oxigênio. Dentro das células fagocíticas, estas substâncias são importantes para destruição de microrganismos ingeridos. Nas células não-fagocíticas, o metabolismo oxidativo aumentado é indicativo de ativação celular. Os métodos de citometria de fluxo para a determinação do *burst* oxidativo têm como base a mensuração das reações oxidativas intracelulares, de forma individual. As células são permeadas por uma substância precursora não-fluorescente, que é oxidada pelos componentes do *burst* oxidativo, a um produto fluorescente (ADAMSON; SLOCOMBE 1995).

Com o uso de citometria de fluxo, cavalos *Standardbred* não condicionados, sujeitos a um exercício de intensidade moderada, sobre esteira, mostraram a função de fagocitose e a resposta de *burst* oxidativo aumentadas; enquanto os que foram submetidos a um exercício de alta intensidade apresentaram um decréscimo transitório e um aumento subsequente na capacidade de fagocitose das células. A atividade de *burst* oxidativo dos neutrófilos foi significativamente reduzida por seis horas após o exercício e o retorno aos valores pré-exercícios ocorreu vinte e duas horas pós-exercício (RAIDAL et al., 2000).

Alterações na atividade de *burst* oxidativo também estiveram presentes em cavalos condicionados que participaram de uma prova de enduro de oitenta quilômetros, com amostras coletadas antes, durante e após o término da prova.

Houve diminuição significativa da atividade de *burst* oxidativo após a prova, inclusive na última amostra, coletada três dias após o evento (ROBSON et al., 2003).

Recentemente, com a utilização de técnicas mais simples que a citometria de fluxo, foi realizada avaliação da função imunológica não específica (aderência, quimiotaxia, fagocitose e testes de metabolismo oxidativo), em amostras de cavalos não condicionados de raças diferentes (anglo-árabe e hispano-árabe), após um período curto de exercício de intensidade moderada, em uma área de transição aeróbica-anaeróbica, realizado sobre esteira. Não houve mudanças significativas na resposta imune não específica, quando foram confrontados os valores encontrados nas duas raças, em amostras coletadas antes e dentro de um minuto após o exercício (ESCRIBANO et al., 2005a).

Em uma comparação entre cavalos condicionados e não condicionados frente a um exercício de intensidade moderada, mostrou-se que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi maior no grupo condicionado que no outro, tanto antes quanto imediatamente após o exercício. Foram também notadas diferenças quanto à fagocitose destas células, os cavalos condicionados apresentaram valores médios maiores de índice de fagocitose, porcentagem de fagocitose e eficiência de fagocitose no estágio de recuperação e um aumento na porcentagem de fagocitose imediatamente após o exercício, quando comparados aos não condicionados (ESCRIBANO et al., 2005b).

Em relação à avaliação da resposta imune adaptativa frente ao exercício, a principal forma de realização tem sido a mensuração da resposta proliferativa de linfócitos em resposta a mitógenos e antígenos.

Os linfócitos são morfologicamente as células mais simples e funcionalmente as mais distintas células do sistema imune. São as células efetoras da imunidade

adaptativa ou adquirida e podem ser subdivididas de acordo com suas moléculas de superfície e sua função. Após haver reconhecimento do seu antígeno cognato, entram em processo de ativação e proliferação e diferenciam-se em células efetoras ou células de memória (PIER, 2004).

Com a utilização de cavalos condicionados, submetidos a um exercício de alta intensidade, encontrou-se uma supressão da resposta proliferativa de linfócitos com uso de mitógeno concanavalina A (ConA) e fitohemaglutinina (PHA) (KURCZ et al., 1988). Em outra publicação, em cavalos não condicionados não foram encontradas alterações na resposta dos linfócitos a mitógenos PHA, ConA ou *pokeweed* (PWM) após exercício de mesma classificação quanto à intensidade (WONG et al., 1992). Outro grupo de pesquisadores encontrou uma diminuição na resposta proliferativa de linfócitos a PWM e vírus da influenza eqüina; e descreveu utilizar condições semelhantes, ou seja, cavalos não condicionados e exercício de alta intensidade (KEADLE et al., 1993). Estas variações foram relacionadas a eventuais diferenças na condição de treinamento dos animais, no protocolo de exercício e, mesmo, na sua intensidade, quando confrontadas em artigo de revisão (HINES et al., 1996).

Um decréscimo consistente na proliferação de linfócitos foi observado durante a execução de um exercício de alta intensidade, em cavalos que participaram de um evento de três dias, independente do estado de treinamento. Não foram encontradas alterações na responsividade de linfócitos ao repouso como um resultado de treinamento intensivo (BUSCHMANN; BAUMANN, 1991).

Cavalos *Thoroughbred*, condicionados, que participaram de corridas tiveram uma redução significativa da resposta de linfoproliferação frente a mitógenos PHA,

ConA e PWM, após um período de doze a dezesseis horas do término do evento (NESSE et al., 2002).

Em um teste da capacidade proliferativa de linfócitos, obtidos do sangue periférico de cavalos condicionados, foi encontrada uma diminuição da resposta diante da estimulação com ConA, após realização de um exercício físico de intensidade submáxima, sobre esteiras (CHIARADIA et al., 2005).

Acredita-se, porém, que mais importante que as observações e os resultados encontrados nos diversos trabalhos, esteja a tentativa de se correlacionar variações da função imune mensuradas *in vitro* e uma maior suscetibilidade à doença *in vivo* (HOROHOV, 2003).

Observações feitas em cavalos *Thoroughbred* não condicionados, sujeitos a um exercício de alta intensidade sobre esteira, indicaram que as respostas imunes *in vitro* desencadeadas frente ao vírus da influenza eqüina e a PWM foram fortemente inibidas. Segundo os autores, isto poderia ser interpretado como uma suscetibilidade aumentada à infecção viral caso houvesse exposição ao vírus, na natureza, durante ou após este tipo de exercício (KEADLE et al., 1993).

Dois artigos bastante interessantes, apresentados a seguir, discutem o aumento da susceptibilidade frente a uma infecção experimental em animais que foram submetidos a exercício de alta intensidade e programas de imunização.

Pôneis não condicionados submetidos a um protocolo rigoroso de exercício sobre esteiras, seis semanas após serem imunizados com duas doses de vacina comercial contendo vírus da influenza eqüina, foram suscetíveis à infecção experimental pelo vírus da influenza eqüina. Os controles não exercitados foram protegidos. Antes do início do programa de exercícios, os valores médios das respostas de proliferação dos pôneis que seriam exercitados e dos pôneis

pertencentes ao grupo controle não foram significativamente diferentes. Porém, após cinco dias de exercícios, o grupo de animais exercitados exibiu uma supressão significativa da resposta proliferativa quando os valores encontrados foram comparados aos seus valores pré-exercícios e aos do grupo controle (FOLSOM et al., 2001).

Também com utilização de pôneis não condicionados, sujeitos a um programa de exercícios de alta intensidade por cinco dias e, em seguida, imunizados com uma dose de vacina intranasal com vírus da influenza eqüina, promoveu-se um desafio com cepa viral homóloga, três meses após o processo de imunização. O exercício causou uma imunossupressão, indicada por uma diminuição na proliferação de linfócitos em resposta ao PWM. Porém, após o desafio, somente os controles, não imunizados e não exercitados apresentaram sinais de infecção (LUNN et al., 2001), o que colocou em discussão mais uma variável: a via de administração e, mesmo, o tipo de vacina administrado.

Os mecanismos responsáveis por mudanças no número e na função dos leucócitos não são simples; no entanto, credita-se grande parte destas alterações à modulação neuroendócrina. Para manter a homeostasia sob o estresse do exercício, o sistema nervoso autônomo e o sistema endócrino desempenham um papel importante na mobilização dos estoques de energia e no controle da homeostasia cardiovascular e do equilíbrio hídrico, com a finalidade de estabelecer uma função bem coordenada do sistema nervoso, respiratório, cardiovascular e músculo-esquelético. Para acomodar o grande aumento na demanda de energia e oxigênio do trabalho muscular, e, permitir a dissipação de produtos do metabolismo e do calor durante um exercício de alta intensidade, ocorrem processos iniciados e controlados por fatores neurais, hormônios, peptídeos vasoativos liberados pelos músculos e

condições de hipóxia. Um aumento na liberação do oxigênio para o trabalho muscular é feito através da ativação do sistema nervoso simpático e pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Ocorre um aumento rápido na circulação de ACTH, epinefrina, norepinefrina e cortisol, daí serem hormônios utilizados na avaliação do estresse induzido pelo exercício (HYYPPÄ, 2005).

Uma atenção particular têm sido conferida às concentrações de cortisol aumentadas na circulação após um exercício de alta intensidade ou após exercício de longa duração, em cavalos (CHURCH et al., 1987 apud HINES et al., 1996⁴; GOLLAND et al., 1999; HOROHOV et al., 1999; KEADLE et al., 1993; KURCZ et al., 1988; LASSOURD et al., 1996; NAGATA et al., 1999; NESSE et al., 2002; ROBSON et al., 2003; SNOW; ROSE, 1981; WONG et al., 1992).

No âmbito bioquímico, o exercício intenso pode produzir um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a defesa antioxidante, e promover um ambiente de estresse oxidativo no organismo. O treinamento está associado a uma regulação positiva dos mecanismos de depleção dos radicais livres. Em um estudo na espécie humana, demonstrou-se que a intensidade de um exercício afeta o estado de óxido-redução e os processos de apoptose dos linfócitos (URSO; CLARKSON, 2003).

Apoptose ou morte celular programada é uma forma de destruição celular deflagrada através de mecanismos internos altamente regulados. Pode ocorrer em estados fisiológicos e patológicos. É caracterizada por condensação do núcleo e do citoplasma. A membrana plasmática permanece inicialmente intacta, a ativação das caspases leva a uma transição do potencial de membrana da mitocôndria,

4 CHURCH, D.B.; EVANS, D.L.; LEWIS, D.R. The effect of exercise on plasma adrenocorticotrophin, cortisol and insulin in the horse and adaptations with training. In: GILLESPIE, J.R.; ROBINSON, N.E. Equine Exercise Physiology. Davis: ICEEP, 1987. p. 506-515.

acompanhada por mudanças intracelulares nos íons cálcio e pH. Após a perda do potencial de membrana da mitocôndria, as bombas de transporte da membrana lisossomal perdem sua função. Neste estado, a célula passa o ponto irreversível, ocorre ativação de endonucleases e há uma redistribuição dos fosfolípidos de membrana. Finalmente, a célula se desintegra em corpos apoptóticos. Os fagócitos identificam estas células e removem-nas, porém não há desenvolvimento de reação inflamatória (DARZYNKIEWICZ et al., 1992, 1994, 1997; GORCZYCA et al., 1998; VERMES; HAANEN, 1994).

Apoptose pode resultar de uma via intrínseca ou extrínseca. A via intrínseca envolve a liberação do citocromo c da mitocôndria, que estimula uma cascata que eventualmente induz ativação de caspase-9 e resulta em apoptose. A via extrínseca pode ser induzida por receptores de superfície, como do fator de necrose tumoral, de linfotoxinas e o FasL. Estas proteínas podem recrutar outras proteínas efetoras que resultam na ativação de caspase-8.

Os neurônios, e talvez outras células possuem uma outra via para a autodestruição, que não acontece através de caspases, e sim, por intermédio de um fator indutor de apoptose (AIF), uma proteína localizada no espaço existente entre a membrana interna e a externa da mitocôndria, que quando liberada, migra até o núcleo, liga-se ao DNA e promove sua destruição.

As técnicas para identificar, quantificar e caracterizar apoptose são numerosas, mas a citometria de fluxo é a metodologia de escolha para estudar a cascata apoptótica em relação ao tipo celular, a via deflagradora e tempo (VERMES et al., 2000).

Um exercício severo tende a diminuir a quantidade de glutatona, um antioxidante, e aumentar a exposição de fosfatidilserina e a fragmentação de DNA,

induzidas pelo estresse oxidativo; enquanto, o exercício de intensidade moderada, pode aumentar a concentração de glutathione e reduzir a peroxidação de lipídeos, bem como atenuar o dano celular induzido pelo estresse oxidativo (WANG; HUANG, 2005). Ainda em seres humanos, ao se comparar atletas com um bom condicionamento e atletas pouco condicionados, só houve indução de morte celular nos linfócitos do segundo grupo (MOOREN et al., 2004).

Os mecanismos responsáveis pelas adaptações que ocorrem em um indivíduo, diante do estímulo do exercício, e sua influência sobre o sistema imune, ainda não foram identificados por completo. É visível a dificuldade de comparação entre os diversos experimentos, uma vez que não há uma padronização das condições entre eles.

3 OBJETIVOS

Das várias publicações sobre exercício e função imune em eqüinos, poucas se referem aos cavalos de corrida em seu *modus vivendi*. Desta forma, para a realização deste trabalho, foram selecionados diferentes momentos da rotina dos animais - antes e após participação em corridas - com os principais objetivos:

- Ω Verificar alterações do número de populações celulares implicadas com a defesa, principalmente neutrófilos e linfócitos
- Ω Avaliar mudanças na função *in vitro* de neutrófilos por meio de ensaios de fagocitose e de *burst* oxidativo
- Ω Observar ocorrência de alteração na proliferação de linfócitos diante de mitógenos *in vitro*
- Ω Verificar ocorrência de linfócitos em processo de apoptose
- Ω Identificar mudanças na concentração de cortisol sérico

A intenção de se realizar este estudo foi de apresentar aos colegas médicos veterinários algumas alterações moleculares e celulares que eventualmente possam acometer os eqüinos atletas submetidos a diferentes intensidades de exercício e propor considerações, a fim de que estes animais não sofram uma sobrecarga de estímulos que possa vir a comprometer sua resposta imune e seu desempenho atlético.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 LOCAL

O material biológico destinado aos ensaios de fagocitose, de *burst* oxidativo, de apoptose e linfoproliferação foi processado no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), localizado na cidade de São Paulo, SP. No Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, São Paulo, SP, foi realizada a dosagem da concentração de cortisol sérico e no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias PADDOCK, São Paulo, SP foram realizados os hemogramas.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados trinta animais da espécie eqüina, da raça puro sangue inglês (PSI), condicionados, com idade entre dois e seis anos, que foram divididos em dois grupos (1 a 15 e 16 a 30), com momentos de coleta de amostras distintos. Os animais foram escolhidos, ao acaso, dentro de um grupo que apresentava grande probabilidade de inscrição na corrida da semana subsequente, segundo o treinador e o médico veterinário responsáveis (Apêndice A).

Os cavalos foram mantidos em cocheiras individuais sob condições naturais de luminosidade, temperatura e umidade. A dieta básica dos eqüinos atletas, de peso médio de 475 Kg, consistia em fornecimento sistemático em dois eventos diários (às 10:00h e às 18:00h) de:

- Ω Água *ad libitum* (consumo médio diário estimado em 8% do peso corpóreo, equivalendo a aproximadamente 40 L/ dia)
- Ω Mistura de feno de alfafa e feno de capim *coast-cross*, na proporção de 2:1 com peso médio diário estimado em 1,5% do peso corpóreo de cada animal (4,5 Kg de feno de alfafa para 2,5 Kg de feno de capim)
- Ω Combinação de ração concentrada hipercalórica e aveia achatada na proporção média de 1: 1,5, enriquecida com sal mineral, vitaminas e eletrólitos (5 a 6 Kg de ração para 7 a 8 Kg de aveia)

Uma vez que se encontravam locados nas dependências do Jockey Club de São Paulo (JCSP), os animais eram submetidos a um controle sanitário freqüente, realizado em âmbito populacional, por toda vila hípica e centros de treinamento associados, através de esquemas imunoproláticos, com vacinações estratégicas para as principais enfermidades infecciosas da espécie eqüina como herpesvírose, influenza, encefalomielite, raiva, adenite e tétano, determinado pela Divisão de Assistência Veterinária (DAV) do JCSP. O controle de endoparasitoses era conduzido mediante prescrição também sistemática, com periodicidade variável, de drogas parasiticidas, sob a responsabilidade dos médicos veterinários contratados pelo *stud* ou coudelaria.

Houve permissão para coleta de material no dia da corrida por parte da DAV e pelo Departamento de Controle e Pesquisa Antidopagem do JCSP.

Os eqüinos atletas que compuseram o estudo não pertenciam a um único proprietário, nem eram treinados pelo mesmo profissional. De acordo com as similaridades dos protocolos de treinamento e preparação atlética, instituídos pelos respectivos treinadores, os animais foram agrupados (Apêndice A), e foi estabelecido um módulo de treinamento de quatro semanas, ao se considerar que os cavalos correm, em média, uma vez ao mês. Algumas variações adotadas por determinados treinadores também foram descritas, embora não tenham sido consideradas relevantes na análise dos resultados (Apêndice B).

4.2.1 Módulo de Treinamento (Sistema tradicional de treinamento para cavalos PSI no Brasil) – A (Figura A, Apêndice B)

- Ω Exercícios diários matinais, que consistem em passo, trote e galope suaves, conduzidos por jóquei ou cotejador montados, em distâncias que variam entre 500 e 4000 m - nos dias dois, três, seis, nove, doze, treze, dezoito, dezanove, vinte, vinte e três, vinte e seis e vinte e sete
- Ω Exercícios semanais fortes, que consistem de galope intenso conduzido apenas por jóquei montado:
 - Na distância exata da competição, denominado “trabalho forte de distância”, normalmente aos sábados - nos dias sete e vinte e um

- Na metade da distância exata da competição, denominado “apronto de velocidade”, normalmente às quartas-feiras - nos dias quatro, dez e vinte e quatro
- Ω Períodos de repouso de exercícios em pista, nos dias subseqüentes aos dias com realização de exercícios fortes de distância e velocidade - nos dias um, cinco, oito, onze, vinte e dois e vinte e cinco - e nos três primeiros dias subseqüentes à corrida - nos dias quinze, dezesseis e dezessete

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas por venopunção (veia jugular) em tubos *Vacutainers* (Becton Dickinson, USA) contendo heparina sódica; contendo ácido etileno diaminotetracetato sódico (EDTA); e tubos sem anticoagulante.

O material do tubo com heparina sódica foi utilizado para o ensaio de fagocitose e *burst* oxidativo; o material do tubo contendo EDTA foi utilizado para os ensaios de apoptose, linfoproliferação e hemograma; enquanto do tubo sem anticoagulante obteve-se o soro para determinação de cortisol sérico.

As amostras foram mantidas em recipiente com gelo durante seu transporte até o laboratório.

Uma vez que os páreos eram iniciados entre 13:00 e 19:00h, houve a preocupação de realizar a coleta das amostras dos outros momentos em horários semelhantes, devido à variação da concentração do cortisol sanguíneo ao longo do

dia, com valores mais altos no período da manhã e mais baixos no final da tarde (ZOLOVICK et al., 1966).

4.4 ENSAIO DE FAGOCITOSE

A fagocitose foi determinada pelo uso do método proposto por Hasui et al., (1989).

Foram utilizados, em tubo de polipropileno, 100 μ L de sangue total com heparina sódica^{(2) Figura 4.1}, adicionados 100 μ L de uma solução de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* (aproximadamente $2,4 \times 10^9$ bactérias) marcada com iodo de propídeo, e PBS q.s.p. 1,0 mL. Procedeu-se à incubação a 37 °C, em banho-maria sob agitação, por 20 minutos^{(3) Figura 4.1}. A reação foi interrompida através da adição de 2,0 mL de solução gelada de EDTA (3 mM)^{(4) Figura 4.1}. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 250 g^{(5) Figura 4.1}. O sobrenadante foi desprezado e os eritrócitos foram removidos por lise hipotônica. A lise foi realizada pela adição de 2,0 mL de uma solução de NaCl 0,2 %, em cada amostra, por 20 segundos. Imediatamente após este tempo, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de NaCl 1,6% com a finalidade de se restaurar a isotonicidade^{(6) Figura 4.1}. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 250 g e a lise foi repetida^{(7) Figura 4.1}. Os botões celulares obtidos foram ressuspensos com a adição de 500 μ L de uma solução de PBS^{(8) Figura 4.1} e levados ao citômetro para análise^{(9) Figura 4.1}.

Foi calculado o percentual de células que fagocitaram o *S. aureus* marcado (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias) como segue: número de

neutrófilos fluorescentes dividido pelo número total destas células, multiplicadas por 100.

A magnitude da fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas por célula) foi registrada pelo valor da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos.

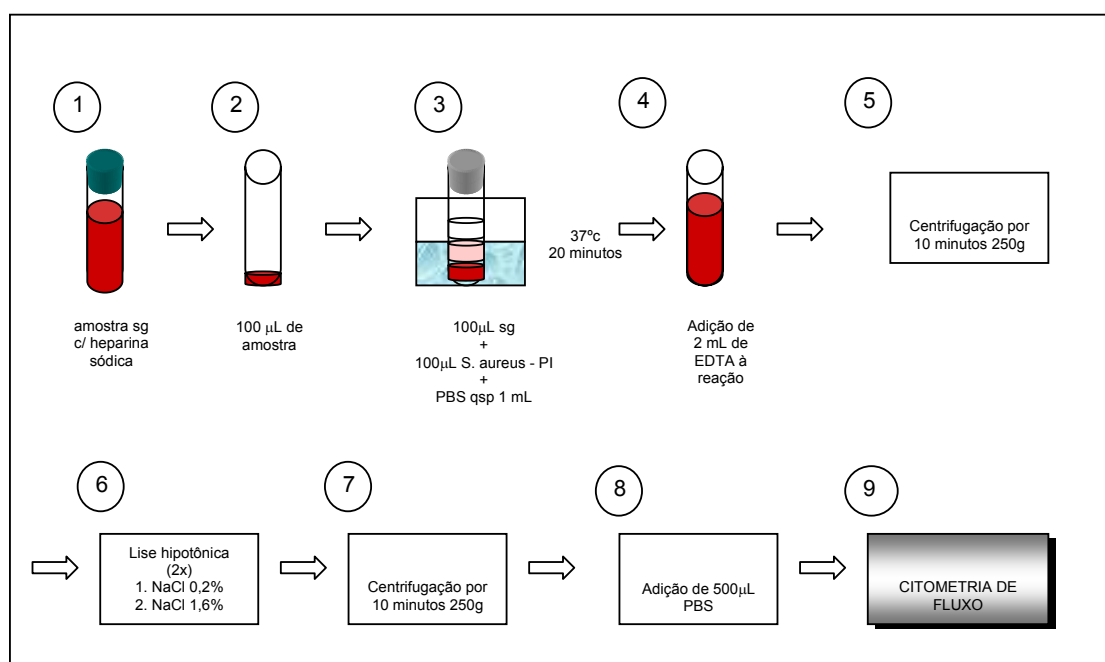


Figura 4.1 – Fluxograma representativo do ensaio de fagocitose

4.5 ENSAIO DO *BURST* OXIDATIVO

A capacidade de neutrófilos do sangue periférico em liberar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a destruição de bactérias foi avaliada pela utilização de métodos descritos por Hasui et al., (1989). Foram adicionados, em tubo de polipropileno, 100 μ L de sangue total com heparina sódica^{(2) Figura 4.2}, adicionados 100 μ L de uma solução de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* (aproximadamente $2,4 \times 10^9$ bactérias) marcada com iodeto de propídeo, 200 μ L de solução de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA 0,3 mM) e PBS q.s.p. 1,0 mL. Procedeu-se à incubação a 37 °C, em banho-maria sob agitação, por 20 minutos^{(3) Figura 4.2}. A reação foi interrompida através da adição de 2,0 mL de solução gelada de EDTA (3 mM)^{(4) Figura 4.2}. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 250 g^{(5) Figura 4.2}. O sobrenadante foi desprezado e os eritrócitos foram removidos por lise hipotônica. A lise foi realizada pela adição de 2,0 mL de uma solução de NaCl 0,2%, em cada amostra, por 20 segundos. Imediatamente após este tempo, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de NaCl 1,6% com a finalidade de se restaurar a isotonicidade^{(6) Figura 4.2}. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 250 g e a lise foi repetida^{(7) Figura 4.2}. Os botões celulares obtidos foram ressuspensos com a adição de 500 μ L de uma solução de PBS e levados ao citômetro para análise^{(8) Figura 4.2}. A magnitude do *burst* oxidativo foi avaliada por citometria de fluxo^{(9) Figura 4.2}.

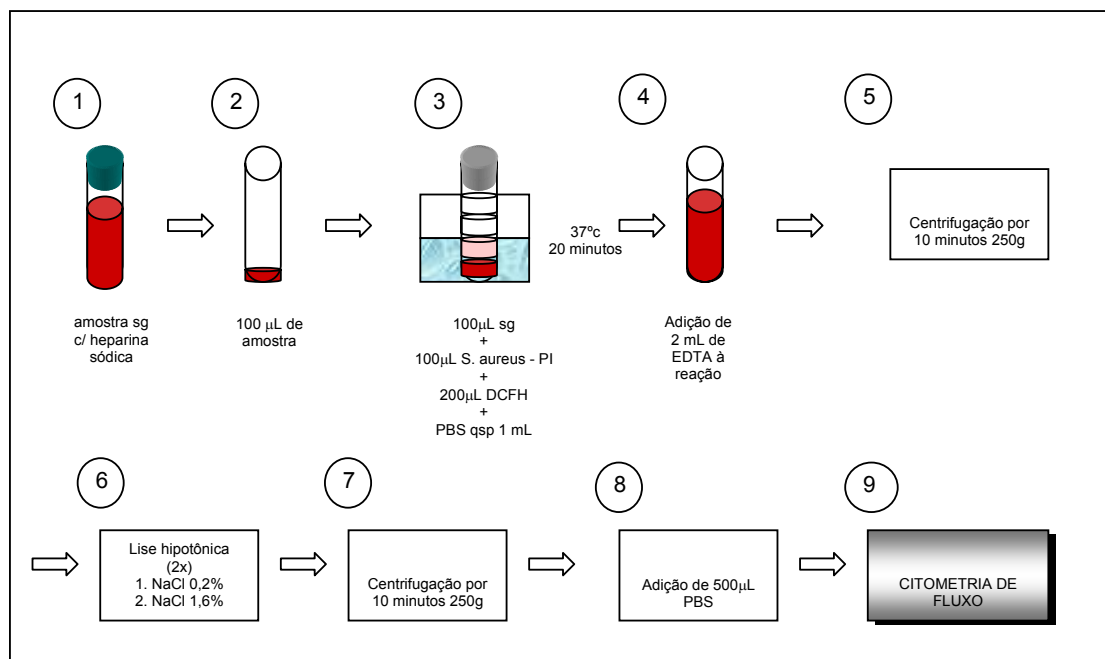


Figura 4.2 – Fluxograma representativo do ensaio do *burst* oxidativo

4.6 ENSAIO DE APOPTOSE

Para a detecção do fenômeno de apoptose e distinção de células apoptóticas das necróticas, foi utilizada uma técnica que associa um indicador do estágio inicial de apoptose, a anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), e um mensurador da integridade da membrana plasmática, que discrimina células vivas e mortas, o iodeto de propídeo (PI).

Foram colocados 100 μ L de sangue total com EDTA em tubo de polipropileno⁽²⁾ Figura 4.3 e procedeu-se, inicialmente, à remoção dos eritrócitos por lise hipotônica. A lise foi realizada pela adição de 2,0 mL de uma solução de NaCl 0,2%, em cada amostra, por 20 segundos. Imediatamente após este tempo, adicionou-se

2,0 mL de uma solução de NaCl 1,6% com a finalidade de se restaurar a isotonicidade^{(3) Figura 4.3}. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 250 g e a lise foi repetida^{(4) Figura 4.3}. Os botões celulares obtidos foram então utilizados para o ensaio de apoptose^{(5) Figura 4.3}. Foram adicionados 100 μ L de anexina V-FITC diluída em tampão de ligação (1:1500) e 40 μ L de PI diluído em PBS (100 μ g/mL)^{(6) Figura 4.3}. A reação foi incubada à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 20 minutos^{(7) Figura 4.3}. Em seguida, foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação^{(8) Figura 4.3} e, imediatamente, procedeu-se à análise das amostras por citometria de fluxo^{(9) Figura 4.3}.

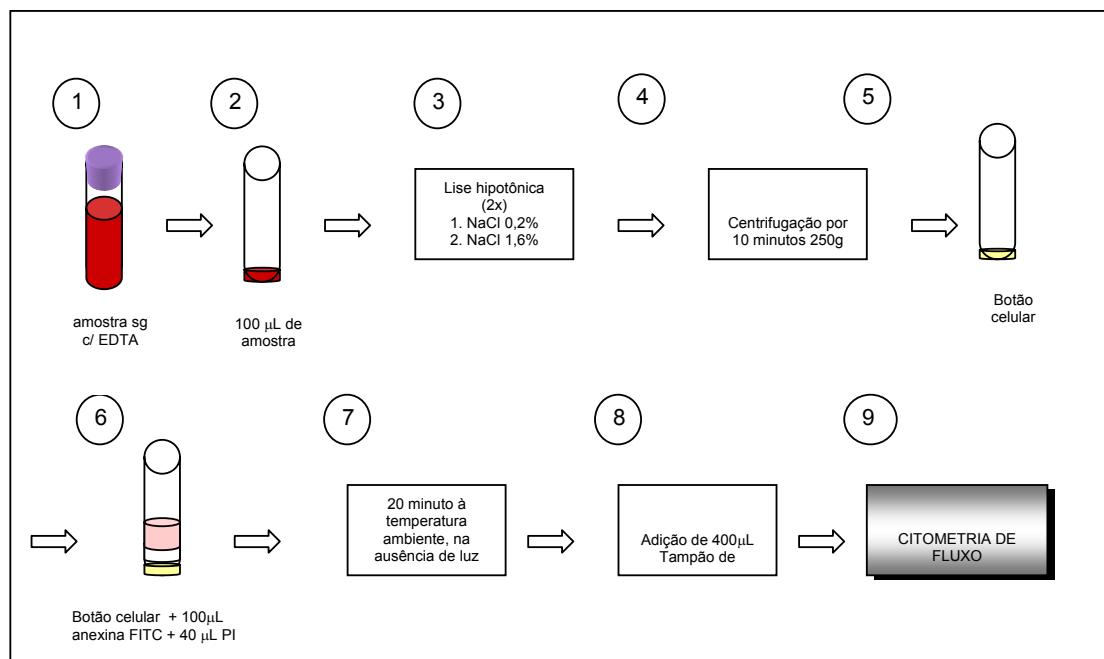


Figura 4.3 – Fluxograma representativo do ensaio de apoptose

4.7 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

4.7.1 Preparo das células

As células mononucleares circulantes no sangue periférico foram separadas por meio de gradiente de densidade. Para este processo, foram utilizados 5,0 mL de sangue total em tubos com EDTA, que foram diluídos e homogeneizados em 4,0 mL de HBSS estéril (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, EUA)^{(2) Figura 4.4} e colocados, delicadamente, sobre 4,0 mL da solução para separação de linfócitos (Ficoll-PaqueTM PLUS – Amersham; Lymphocyte isolation sterile solution), em tubo cônico^{(3) Figura 4.4}. Procedeu-se à centrifugação das amostras a 18 °C, 2100 rpm, por 30 minutos, *no break* (Centrifuga Eppendorf 5810R), com obtenção de um “anel” de células mononucleares (seta)^{(4,5) Figura 4.4}. As células recuperadas foram lavadas em HBSS^{(6) Figura 4.4} e centrifugadas a 4 °C, 250 g, por 10 minutos, duas vezes^{(7) Figura 4.4}, e ressuspensas em 5,0 mL de meio R-10 (RPMI + 10% de soro eqüino). As amostras foram colocadas em placa de cultura com seis *wells* (cada amostra em um *well*) e incubadas a 5 % de CO₂, a 37 °C, por um período aproximado de 2 horas para que os monócitos se aderissem ao fundo da placa^{(8) Figura 4.4}.

Após este período, as células em solução foram colocadas em tubos cônicos, procedeu-se à contagem das mesmas^{(9) Figura 4.4}. A determinação do número total de células e a estimativa da porcentagem de células vivas foram feitas por microscopia óptica, com utilização de hemocitômetros de Neubauer e corante Azul de Trypan.

Foi realizada centrifugação a 4 °C, 250 g, por 10 minutos da solução com células^{(10) Figura 4.4}. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI, adicionado de 1,0 µL de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE 0,25 µM), um corante vital, que é dividido com fidelidade remarcada entre as células-filhas, por oito a dez gerações. Em seguida, foi realizada incubação a 5 % de CO₂, a 37 °C, por 20 minutos^{(11) Figura 4.4}. Após este período, procedeu-se à centrifugação a 4 °C, 250 g, por 10 minutos^{(12) Figura 4.4} e as células foram ressuspensas em 1,0 mL de R-10. Houve ajuste do número de células para $2,0 \times 10^6$ em 2,0 mL^{(14) Figura 4.4} (adaptado de CHEN et al., 2003).

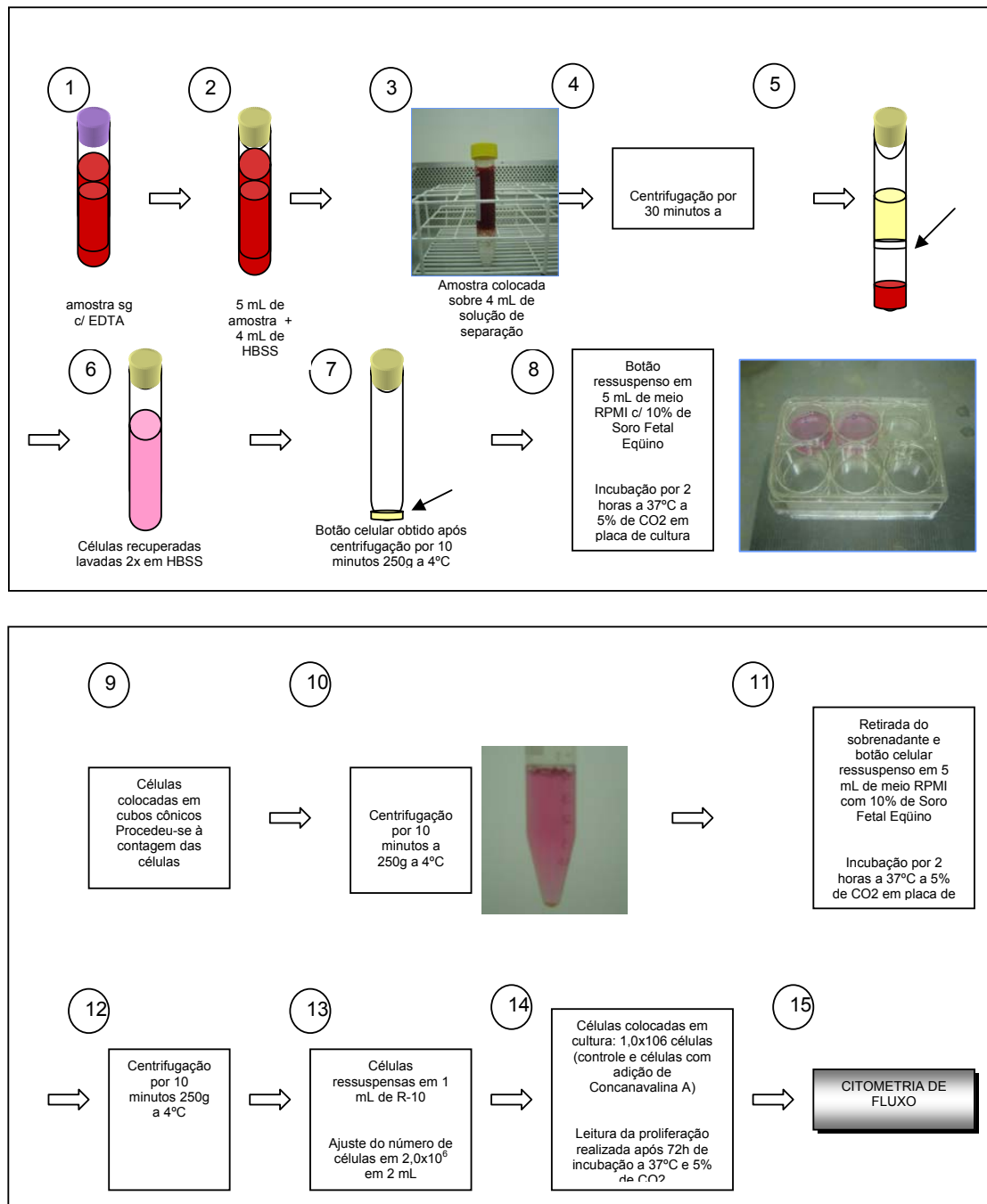


Figura 4.4 – Fluxograma representativo do preparo das células para o ensaio de linfoproliferação

4.7.2 Cultura *in vitro*

Para a avaliação da atividade dos linfócitos, estes foram incubados em meio R-10 a $1,0 \times 10^6$ por *well*, em triplicata, e estimulados com Concanavalina A (Sigma, 5 $\mu\text{g/mL}$), a 5 % de CO_2 , a 37 °C, por 72 horas⁽¹⁴⁾ Figura 4.4. Ao término do período de incubação, procedeu-se à análise das amostras por citometria de fluxo⁽¹⁵⁾ Figura 4.4.

4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Foi utilizado citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Utilizou-se o programa *Cell Quest* (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) e os dados foram coletados de 10.000 eventos para a análise do *burst* oxidativo, da fagocitose e apoptose; enquanto, para a linfoproliferação, foram coletados 50.000 eventos. As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *forward scatter* e *side scatter* (FSC e SSC) das mesmas, respectivamente, tamanho e granulosidade. Foram utilizados os dados de neutrófilos para análise dos ensaios do *burst* oxidativo e da fagocitose, já, para os ensaios de apoptose e linfoproliferação, foram selecionados os dados de linfócitos. As outras subpopulações foram excluídas por meio da análise de *gates*. Os resultados de fluorescência foram gravados em uma escala logarítmica. A fluorescência verde do diclorofluoresceína (DCFH), do isotiocianato de fluoresceína (FITC) e da CFSE foi

mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de propídeo (PI) foi mensurada a 585 ± 42 nm (FL2). A quantificação da capacidade de fagocitose, assim como as análises de *burst* oxidativo e de apoptose foram estimadas pela porcentagem de células e pela intensidade média de fluorescência por célula emitida pelo PI, pelo DCFH e pela FITC, respectivamente. A porcentagem de linfoproliferação foi calculada ao se considerar o número de células que emitiram a fluorescência mais baixa até o limite mínimo de detecção de fluorescência do aparelho depois de subtraído a fluorescência do controle. Desta forma, foi estabelecida uma proporção de células positivas. As fluorescências do PI, do DCFH e da FITC foram analisadas com utilização de compensação de fluorescências para correção de quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos.

4.9 HEMOGRAMA

O hemograma foi realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias PADDOCK, São Paulo, SP. Foram realizados: contagem do número total de leucócitos (Leu); contagem do número relativo (%) de neutrófilos (Nø); contagem do número relativo (%) linfócitos (Lø); contagem do número relativo (%) monócitos (Mø); contagem do número relativo (%) eosinófilos (Eø); contagem do número relativo (%) basófilos (Bø); número total de eritrócitos (He); concentração de hemoglobina (Hb); volume globular (Hct); volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM); e concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC).

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CORTISOL

O cortisol foi determinado por meio de radioimunoensaio de competição (*kit* comercial Coat-A-Count/ DPC MEDLAB) realizado no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, São Paulo, SP.

O limite de detecção do cortisol foi de 0,04 µg/dL, os coeficientes de variação intra-ensaios ficaram abaixo de 10 % e os coeficientes de variação inter-ensaios ficaram entre 0,33 % e 1,42 %.

4.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de sangue foram obtidas em momentos distintos:

GRUPO I	MOMENTO -11d: onze dias antes do dia da corrida
	MOMENTO 0d: dia da corrida
	MOMENTO +1d: um dia após o dia da corrida
	MOMENTO +2d: dois dias após o dia da corrida
	MOMENTO +3d: três dias após o dia da corrida
GRUPO II	MOMENTO -8d: nove dias antes da corrida
	MOMENTO 0d: dia da corrida
	MOMENTO +1d: um dia após o dia da corrida
	MOMENTO +5d: cinco dias após o dia da corrida

Quadro 4.1 – Momentos de coleta determinados em relação ao dia da corrida, nos dois grupos de cavalos

Para os ensaios de fagocitose, *burst* oxidativo e determinação da concentração de cortisol sérico, foram utilizadas amostras dos dois grupos de animais (Quadro 4.1), nos momentos de -11d a +5d; enquanto para os ensaios de linfoproliferação, apoptose de linfócitos e hemograma, realizados com os animais do grupo II, as amostras foram obtidas nos momentos -8d, 0d, +1d e +5d. Os grupos, compostos por quinze animais cada estão descritos no apêndice A.

A escolha dos animais foi realizada ao acaso, diante da possibilidade de inscrição do animal como participante de um páreo. Houve descarte de muitas amostras, quando o animal não tinha sua inscrição efetuada por motivos distintos.

De acordo com o regimento¹ do JCSP, uma vez que o animal estivesse inscrito em uma prova, não havia mais permissão para a realização de qualquer tipo de procedimento invasivo. Caso isto fosse constatado após avaliação veterinária, realizada pouco antes do início do páreo, a retirada do animal seria determinada. Isto impossibilitou a coleta de amostras durante a semana que precede a corrida ou mesmo no dia do evento, antes da prova.

A mudança do protocolo de coleta para o grupo II foi criada com o propósito de diminuir o intervalo entre o dia de coleta referido como um dia de realização de exercício de intensidade menor (-11d) e o dia da corrida (0d), e aumentar o intervalo entre a amostra coletada no dia da corrida e as que representariam os dias de recuperação (+1d, +2d e +3d)

¹ O regimento do JCSP foi estabelecido de acordo com o Código Nacional de Corridas, segundo Ministério da Agricultura da República Federativa do Brasil.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes da aplicação da análise estatística destinada a possibilitar a interpretação dos resultados obtidos, procurou-se verificar, através do teste de Bartlett, qual tipo de teste paramétrico ou não-paramétrico, seria o mais adequado para cada situação experimental.

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelos testes de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para detecção de possíveis diferenças entre os resultados encontrados nos distintos momentos de coleta. Estes testes encontram-se inseridos no software JMP, versão 5.0.1.2 (SAS Institute, 2003).

5 RESULTADOS

5.1 PREPARAÇÃO CELULAR E CITOMETRIA DE FLUXO PARA OS ENSAIOS DE FAGOCITOSE, *BURST* OXIDATIVO E APOPTOSE

A análise dos dados obtidos com o uso da técnica de citometria de fluxo pela utilização do programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) demonstrou regiões com populações celulares distintas. Para os ensaios de fagocitose e *burst* oxidativo foi utilizado o grupo de células localizado na região ou *gate* 1 (R1), referente à população de neutrófilos, enquanto, as células situadas na região ou *gate* 2 (R2), que concentrava os linfócitos, foram utilizadas para o ensaio de apoptose. No *gate* 3 (R3) estava localizada a população de monócitos (Gráfico 5.1).

Embora os grupos de animais tenham sido formados ao acaso, a análise dos resultados dos ensaios de fagocitose, *burst* oxidativo e determinação de cortisol sérico, do momento imediatamente após a corrida e do momento um dia após a corrida - momentos comuns aos dois grupos - mostraram diferença significativa estatisticamente, com $p < 0,0001$, o que impossibilitou a análise dos dados em conjunto.

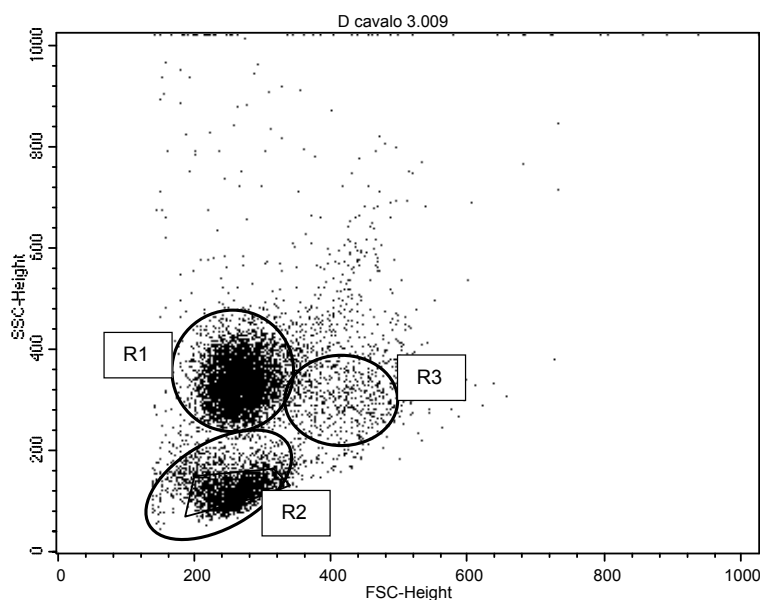


Gráfico 5.1 – Representação dos dados de citometria de fluxo dos leucócitos do sangue periférico dos cavalos participantes do estudo, após lise dos eritrócitos, em um *dot plot*. As populações celulares foram identificadas de acordo com seus perfis *forward scatter* (FSC) *versus side scatter* (SSC), que indicam tamanho *versus* granulosidade e complexidade das células. R1 corresponde ao *gate* de neutrófilos; R2, de linfócitos e R3 de monócitos

5.1.1 Ensaio de Fagocitose

Houve uma diminuição dos valores de porcentagem de fagocitose dos neutrófilos nas amostras coletadas dos animais do grupo I, de 1 a 15, imediatamente após a corrida, quando comparadas às do momento um dia após a corrida. A tabela 5.1 mostra os valores médios, desvios-padrão e a significância estatística considerada. O gráfico 5.2.A ilustra a diferença encontrada.

Em relação à intensidade de fagocitose - que representou quantas partículas de bactérias foram fagocitadas - foi encontrada diferença estatística significativa

entre os valores obtidos nos diferentes momentos. O momento imediatamente após a corrida e o momento três dias após a corrida apresentaram menores valores que o momento onze dias antes da corrida e o momento um dia após a corrida (Tabela 5.1 e Gráfico 5.2.C).

Quanto aos animais 16 a 30, um decréscimo nos valores de porcentagem de fagocitose dos neutrófilos também foi encontrado imediatamente após a corrida, quando comparado aos outros momentos estudados oito dias antes da corrida, um dia após a corrida e cinco dias após a corrida, com significância estatística (Tabela 5.2 e Gráfico 5.2.B).

Em relação aos valores de intensidade de fagocitose, os valores médios obtidos das amostras coletadas no momento imediatamente após a corrida foram menores que os encontrados no momento um dia após a corrida e cinco dias após a corrida, que por sua vez foram menores que os valores encontrados no momento oito dias antes da corrida (Tabela 5.2 e Gráfico 5.2.D)

Tabela 5.1 – Os valores representam a média \pm o desvio-padrão da porcentagem de células que realizaram a fagocitose e da intensidade de fagocitose, com amostras de sangue coletadas dos animais do grupo I (1 a 15) nos momentos identificados como 11 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida, 2 dias após a corrida e 3 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo I	11d antes	0d corrida	1d após	2d após	3d após	significância
% fagocitose	75,8 \pm 26,0 ab	49,9 \pm 27,8 b	87,1 \pm 18,9 a	76,7 \pm 24,9 ab	67,3 \pm 24,8 ab	p<0,029
intensidade	26,9 \pm 15,4 a	16,3 \pm 4,3 b	33,2 \pm 3,9 a	23,7 \pm 11,8 ab	15,0 \pm 3,3 b	p<0,0001

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida

Tabela 5.2 - Os valores representam a média \pm o desvio-padrão da porcentagem de células que realizaram a fagocitose e da intensidade de fagocitose, com amostras de sangue coletadas dos animais do grupo II (16 a 30) nos momentos identificados como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo II	8d antes	0d corrida	1d após	5d após	significância
% fagocitose	97,4 \pm 1,2 a	66,4 \pm 19,5 b	86,9 \pm 13,6 a	97,8 \pm 1,1 a	p<0,0001
intensidade	57,8 \pm 9,1 a	27,0 \pm 4,8 c	42,6 \pm 11,7 b	47,9 \pm 4,4 b	p<0,0001

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida

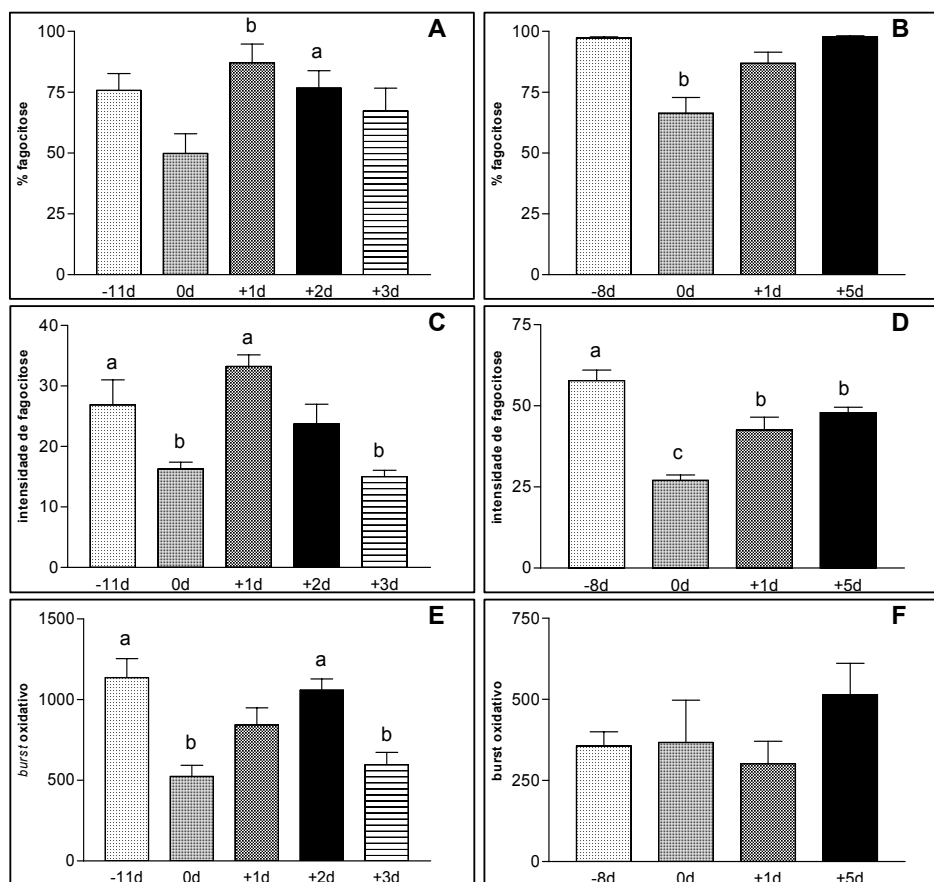


Gráfico 5.2 – A e B: dados referentes aos resultados de porcentagem de fagocitose realizada pelos neutrófilos das amostras dos animais do grupo I (1 a 15) (A) e do grupo II (16 a 30) (B); C e D: valores de intensidade de fagocitose expressos em intensidade média de fluorescência, unidade arbitrária que representa uma média geométrica do número de bactérias destruídas por neutrófilos das amostras dos animais do grupo I (C) e do grupo II (D); E e F: valores obtidos no ensaio de *burst* oxidativo expressos em intensidade média de fluorescência em escala logarítmica dos neutrófilos das amostras dos animais do grupo I (E) e do grupo II (F). Diferença estatística representada por letras distintas, segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003. Nos animais do grupo I foram utilizados os momentos de coleta -11d, corrida, +1d, +2d e +3d (11 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida, 2 dias após a corrida e 3 dias após a corrida). Nos animais do grupo II os momentos de coleta utilizados foram -8d, corrida, +1d, e +5d (8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida)

5.1.2 Ensaio do *Burst* Oxidativo

Os valores médios encontrados no ensaio de *burst* oxidativo para os neutrófilos das amostras obtidas dos animais 1 a 15 estão representados na tabela 5.3 e no gráfico 5.2.E. Houve uma diminuição dos valores das amostras coletadas imediatamente após a corrida e o momento três dias após a corrida, em relação aos momentos referidos como onze dias antes da corrida e dois dias após a corrida.

Quanto aos valores obtidos no ensaio de *burst* oxidativo quando da utilização de amostras coletadas dos animais 16 a 30, não foram apresentadas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 5.4 e Gráfico 5.2.F).

Tabela 5.3 - Os valores representam a média \pm o desvio-padrão do *burst* oxidativo realizado com amostras de sangue coletadas dos animais do grupo I (1 a 15) nos momentos denominados como 11 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida, 2 dias após a corrida e 3 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo I	11d antes	0d corrida	1d após	2d após	3d após	significância
Burst oxidativo	1136,4 \pm 407,2 a	524,2 \pm 248,9 b	844,1 \pm 256,6 ab	1057,6 \pm 253,1 a	596,3 \pm 231,6 b	p<0,0001

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significante entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida

Tabela 5.4 - Os valores representam a média \pm o desvio-padrão do *burst* oxidativo realizado com amostras de sangue coletadas dos animais do grupo II (16 a 30) nos momentos identificados como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo II	8d antes	0d corrida	1d após	5d após	significância
Burst oxidativo	356,6 \pm 123,1 a	367,4 \pm 345,2 a	302,0 \pm 169,0 a	514,2 \pm 217,7 a	p>0,4

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significante entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida

5.1.3 Ensaio de apoptose

Para a análise de apoptose foram utilizadas as células situadas na região demarcada pelo *gate* 1 (R1) (Gráfico 5.1).

A tabela 5.5 mostra as médias e os desvio-padrão relativos ao ensaio de apoptose realizado com as amostras provenientes dos animais do grupo II. Não foi demonstrada diferença estatística significativa entre os valores de células apoptóticas, nos diferentes momentos de coleta (Gráfico 5.3).

Houve diferença estatística significativa em relação aos valores de células necróticas. Foram encontrados valores maiores no momento identificado como oito dias antes da corrida, quando comparados ao momento imediatamente após a corrida. Houve também o encontro de valores menores nos momentos denominados um dia após a corrida e cinco dias após a corrida, ao serem comparados com o momento imediatamente após a corrida. Quanto às células viáveis, valores maiores foram encontrados no momento definido como cinco dias após a corrida; enquanto, valores menores foram observados no momento oito dias antes da corrida, quando comparados ao momento imediatamente após a corrida e ao momento um dia após a corrida (Tabela 5.5).

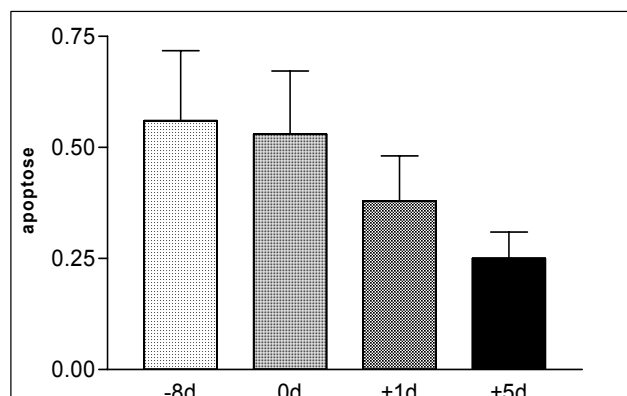


Gráfico 5.3 – Representação dos valores médios do total de células apoptóticas encontradas nos diferentes momentos de coleta definidos como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida, nas amostras dos animais 16 a 30, segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

Tabela 5.5 – Os valores representam a média \pm o desvio-padrão dos resultados do ensaio de apoptose realizado com amostras de sangue coletadas dos animais do grupo II (16 a 30) nos momentos identificados como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo II	8d antes	0d corrida	1d após	5d após	significância
apoptose	0,56 \pm 0,61 a	0,53 \pm 0,55 a	0,38 \pm 0,39 a	0,25 \pm 0,23 a	p>0,5
necrose	0,89 \pm 0,28 a	0,57 \pm 0,58 ab	0,31 \pm 0,17 b	0,23 \pm 0,15 b	p<0,001
células viáveis	98,6 \pm 0,6 b	98,7 \pm 0,7 ab	99,3 \pm 0,5 ab	99,4 \pm 0,4 a	p<0,009

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significante entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida

5.2 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

O gráfico 5.4 mostra o *gate* utilizado para selecionar a população de linfócitos, dentro da população de mononucleares colocada em cultura, a ser analisada após o ensaio de linfoproliferação.

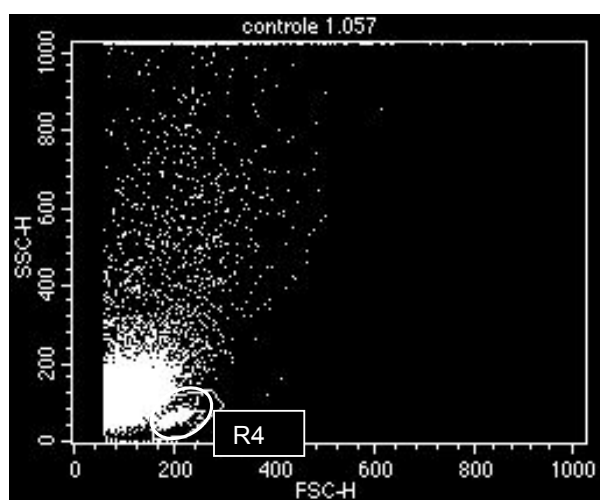


Gráfico 5.4 - Representação dos dados de citometria de fluxo, em um *dot plot*, dos leucócitos mononucleares do sangue periférico dos cavalos participantes do estudo, após cultura de 72h. As populações celulares foram identificadas de acordo com seus perfis *forward scatter* (FSC) *versus side scatter* (SSC), que indicam tamanho *versus* granulosidade e complexidade das células. R4 corresponde ao *gate* de linfócitos

A cinética do ensaio de proliferação da população de linfócitos foi analisada através da utilização de histogramas.

O gráfico 5.5 representa a cinética do tubo controle (sem utilização de mitógenos como estímulo). A fluorescência apresentada pelas células estava

distribuída de forma homogênea, uma indicação de ausência de divisão celular. Foram utilizados marcadores (M) acima dos picos para quantificar os eventos em cada ciclo de divisão celular.

A representação da cinética do ensaio de linfoproliferação após a utilização de concanavalina A (ConA) como estímulo encontra-se no gráfico 5.6. Após o estímulo das células com ConA, foram identificadas algumas séries de divisão diante da perda de intensidade de fluorescência em algumas células respondedoras. Algumas células-filhas apresentaram níveis basais de fluorescência. Também foram utilizados marcadores (M) acima dos picos para quantificar os eventos em cada ciclo de divisão celular. Os dados foram utilizados para construção da tabela 5.6. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando foi realizada a comparação dos valores encontrados nos diferentes momentos de coleta.

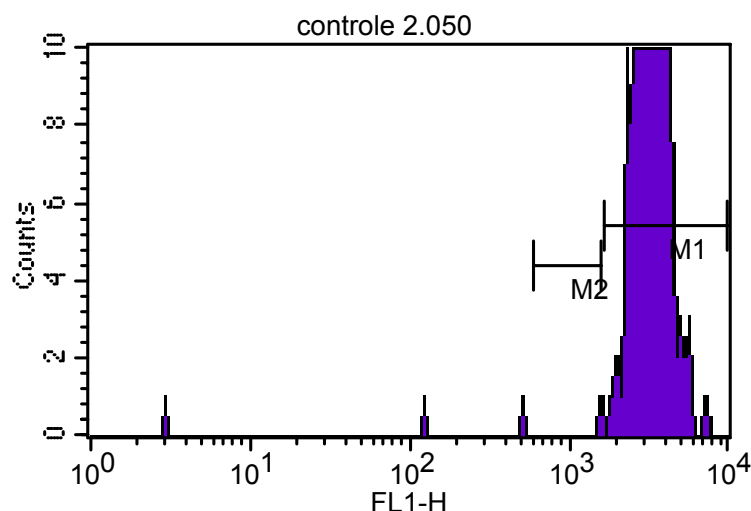


Gráfico 5.5 – Histograma da fluorescência do CFSE (diacetato de carboxifluoresceína) dos linfócitos do sangue periférico equino após cultura de 72h a 5% de CO₂ e 37°C sem utilização de mitógenos (controle). M1 e M2 representam os marcadores utilizados para enumerar os eventos em cada ciclo de divisão

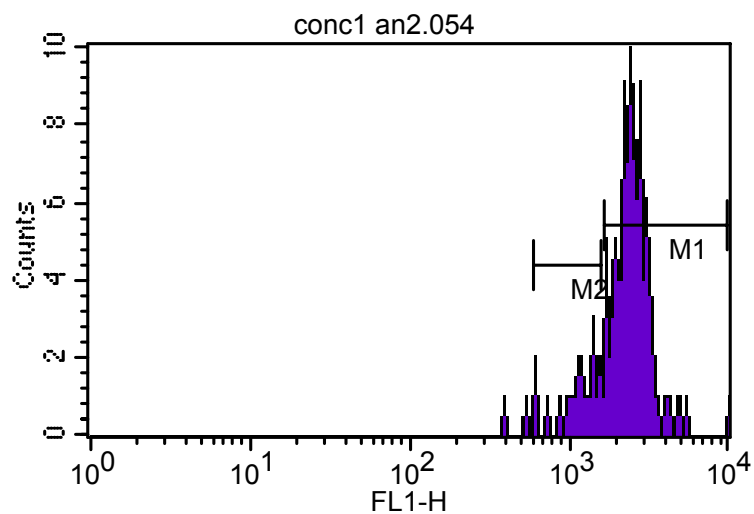


Gráfico 5.6 – Histograma da fluorescência do CFSE (diacetato de carboxifluoresceína) dos linfócitos do sangue periférico eqüino após cultura de 72h a 5% de CO_2 e 37°C com utilização de concanavalina A. M1 e M2 representam os marcadores utilizados para enumerar os eventos em cada ciclo de divisão

Tabela 5.6 – Os valores representam a média \pm desvio-padrão dos resultados de linfoproliferação realizado com amostras de sangue coletadas dos animais do grupo II (16 a 30) nos momentos identificados como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo II	8d antes	0d corrida	1d após	5d após	significância
Linfoproliferação	30,9 \pm 4,0 a	28,4 \pm 4,5 a	29,8 \pm 3,3 a	30,8 \pm 3,6 a	p>0,2

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significante entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida

5.3 HEMOGRAMA

Os dados de hemograma encontrados nos momentos estabelecidos para a coleta de amostras do grupo II (animais de 16 a 30) foram reunidos na tabela 5.7.

Foram encontrados valores aumentados em relação ao número percentual de neutrófilos no momento imediatamente após a corrida quando foi realizada comparação com os demais momentos (Gráfico 5.7).

Quanto aos valores do número percentual de linfócitos, encontraram-se aumentados no momento cinco dias após a corrida, quando comparados aos outros (Gráfico 5.8).

Outros dados que apresentaram diferença significativa entre os valores médios provenientes da coleta de momentos distintos, comparados entre si, foram referentes ao eritrograma, mais especificamente número total de eritrócitos (He);

concentração de hemoglobina (Hb); volume globular (Hct); volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM); e concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC).

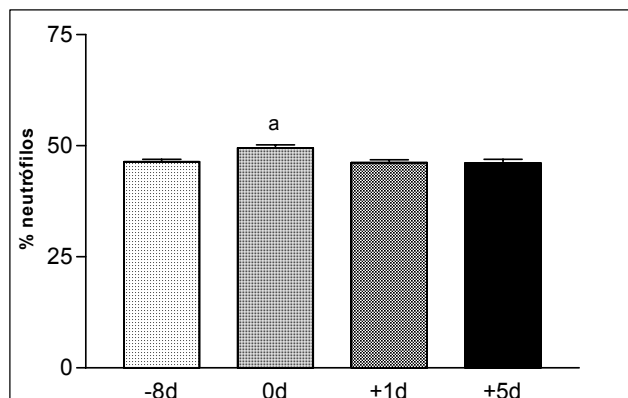


Gráfico 5.7 – Representação dos valores médios referentes à contagem do número relativo (%) de neutrófilos (Nø) nos diferentes momentos de coleta definidos como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

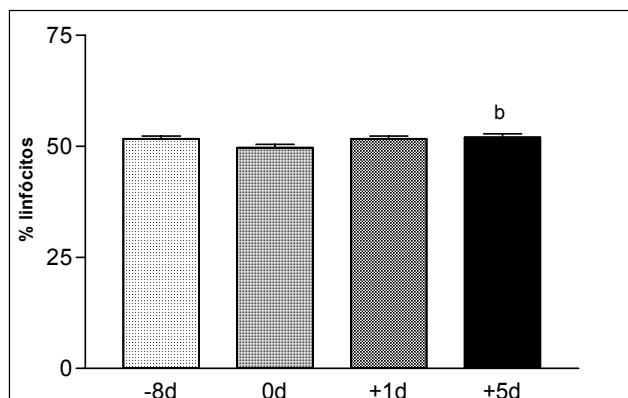


Gráfico 5.8 – Representação dos valores médios referentes à contagem do número relativo (%) de linfócitos (Lø) nos diferentes momentos de coleta definidos como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

Tabela 5.7 – Valores representam a média \pm o desvio-padrão dos resultados do hemograma dos eqüinos que participaram do estudo: contagem do número total de leucócitos (Leu); contagem do número relativo (%) de neutrófilos (NØ); contagem do número relativo (%) linfócitos (LØ); contagem do número relativo (%) monócitos (MØ); contagem do número (%) eosinófilos (EØ); contagem do número relativo (%) basófilos (BØ); número total de eritrócitos (He); concentração de hemoglobina (Hb); volume globular (Hct); volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM); e concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC) nos diferentes momentos de coleta definidos como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo II Hemograma	8d antes	0d corrida	1d após	5d após	significância
Leu (10^3 /mL)	7927 \pm 1389 a	9547 \pm 1640 a	8793 \pm 1677 a	8473 \pm 2253 a	p>0,09
NØ (%)	46,4 \pm 2,3 b	49,5 \pm 2,9 a	46,2 \pm 2,4 b	46,1 \pm 3,3 b	p<0,003
LØ (%)	51,7 \pm 2,4 a	49,7 \pm 2,9 a	51,7 \pm 2,5 a	52,0 \pm 3,2 b	p>0,09
MØ (%)	0,0 a	0,0 a	1,0 a	0,0 a	p>0,2
EØ (%)	1,33 \pm 0,48 a	1,06 \pm 0,26 a	1,33 \pm 0,19 a	1,53 \pm 0,52 a	p>0,06
BØ (%)	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	p>0,2
He ($\times 10^3$)	10378 \pm 643,6 b	13021,3 \pm 1066 a	11231,3 \pm 993,3 b	10658,6 \pm 886,2 b	p<0,0001
Hb (g/ dL)	14,6 \pm 0,8 b	17,5 \pm 1,3 a	15,3 \pm 0,9 b	14,8 \pm 0,9 b	p<0,0001
Hct (%)	43,5 \pm 3,1 b	57,7 \pm 6,7 a	46,7 \pm 3,8 b	44,6 \pm 3,8 b	p<0,0001
VCM	41,9 \pm 0,7 b	44,2 \pm 2,3 a	41,6 \pm 0,7 b	41,8 \pm 0,6 b	p<0,0001
HCM	13,9 \pm 0,2 a	13,5 \pm 0,3 b	13,7 \pm 0,4 ab	13,9 \pm 0,3 a	p<0,001
CHCM	33,3 \pm 0,7 a	30,5 \pm 1,6 b	32,8 \pm 0,6 a	33,3 \pm 0,8 a	p<0,0001

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significante entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida

5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CORTISOL

A tabela 5.8 representa os valores médios e o desvio-padrão dos níveis séricos de cortisol presentes no soro dos animais do grupo I. Os valores médios foram encontrados aumentados no momento imediatamente após a corrida, quando comparados aos valores dos outros momentos (Gráfico 5.9).

A tabela 5.9 mostra os valores de concentração sérica de cortisol obtidos das amostras dos animais do grupo II, nos diferentes momentos de coleta. Também foram encontrados valores médios aumentados nas amostras coletadas imediatamente após a corrida, quando comparados aos demais (Gráfico 5.10).

Tabela 5.8 – Os valores representam a média ± desvio-padrão da concentração sérica de cortisol em amostras de sangue coletadas dos animais do grupo I (1 a 15) nos momentos determinados como 11 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida, 2 dias após a corrida e 3 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo I	11d antes	0d corrida	1d após	2d após	3d após	significância
Cortisol	2,07 ± 0,5 b	8,6 ± 1,9 a	3,6 ± 1,2 b	2,7 ± 1,1 b	2,5 ± 0,6 b	p<0,0001

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida; cortisol expresso em µg/dL

Tabela 5.9 - Os valores representam a média ± desvio-padrão da concentração sérica de cortisol em amostras de sangue coletadas dos animais do grupo II (16 a 30) nos momentos determinados como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

grupo II	8d antes	0d corrida	1d após	5d após	significância
Cortisol	3,7 ± 1,3 b	10,8 ± 1,9 a	3,7 ± 1,0 b	4,5 ± 1,2 b	p<0,0001

¹ Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os resultados, 0d = imediatamente após a corrida; cortisol expresso em µg/dL

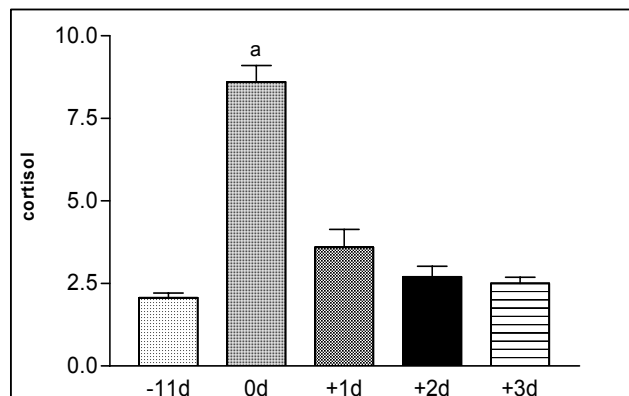


Gráfico 5.9 – Representação dos valores médios de níveis séricos de cortisol das amostras provenientes dos animais do grupo I (1 a 15), encontrados nos diferentes momentos de coleta definidos como 11 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida, 2 dias após a corrida e 3 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

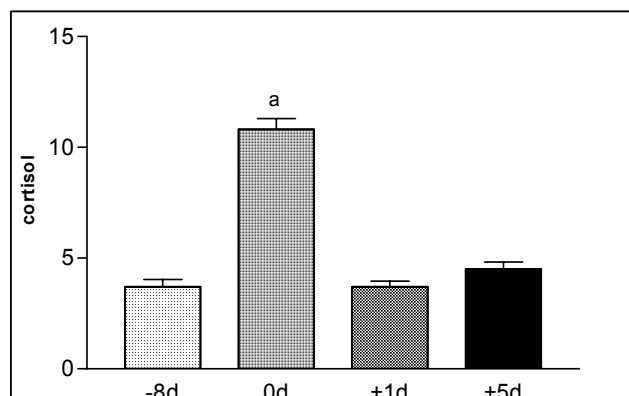


Gráfico 5.10 – Representação dos valores médios de níveis séricos de cortisol das amostras provenientes dos animais do grupo II (16 a 30), encontrados nos diferentes momentos de coleta definidos como 8 dias antes da corrida, imediatamente após a corrida, 1 dia após a corrida e 5 dias após a corrida. Diferença estatística segundo teste de Tukey-Kramer - Beltsville 2003

6 DISCUSSÃO

Os cavalos atletas quando executam um exercício de alta intensidade experimentam algumas situações decorrentes do próprio processo de adaptação fisiológica, induzido pela atividade física. Conhecidas como estresses endógenos, estas situações incluem as mudanças que ocorrem devido ao trabalho das células musculares; o estresse oxidativo gerado pelo metabolismo do oxigênio; as alterações na pressão sangüínea e o estresse mecânico induzido pelo fluxo de ar sobre vasos pulmonares e vias aéreas. Outras situações às quais também estão expostos são as relacionadas aos riscos ambientais, denominadas estresses exógenos (ART; LEKEUX 2005).

Neste trabalho, estas diferentes situações de estresse não foram identificadas, tampouco avaliadas de forma particular, o que se procurou foi verificar a influência do seu conjunto, sobre a função imune *in vitro* de alguns componentes sangüíneos, em determinados momentos da rotina destes cavalos.

Na tentativa de reunir os resultados dos ensaios de fagocitose, *burst* oxidativo e determinação do cortisol sérico, executados com amostras coletadas nos dois grupos de animais, nos diferentes momentos, foi realizada uma análise preliminar através da comparação dos resultados obtidos das amostras coletadas imediatamente após a corrida (momento 0d). Porém, diante do encontro de diferença estatística significativa entre estes dados (teste de Tukey-Kramer; $p < 0,0001$), o agrupamento tornou-se impossível. Isto talvez se deva ao fato de o grupo II constituir um grupo mais coeso em termos de categoria de páreo, uma vez que a maioria dos

animais era participante de páreos classificados como Grande Prêmio, o que significa que apresentavam ao menos uma vitória no seu histórico (Apêndice A).

Mesmo diante do conhecimento de que os programas de treinamento podem minimizar alterações induzidas por alguns estresses endógenos e exógenos, o fato de haver uma ocorrência maior de quadros respiratórios em animais de esporte (BURRELL et al., 1996; CHRISTLEY et al., 2000; WOOD et al., 2005) - quando comparados a animais destinados a outras atividades - sugere que a intensidade do exercício e/ ou o modo de vida a que são submetidos possam afetar a capacidade de resistência destes cavalos aos microrganismos, em determinados momentos.

Para entender o que ocorre com o metabolismo de um cavalo durante a execução de um exercício e tentar encontrar seu vínculo com a função imune, é providencial que se visualize a seqüência de organização responsável pela manutenção da vida. É interessante que se tenha em mente o conjunto das inúmeras células, que se reúne em tecidos, que, por sua vez, estruturam-se em órgãos especializados e exigem uma grande integração, em níveis bioquímicos, entre moléculas efetoras e receptores.

A visão tradicional da regulação do sistema imune destaca os fatores moleculares e celulares dentro do próprio sistema como os moduladores principais da função imune e da doença. Entretanto, um número enorme de evidências indica que fatores externos ao sistema imune, como hormônios, neuropeptídeos e neurotransmissores, derivados do sistema endócrino e nervoso desempenham um papel fisiológico importante em todos os níveis da regulação da função imune. Esta modulação externa é determinante na condição de suscetibilidade e resistência às doenças infecciosas. Da mesma forma, fatores imunológicos regulam o sistema nervoso, desde o âmbito molecular até o sistema como um todo (PAUL, 2003).

O controle do sistema nervoso sobre o sistema imune acontece em vários planos, através de diferentes rotas anatômicas e moléculas. Em conjunto, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema nervoso simpático (SNS) regulam o sistema imune através dos efeitos de neuormônios, neuropeptídeos e neurotransmissores, mediados por receptores. Outros componentes do sistema nervoso – inclusive o sistema nervoso parassimpático e o sistema nervoso periférico – também fornecem uma regulação do sistema imune, através de mecanismos similares, mediados por receptores, em uma esfera regional (STERNBERG, 1997).

Durante um exercício de alta intensidade, com o objetivo de acomodar o grande aumento que acontece na demanda de energia e oxigênio para o trabalho muscular e permitir a dissipação de produtos do metabolismo e do calor, ocorrem diversos processos iniciados e controlados por fatores neurais, hormônios, condição de hipóxia e peptídeos vasoativos liberados pelos músculos (HYYPÄ, 2005). Os músculos esqueléticos necessitam aumentar o aporte de glicose e ácidos graxos livres para gerar adenosina 5'trifosfato (ATP) e rapidamente repor a reserva de glicogênio. A concentração de ATP nos músculos estriados, só é capaz de fornecer energia para um segundo ou dois, de atividade muscular intensa. Um reservatório adicional de energia é constituído por fosfocreatina (FC), presente em concentrações três a cinco vezes maiores que as do ATP. Este suprimento imediato de energia, denominado sistema ATP-FC, é suficiente para esforços máximos e pouco duradouros, de seis a oito segundos e sua utilização é um processo estritamente anaeróbico (EATON, 1994; MARZZOCO; TORRES, 1999).

A continuidade do trabalho muscular exige energia derivada de outras fontes. O próximo suprimento é fornecido pelo glicogênio muscular, cuja degradação é estimulada pela liberação de Ca^{2+} - que desencadeia a contração - ou por

adrenalina, que tem seus níveis aumentados durante o exercício. A energia desta fase provém da degradação da glicose, originada do glicogênio, com produção de lactato. Esta via, denominada glicólise anaeróbica, é utilizada para exercícios intensos com duração de um a dois minutos (EATON, 1994; MARZZOCO; TORRES, 1999).

Assim, o exercício de intensidade máxima requer uma contribuição substancial das vias bioenergéticas anaeróbicas, embora, de acordo com sua duração, grande parte da energia possa ser fornecida por meios aeróbicos (EATON, 1994; HODGSON; ROSE 1994).

No caso dos cavalos utilizados neste estudo, os páreos dos quais participaram, tiveram variação na distância entre 1.400 e 2.400 m, faixa em que se considera haver uma combinação de fornecimento energético anaeróbico e aeróbico (EATON, 1994). O tempo médio de duração dos páreos de 1.400 m foi 1'25"403, enquanto os páreos de 2.400 m duraram, em média, 2'29"595 (Apêndice A).

À medida que os sistemas respiratório e circulatório são ativados, a contribuição da glicólise anaeróbica é substituída pela oxidação aeróbica. Paralelamente, o fornecimento de ácidos graxos para o sistema muscular aumenta, em virtude da ação da adrenalina (MARZZOCO; TORRES, 1999) e da interleucina-6 (IL-6) (BRUUNSGAARD, 2005) sobre o tecido adiposo.

Uma melhora na liberação do oxigênio para o trabalho muscular é feita através da ativação do sistema nervoso simpático e do eixo HPA. Há um aumento rápido na circulação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), adrenalina, noradrenalina e cortisol (HYYPÄ, 2005).

Na ativação do eixo HPA, os hormônios glicocorticóides constituem as moléculas efetoras finais, que, de forma geral, quando liberadas, têm como principal

efeito, durante o exercício, aumentar a gliconeogênese hepática e induzir a lipólise, para prover combustível a um exercício submáximo prolongado (IRVINE, 1983). Estes hormônios, no entanto, funcionam como uma retroalimentação negativa do sistema imune, ou seja, suprimem sua função (PAUL, 2003).

Os níveis de cortisol sérico, de fato, aparecem aumentados nas amostras obtidas dos dois grupos de cavalos estudados, coletadas logo após a corrida, quando comparados aos resultados das amostras coletadas nos outros momentos (Tabelas 5.8 e 5.9 e Gráficos 5.9 e 5.10). Ocasão que coincide com uma queda na função dos neutrófilos, que sugere que, dentro do intervalo em que as amostras foram coletadas, este tenha sido de fato o momento de maior estresse para os animais (Tabelas 5.1 e 5.2 e Gráficos 5.2.A, 5.2.B, 5.2.C, 5.2.D, 5.2.E e 5.2.F).

Os níveis fisiológicos destes hormônios são controlados através da secreção de uma cascata de hormônios, que é iniciada pela secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) dos núcleos paraventriculares do hipotálamo. O CRH é o principal hormônio de estresse do sistema nervoso central e os neurônios dos núcleos paraventriculares estão intimamente conectados a muitos outros centros de estresse do cérebro, inclusive o sistema noradrenérgico do tronco cerebral. Estes centros recebem sinais de todas as partes do cérebro. Ou seja, através destes trajetos, os níveis de glicocorticóides estão relacionados com flutuações de estímulos ambientais, físicos, psicológicos e fisiológicos (Anexo B). Os efeitos dos hormônios glicocorticóides na imunidade ocorrem através das interações destas substâncias com receptores hormonais intracelulares e do estímulo da síntese de proteínas específicas (PAUL, 2003) (Anexo C).

Em concentrações aumentadas, denominadas farmacológicas, que podem ocorrer naturalmente ou por administração artificial, os glicocorticóides suprimem

tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa; enquanto, em concentrações fisiológicas, não são totalmente imunossupressores, ao invés disto, há uma troca no padrão das respostas imunes. Os efeitos resultantes na imunidade incluem supressão de imunidade humoral e celular, com supressão de produção de anticorpos frente a uma imunização e hipersensibilidade do tipo tardia. Além disso, os glicocorticóides afetam o tráfego de células do sistema imune através de efeitos sobre a permeabilidade vascular, quimiotaxia e expressão de moléculas de adesão. Ainda, alteram a ativação das células do sistema imune, sua diferenciação, sua maturação e têm influência no mecanismo de apoptose (PAUL, 2003).

Embora não se tenha realizado dosagem de citocinas neste trabalho, uma vez que as células do sistema imune utilizam estas moléculas como forma de comunicação, vale ressaltar que os glicocorticóides também influenciam a produção destas proteínas biologicamente ativas. Em geral, regulam de forma positiva as citocinas anti-inflamatórias, e, de forma negativa, as citocinas pró-inflamatórias; ou seja, estimulam interleucina-4 e interleucina-10 (IL-4 e IL-10), e suprimem interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6, interleucina-8, interleucina-11, interleucina-12, fator de necrose tumoral- α , interferon- γ e fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF- α , IFN- γ , e GM-CSF). Estes efeitos são mediados principalmente pela repressão da transcrição do fator nuclear de transcrição que, nos linfócitos B, controla a expressão das cadeias kappa (κ) para formação das moléculas de imunoglobulinas (NF κ B) (BALDWIN, 1996; GHOSH et al., 1998; MCKAY; CIDLOWSKI, 2000).

Ainda, quando se faz referência a citocinas, é importante destacar o papel fundamental exercido pelas citocinas pleiomórficas, que funcionam não somente como sinalizadores para a função imune, mas também como reguladores do sistema

endócrino, do metabolismo, do sistema de coagulação e da função cerebral (FEBBRAIO; PEDERSEN 2002). Os níveis de citocinas circulantes *in vivo* são influenciados de forma significativa por contribuições provenientes de células que não pertencem ao sistema imune, como adipócitos, células musculares esqueléticas e células endoteliais (MOHAMED-ALI et al., 1997). Ao lado da descoberta do tecido adiposo como um importante órgão endócrino (GUERRE-MILLO, 2004; KERSHAW; FLIER, 2004), foi demonstrado que durante o trabalho muscular, o músculo esquelético produz e libera citocinas para a circulação (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002).

Quando da realização de um exercício de alta intensidade, em um curto período de tempo, os níveis plasmáticos de IL-6 aumentam exponencialmente - cerca de cem vezes - de forma imediata e independentemente da ocorrência de lesões musculares, com declínio total no período pós-exercício. O aumento de IL-6 é decorrente da contração muscular. As evidências que dão suporte à hipótese de que o músculo esquelético é a principal fonte de IL-6 durante o exercício não-traumático constituem-se no encontro de níveis aumentados de transcrição, de RNA-mensageiro e destas proteínas dentro das fibras musculares. Pequenas quantidades de IL-6 podem ser produzidas pelo tecido adiposo, pelo cérebro e pelo tecido peritendíneo, de forma concomitante. A resposta de IL-6 é seguida de elevações nos níveis de marcadores inflamatórios na resposta de fase aguda. Assim, a atividade física está associada a uma resposta sistêmica de citocinas, comparável aos níveis observados durante infecções graves, que difere, porém, em relação aos níveis de $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ da resposta clássica de fase aguda encontrada em infecções sistêmicas. Estas citocinas, quando presentes, encontram-se em concentrações mínimas em modelos de exercício não-traumático (BRUUNSGAARD, 2005).

A IL-6 funciona como um sensor energético no músculo, é liberada quando o conteúdo local de glicogênio está baixo, portanto é possível que grandes quantidades de IL-6 derivadas dos músculos ajam na circulação como hormônios, com o objetivo de mobilizar substrato extracelular e/ ou aumentar substrato liberado durante o exercício (PEDERSEN et al., 2003). A IL-6 induz um aumento da lipólise e oxidação de lipídeos sem causar triacilglicerolemia, segundo trabalhos experimentais realizado em seres humanos (PEDERSEN et al., 2005; VAN HALL et al., 2003). A expressão de RNA-m de IL-6, induzida pelo exercício, no tecido adiposo é mais pronunciada no período de recuperação, mas não mostra a mesma relação aumentada como no músculo esquelético durante a atividade física e esta resposta é menor conforme há ingestão de carboidrato (KELLER et al., 2003). Existe também a sugestão de que a IL-6 influencie a homeostase da glicose durante o exercício de alta intensidade, o que implica em um novo entendimento do papel da IL-6 na produção de glicose e seu *clearance* (BRUUNSGAARD, 2005).

A IL-6 pode ativar uma proteína denominada proteína-quinase A que é ativada por adenosina monofosfato (daí sua abreviação, AMPK) no tecido muscular e adiposo, ou seja, a IL-6 contribui para um aumento da atividade da AMPK nestes tecidos em resposta ao exercício. Esta ativação, que pode decorrer de mudanças no estado de energia da célula ou pela exposição a hormônios como adiponectina, leptina e catecolaminas, estimula vários processos que aumentam a geração de ATP, que incluem a oxidação de ácidos graxos, o transporte de glicose no músculo cardíaco e no músculo esquelético, bem como a glicólise no coração e nos leucócitos. A AMPK é ativada no músculo esquelético durante as contrações, o que tem sido considerado como uma contribuição a muitas das mudanças no

metabolismo do combustível muscular em relação à atividade física (KELLY et al., 2004).

Subseqüentemente à liberação de IL-6, ocorre um aumento de IL-10 e IL-1Ra na circulação em relação ao exercício (OSTROWSKI et al., 1999). Embora IL-6 seja freqüentemente classificada como uma citocina pró-inflamatória, ela também possui efeitos antiinflamatórios e imunossupressivos, conforme ela estimula o eixo hipófise-adrenal, inibe a síntese de TNF- α , estimula a produção de IL-10 e IL-1Ra, e induz a expressão de receptores TNF pelos neutrófilos (TILG et al., 1997). Desta forma, a resposta antiinflamatória, que inclui níveis elevados de IL-10, IL-1Ra, receptores TNF e ativação do eixo hipófise-adrenal, poderia ser elicitada por IL-6 sistêmica, derivada do músculo durante o exercício.

Ainda com relação aos glicocorticóides, a função e a ativação dos neutrófilos, que abrange quimiotaxia, adesão, transmigração, apoptose e fagocitose também podem ser influenciadas (GOULDING et al., 1998). Efeito demonstrado nos dois grupos de animais deste estudo, tanto em relação à porcentagem de fagocitose, quanto à intensidade deste processo, ao se considerar quantas partículas de bactéria foram fagocitadas pelas células, de forma individual (Tabelas 5.1 e 5.2 e Gráficos 5.2.A, 5.2.B, 5.2.C e 5.2.D). Embora estes efeitos possam ocorrer através da regulação de muitas citocinas, a lipocortina-1 ou anexina-1 - molécula antiinflamatória que é expressa em células do sistema imune e do sistema neuroendócrino - tem um papel importante sobre os neutrófilos. Doses farmacológicas ou de estresse suprimem a ativação e a migração dos neutrófilos, enquanto aumentam seu número através da inibição de apoptose (PAUL, 2003).

Um aumento do número relativo de neutrófilos foi verificado nas amostras coletadas imediatamente após a corrida através do hemograma (Tabela e Gráfico

5.7). Segundo alguns trabalhos, um aumento inicial ocorre principalmente devido à mobilização de neutrófilos segmentados marginados, induzida pela liberação de catecolaminas, enquanto um aumento tardio resulta da mobilização de neutrófilos da medula óssea para a circulação, como resultado de uma liberação induzida pelo aumento dos níveis de cortisol plasmático (PYNE, 1994).

Quanto à taxa neutrófilo/ linfócito, que não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação aos outros momentos, embora estivesse um pouco aumentada logo após a corrida, talvez pudesse ser interpretada como um reflexo do *status* de condicionamento dos animais do grupo II, o que só poderia ser confirmado diante da possibilidade de comparação de todos os momentos com um grupo sabidamente menos condicionado.

O exercício, portanto, parece resultar em uma ativação inicial de neutrófilos com uma resposta variável nas funções efetoras, como a atividade fagocítica e a capacidade de *burst* oxidativo, na dependência da intensidade da atividade física praticada (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Após vinte e quatro horas da corrida, a atividade fagocítica dos neutrófilos mostrou valores próximos aos encontrados nas amostras coletadas de onze a nove dias antes do evento, tanto nos cavalos pertencentes ao grupo I quanto nos do grupo II. Já, em relação à atividade de *burst* oxidativo isto só pode ser observado no primeiro grupo.

Estes dados corroboram com resultados, encontrados em um trabalho realizado na espécie humana, em que foi feita a comparação da capacidade oxidativa de neutrófilos de atletas frente a exercícios de atividade moderada e de alta intensidade. Foi encontrada uma diminuição inicial da atividade de neutrófilos nas duas situações, com uma supressão continuada frente ao exercício de alta

intensidade, enquanto frente ao exercício de intensidade moderada ocorria um aumento da capacidade dos neutrófilos em algumas horas pós-exercício (PYNE et al., 1994).

A causa da supressão da função fagocítica é, provavelmente, multifatorial, mas pode ser atribuída em parte ao aumento do cortisol plasmático imediatamente após a corrida. Experimentos *in vitro* demonstraram uma diminuição da mobilização da expressão de receptores para componentes do sistema complemento, CR1 e CR3 (FORSLID; HAD, 1982). Ainda, a função neutrofílica diminuída pode refletir uma maior porcentagem de neutrófilos imaturos vindos da medula óssea para a circulação (PYNE, 1994). Estas células podem ser mais ativas (LEW, 1990), mas com uma capacidade fagocítica e microbicida menor (YANG; HILL, 1991).

Tem sido sugerido também, que os neutrófilos, após terem sido ativados pelo estímulo do exercício, apresentam uma capacidade reduzida de produzir e liberar radicais livres diante de uma estimulação subsequente. Cães anestesiados foram utilizados para testar esta teoria em estudos que examinaram a sobrevivência e a atividade de neutrófilos pré-estimulados *in vitro* e *in vivo*. Os autores concluíram que os neutrófilos pré-estimulados diminuíram sua capacidade de produzir e/ou liberar radicais livres derivados do oxigênio frente a uma subsequente estimulação com zimosan, embora esta atividade fosse gradualmente recuperada com o tempo. Notaram também que os neutrófilos não eram destruídos quando estimulados a liberarem radicais livres derivados do oxigênio (PRASAD et al., 1991).

A possível extrapolação destes dados para o modelo equino pode oferecer alguma reflexão a respeito de como os aumentos observados na incidência e gravidade de quadros respiratórios após períodos de exercício de alta intensidade podem ocorrer. Como se pode notar, a atividade fagocítica pode retornar em pouco

tempo ao normal, no entanto, é prudente imaginar que em uma situação em que os cavalos sejam submetidos a um número maior de sessões de treinamento de alta intensidade, por exemplo, em períodos que antecedem uma prova importante, possa haver uma proporção significativa de seus neutrófilos circulantes sob um estado refratário.

Algo que não deve ser subestimado é que após o início do exercício há um grande incremento na função respiratória. Este evento pode envolver uma ampliação na ventilação de cerca de 100 L/minuto, encontrada em um estado de repouso para 1800 L/minuto durante o exercício de alta intensidade. O fluxo de ar pode representar algo muito maior com a progressão da atividade física (HODGSON; ROSE, 1994), o que acaba por expor em demasia a superfície da mucosa respiratória aos antígenos ambientais. Neste momento, a integridade da função das células da imunidade inata é imprescindível.

Em relação aos linfócitos, uma resposta esperada, frente à execução de um exercício de alta intensidade, é uma supressão da linfoproliferação diante do estímulo por mitógenos. Este resultado não foi encontrado, quando comparado aos outros momentos. Como este ensaio só foi realizado com amostras coletadas dos animais do grupo II, casualmente um grupo em que a maioria era participante de grandes prêmios, este fato poderia ser atribuído ao *status* de treinamento destes animais, como sugerido por alguns autores (FOLSOM, 2001; KEADLE et al., 1993) ou talvez, uma melhor adaptação ao estresse. Esta última suposição foi colocada em referência a um trabalho de investigação dos efeitos do desmame sobre a resposta de estresse psicológico e a resposta proliferativa de linfócitos, tanto das éguas quanto dos potros. Foram utilizados dois protocolos de desmame. Metade dos potros foi desmamada na presença de um companheiro, enquanto a outra metade

permaneceu sozinha. A concentração de cortisol plasmático apresentou-se elevada tanto nas éguas quanto nos potros dos dois grupos. Interessantemente, a imunidade celular encontrava-se deprimida nas éguas e nos potros do grupo que foi desmamado junto a um companheiro. Os potros desmamados sozinhos não apresentaram função imune deprimida, mesmo diante do elevado nível de cortisol sérico. O que os autores concluíram foi que a situação do desmame em pares foi mais estressante (MALINOWSKI et al., 1990).

Cabe aqui um comentário emitido pelos autores de um trabalho sobre os efeitos da corrida sobre a linfoproliferação. No protocolo de coleta, as amostras referidas como anteriores à corrida eram coletadas na manhã anterior ao dia da corrida ou na manhã do próprio dia da corrida. Algumas amostras coletadas na manhã em que seria realizada a corrida foram excluídas pelo fato de apresentarem valores aumentados de cortisol horas antes do início da prova, atribuídos ao estresse psicológico (NESSE et al., 2002).

Quanto ao número de células apoptóticas, neste trabalho, não houve diferença estatística entre os valores encontrados, muito provavelmente por não ter ocorrido grandes danos às células, o que pode sugerir que os animais tenham alcançado um bom estado de condicionamento frente ao estresse. O ensaio de apoptose que foi realizado é considerado bastante sensível na medida em que a anexina V é um marcador precoce de células apoptóticas, que se liga à fosfatidilserina exposta na superfície destas células (KOOPMAN et al., 1994).

Os mecanismos responsáveis pelo processo de apoptose relacionado ao exercício ainda são desconhecidos. As mudanças metabólicas e hormonais têm sido reportadas como indutoras de apoptose em experimentos *in vitro*. A alteração na concentração de cálcio citosólico, que ocorre durante o exercício, também pode

representar uma via de deflagração de apoptose (MOOREN et al., 2002). As modificações que acontecem no estado de óxido-redução podem significar um outro caminho importante (KO et al., 2000). Há também evidências que o processo de apoptose possa ser induzido por uma via alternativa, durante o exercício, como mudanças na expressão do receptor CD95 (Fas/ APO-1) (MOOREN et al., 2002).

A geração de radicais livres e espécies reativas do oxigênio aumentam durante o exercício e parece haver uma ponte entre a liberação de espécies reativas do oxigênio e os sinais de cálcio na indução de apoptose (KO et al., 2000).

O treinamento promove um aumento da expressão de mecanismos que degradam radicais, portanto diminuem o dano celular induzido pelo exercício (UMEGAKI et al., 1998).

No que se refere à série eritrocítica, o encontro de valores aumentados foi condizente com os dados encontrados na literatura. Diante da exigência do trabalho muscular, o cavalo libera na circulação, eritrócitos armazenados em seu baço, de maneira substancial. Esta reserva é tal que a concentração de oxigênio sangüíneo pode aumentar de cerca de 180 mL/L ao repouso para 280 mL/L em resposta a um exercício máximo, que está associada com um aumento no hematócrito de cerca de 0,40 L/L ao repouso para mais de 0,60 L/L no exercício máximo (ART; LEKEUX, 2005; HODGSON; ROSE, 1994).

Diante de cavalos condicionados, alguns efeitos decorrentes do treinamento já comprovados devem ser considerados, como as adaptações de natureza anabólica - a massa protéica muscular aumenta como um resultado do treinamento - e variações no padrão enzimático. Os mecanismos envolvidos nestes efeitos do treinamento ainda não são bem compreendidos. Parece haver o envolvimento de mecanismos neuroendócrinos tanto na resposta a exercícios agudos quanto nas

adaptações frente a treinamentos crônicos. Devido a efeitos de treinamento sobre os receptores podem ocorrer mudanças representativas nas taxas de secreção hormonal que não são necessariamente requeridas. Alguns estudos têm estabelecido correlação entre respostas endócrinas e efeitos do treinamento em cavalos, com alguns resultados conflitantes (HYYPPÄ, 2005).

É de se esperar, portanto, que haja adaptações frente ao treinamento que atinjam a função imune, no entanto, o tipo de adaptação ainda não foi elucidado devido, principalmente, à dificuldade de comparação e interpretação dos diferentes protocolos de estudo. Desta forma, existem mais questões que respostas quando se tenta explicar a influência do exercício sobre o sistema imune. Além das várias rotas bioquímicas que deverão ser descobertas para tal entendimento, não se pode esquecer da interferência dos fatores genéticos e de diferenças no tipo e intensidade de exercício utilizados no treinamento.

Na realidade, o que se conhece são partes de uma grande rede que conecta o sistema nervoso, o sistema endócrino e o sistema imune. Dentro destas interações, o estudo da fisiologia do exercício aparece como uma área bastante interessante e desafiante. Não se sabe afirmar a respeito de uma frequência ou intensidade ótima, da duração ideal do treinamento para se encontrar um melhor desempenho; nem mesmo sobre os requerimentos nutricionais ideais para se otimizar a performance atlética.

Nos cavalos estudados, ainda que tenha sido encontrada uma diminuição transitória na função dos neutrófilos, a função adaptativa não chegou a ser acometida. De acordo com o médico veterinário responsável, estes animais não apresentaram sinais clínicos de doença durante a vigência deste estudo. Parece sugerir que, embora se constitua em um exercício de alta intensidade, talvez a

fugacidade da corrida acabe por evitar danos maiores. Ainda que não tenha sido o propósito do trabalho avaliar o esquema de treinamento dos animais, diante dos resultados obtidos, ele pode ser considerado um modelo validado.

Compete ainda uma sugestão. Diante da observação de que o dia da corrida representa um momento de grande desafio para o cavalo atleta - o que acarreta em uma diminuição da função imune - seria prudente alertar os médicos veterinários responsáveis para a realização de um acompanhamento clínico mais rigoroso destes animais nos dias subseqüentes às provas. Ainda, quanto aos procedimentos de imunização, o ideal seria que fossem executados durante um período cujo número de provas fosse menor, porém frente ao contínuo programa de eventos ao longo do ano, sugere-se que os animais sejam resguardados ao menos por cinco a sete dias após a corrida para tais práticas.

7 CONCLUSÕES

- Ω O aumento do número percentual de neutrófilos, no hemograma, diante da influência do aumento de cortisol sérico, denota a integração dos sistemas neuroendócrino e imune
- Ω A diminuição transitória encontrada na função *in vitro* de neutrófilos através de ensaios de fagocitose e de *burst* oxidativo revela o comprometimento das células da imunidade inata diante da situação de estresse induzida pelo exercício
- Ω A ausência de alteração nos valores de proliferação de linfócitos diante de mitógenos *in vitro* sugere que a imunidade adaptativa não tenha sido afetada
- Ω Da mesma forma, a ausência de encontro de linfócitos em processo de apoptose sugere não ter ocorrido grandes danos às células da imunidade específica
- Ω Os valores encontrados no hemograma, em relação à série eritrocítica demonstram a adaptação dos cavalos frente à exigência do trabalho realizado durante o exercício

REFERÊNCIAS¹

- ADAMSON, E. J.; SLOCOMBE, R. F. Flow cytometric studies of equine phagocytes following strenuous exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 18 p. 37-42, 1995. supplement.
- ALMAWI, W. Y.; MELEMEDJIAN, O. K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 71, p. 9-15, 2002.
- ART, T.; LEKEUX, P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. **Livestock Production Science**, v. 92, p. 101-111, 2005.
- BALDWIN JR, A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 649-683, 1996.
- BARCELLOS, S. **Cavalos de corrida - Uma alegria eterna**, Rio de Janeiro: Ed. Topbooks, 2002. 281 p.
- BESEDOVSKY, H.; DELRAY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; BURRI, R.; HONNEGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science**, v. 221, p. 564-566, 1983.
- BRUUNSGAARD, H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 819-835, 2005.
- BURRELL, M. H.; WOOD, J. L. N.; WHITWELL, K. E.; CHANTER, N.; MACKINTOSH, M. E.; MUMFORD, J. A. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. **Veterinary Record**, v. 139, n. 18, p. 308-313, 1996.
- BUSCHMANN, H.; BAUMANN, M. Alterations of cellular immune response during intensive training of event horses. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 38, n. 2, p. 90-94, 1991.
- CARLSON, G. P.; OCEAN, P. O.; HARROLD, D. Clinicopathologic alterations in normal and exhausted endurance horses. **Theriogenology**, v. 6, p. 93-103, 1976.
- CHEN, J. C.; CHANG, M. L.; MUENCH, M. O. A kinetic study of the murine mixed lymphocyte reaction by 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling. **Journal of Immunological Methods**, v. 279, p. 123-133, 2003.
- CHIARADIA, E.; GAITI, A.; TERRACINA, L.; AVELLINI, L. Effect of submaximal exercise on horse homocysteinaemia: possible implications for immune cells. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 9-14, 2005.
- CHRISTLEY, R. M.; ROSE, R. J.; HODGSON, D. R.; REID, S. W.; EVANS, S.; BAILEY, C.; HODGSON, J. L. Attitudes of Australian veterinarians about the cause and treatment of lower-respiratory-tract disease in racehorses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 149-159, 2000.

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4 ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84p.

- COENEN, M. Exercise and stress: impact on adaptive processes involving water and electrolytes. **Livestock Production Science**, v. 92, p. 131-145, 2005.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795, 1992.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X. GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, p. 1, 1997.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; LI, X.; GONG, J. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. **Methods in Cell Biology**, v. 41, p. 15, 1994.
- EATON, M. D. Energetics and performance. In: HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. **The Athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 49-61.
- ESCRIBANO, B. M.; CASTEJÓN, F. M.; VIVO, R.; AGÜERA, S.; AGÜERA, E. I.; RUBIO, M.D. Nonspecific immune response of peripheral blood neutrophils in two horse breeds (Anglo-Arabian and Spanish-Arabian):response to exercise. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v. 28, p. 145-154, 2005a.
- ESCRIBANO, B. M.; CASTEJÓN, F. M.; VIVO, R.; SANTISTEBAN, R.; AGÜERA, E. I.; RUBIO, M. D. Effects of Training on Phagocytic and Oxidative Metabolism of Peripheral Neutrophils in Horses Exercised in the Aerobic-Anaerobic Transition Area. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 149-158, 2005b.
- FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Muscle-derived interleukin-6 mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB Journal**, v. 16, p. 1335-1347, 2002.
- FERRY, A.; PICARD, F.; DUVALLET, A; WEILL, B.; RIEU, M. Changes in blood leucocyte populations induced by acute maximal and chronic submaximal exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 6, p. 435-442, 1990.
- FIELD, C. J.; GOUGEON, R.; MARLISS, E. B. Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, p. 1089-1097, 1991.
- FOERSTER, R. J.; WOLF, G. Phagocytosis of opsonised fluorescent microspheres by equine polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 37, p. 481-490, 1990.
- FOLSOM, R. W.; LITTLEFIELD-CHABAUD, M. A.; FRENCH, D. D.; POURCIAU, S. S.; MISTRIC, L.; HOROHOV, D. W. Exercise alters the immune response to equine influenza virus and increases susceptibility to infection. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, p. 664-669, 2001.
- FORSLID, J.; HED, J. *In vitro* effect of hydrocortisone on the attachment and ingestion phases of immunoglobulin G- and complement component 3b-mediated phagocytosis by human neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 38, p. 811-816, 1982.
- GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOOP, E. B. NF-kappa B and Re1 proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GIMENEZ, M.; MOHAN-KUMAR, T.; HUMBERT, J. C.; DE TALANCE, N.; BUISINE, J. Leukocyte, lymphocyte and platelet response to dynamic exercise. Duration or intensity effect? **European Journal of Applied Physiology**, v. 55, n. 5, p. 465-470, 1986.

GOLLAND, L. C.; EVANS, D. L.; STONE, G. M.; TYLER-MCGOWAN, C. M.; HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. Plasma cortisol and β -endorphin concentrations in trained and over-trained standardbred racehorses. **European Journal of Physiology**, v. 439, p. 11-17, 1999.

GORCZYCA, W.; MELAMED, M. R.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of apoptosis by flow cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 91, p. 217-238, 1998.

GOULDING, N. J.; EUZGER, H. S.; BUTT, S. K.; PERRETTI, M. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, p. 158-165, 1998. supplement 3.

GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes and Metabolism**, v. 30, p. 13-19, 2004.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, I.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.

HINES, M. T.; SCHOTT II, H. C.; BAYLY, W. M.; LEROUX, A.J. Exercise and immunity: a review with emphasis on the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 5, p. 280-289, 1996.

HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. **The Athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. 497 p.

HOROHOV, D. W. Is exercise bad for the immune system? **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 113-116, 2003.

HOROHOV, D. W.; DIMOCK, A.; GUIRNALDA, P.; FOLSOM, R. W.; McKEEVER, K. H.; MALINOWSKI, K. Effect of exercise on the immune response of young and old horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 643-647, 1999.

HOROHOV, D. W.; KEADLE, T. L.; POURCIAU, S. S.; LITTLEFIELD-CHABAUD, M. A.; KAMERLING, S. G.; KEOWEN, M. L.; FRENCH, D. D.; MELROSE, P. A. Mechanism of exercise-induced augmentation of lymphokine activated killer (LAK) cell activity in the horse. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 53, p. 221-233, 1996.

HYYPPÄ, S. Endocrinal responses in exercising horses. **Livestock Production Science**, v. 92, p. 113-121, 2005.

JMP. **User's guide**. Cary: SAS Institute, 2002.

JOHANNISSON, A.; GRO-NDAHL, G.; DEMMERS, S.; JENSEN-WAERN, M. Flow-cytometric studies on the phagocytic capacities of equine neutrophils. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 36, p. 553-562, 1995.

KEADLE, T. L.; POURCIAU, S. S.; MELROSE, P. A.; KAMERLING, S. G.; HOROHOV, D. W. Acute exercise stress modulates immune function in unfit horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, p. 4-9, 1993.

KEAST, D.; CAMERON, K.; MORTON, A. R. Exercise and the immune response. **Sports Medicine**, v. 5, p. 248-267, 1988.

KELLER, C.; KELLER, P.; MARSHAL, S.; PEDERSEN, B. K. IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise – effect of carbohydrate ingestion. **Journal of Physiology**, v. 550, p. 927-931, 2003.

KELLY, M.; KELLER, C.; AVILUCEA, P. R.; KELLER, P.; LUO, Z.; XIANG, X.; GIRALT, M.; HIDALGO, J.; SAHA, A. K.; PEDERSEN, B. K.; RUDERMAN, N. B. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 449-454, 2004.

KENDALL, A.; HOFFMAN-GOETZ, L.; HOUSTON, M.; MacNEIL, B.; ARUMUGAM, Y. Exercise and blood lymphocyte subset responses: intensity, duration and subject fitness effects. **Journal of Applied Physiology**, v. 69, n. 1, p. 251-260, 1990.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 2548-2556, 2004.

KO, S.; KWORK, T. T.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M.; LEE, C. Y.; KONG, S. K. Slow rise of Ca^{2+} and slow release of reactive oxygen species are two cross-talked events important in tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis. **Free Radical Research**, v. 33, p. 295-304, 2000.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, p. 1415-1420, 1994.

KURCZ, E. V.; LAWRENCE, L. M.; KELLEY, K. W.; MILLER, P. A. The effect of intense exercise on the cell-mediated immune response of horses. **Equine Nutrition and Physiology Society**, v. 8, p. 237-239, 1988.

LASSOURD, V.; GAYRARD, V.; LAROUTE, V.; ALVINERIE, M.; BERNARD, P.; COURTOT, D.; TOUTAIN, P. L. Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. 25-33, 1996.

LEW, P. D. Receptors and intracellular signaling in human neutrophils. **American Review of Respiratory Disease**, v. 141, S127-S131, 1990.

LUNN, D. P.; HUSSEY, S.; SEBING, R.; RUSHLOW, K. E.; RADECKI, S. V.; WHITAKER-DOWLING, P.; YOUNGNER, J. S.; CHAMBERS, T. M.; HOLLAND JR., R. E.; HOROHOV, D. W. Safety, efficacy, and immunogenicity of a modified-live equine influenza virus vaccine in ponies after induction of exercise-induced immunosuppression. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 900-906, 2001.

MACNEIL, B.; HOFFMAN-GOETZ, L.; KENDALL, A.; HOUSTON, M.; ARUMUGAM, Y. Lymphocyte proliferation responses after exercise in men: fitness, intensity and duration effects. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, n. 1, p. 179-185, 1991.

MALINOWSKI, K.; HALLQUIST, N. A.; HELYAR, L.; SHERMAN, A. R.; SCANES, C. G. Effect of different separation protocols between mares and foals on plasma cortisol in cell-mediated immune response. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 10, p. 363-368, 1990.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999. 360 p.

- MCCARTHY, D. A.; DALE, M. M. The leucocytosis of exercise: a review and model. **Sports Medicine**, v. 6, p. 333-363, 1988.
- MCKAY, L. I.; CIDLOWSKI, J. A. CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappa B (nuclear factor-kappa B) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. **Molecular Endocrinology**, v. 14, p. 1222-1234, 2000.
- MOHAMED-ALI, V.; GOODRICK, S.; RAWESH, A.; KATZ, D. R.; MILES, J. M.; YUDKIN, J. S.; KLEIN, S.; COPPACK, S. W. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, p. 4196-4200, 1997.
- MOOREN, F. C.; BLÖMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M. M.; VÖLKER, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, p. 147-153, 2002.
- MOOREN, F. C.; LECHTERMANN, A.; VÖLKER, K. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status, **Medicine & Science in Sports & Exercise** v. 36, p. 1476-1483, 2004.
- NAGATA, S.; TAKEDA, F.; KUROSAWA, M.; MIMA, K.; HIGARA, A.; KAI, M.; TAYA, K. Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines response to various exercises. **Equine Veterinary Journal**, p. 570-574, 1999. supplement 30.
- NESSE, L. L.; JOHANSEN, G. L.; BLOM, A. K. Effects of racing on lymphocyte proliferation in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 528-530, 2002.
- NIEMAN, D. C.; HENSON, D. A.; JOHNSON, R.; LEBECK, L.; DAVIS, J. M.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L. Effects of brief, heavy exertion on circulating lymphocyte subpopulations and proliferative response. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 24, n. 12, p. 1339-1345, 1992.
- NIEMAN, D. C.; JOHANSEN, L. M.; LEE, J. W.; ARABATZIS, K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 30, n. 3, p. 316-328, 1990.
- OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ASP, S.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B. K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **Journal of Physiology**, v. 515, p. 287-291, 1999.
- PAUL, W. E (Ed.). **Fundamental immunology**, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 1701 p.
- PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1055-1081, 2000.
- PEDERSEN, B. K.; STEENSBERG, A.; FISCHER, C.; KELLER, C.; KELLER, P.; PLOMGAARD, P.; FEBBRAIO, M.; SALTIN, B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 24, p. 113-119, 2003.
- PEDERSEN, B. K.; TVEDE, N.; HANSEN, F. R.; ANDERSEN, V.; BENDIX, T.; BENDIXEN, G.; BENDTZEN, K.; GALBO, H.; HAAHR, P. M.; KLARLUND, K. Modulation of natural killer cell activity in peripheral blood by physical exercise. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 27, n. 6, p. 673-678, 1988.

PETERSEN, E. W.; CAREY, A. L.; SACHETTI, M.; STEINBERG, G. R.; MACAULAY, S. L.; FEBBRAIO, M.; PEDERSEN, B. K. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 288, p. E155-E162, 2005.

PIER, G. B.; LYCZAK, J. B.; WETZLER, L. M. **Immunology, Infection, and Immunity**, Washington: ASM Press, 2004. 718 p.

PRASAD, K.; CHAUDHARY, A. K.; KALRA, J. Oxygen-derived free radicals producing activity and survival of activated polymorphonuclear leukocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 103, p. 51-62, 1991.

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

RAIDAL, S. L.; BAILEY, G. D.; LOVE, D. N. The flow cytometric evaluation of phagocytosis by equine peripheral blood neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. **The Veterinary Journal**, v. 156, p. 107-116, 1998.

RAIDAL, S. L.; LOVE, D. N.; BAILEY, G. D.; ROSE, R. J. Effect of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. **Research in Veterinary Science**, v. 68, p. 141-6, 2000.

REICHE, E. M. V.; NUNES, S. O. V.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **The Lancet**, v. 5, p. 617-625, 2004.

ROBSON, P.; ALSTON, T.; MYBURGH, K. Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80 km endurance race. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 133-137, 2003.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. Haematological and plasma biochemical parameters in endurance horses during training. **Equine Veterinary Journal**, v. 14, p. 144-148, 1982.

ROSSDALE, P. D.; BURGUEZ, P. N.; CASH, R. S. Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 14, n. 4, p. 293-298, 1982.

SNOW, D. H.; RICKETTS, S. W.; MASON, D. K. Haematological response to racing and training exercise in Thoroughbred horses, with particular reference to the leucocyte response. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 2, p. 149-154, 1983.

SNOW, D. H.; ROSE, R. Hormonal changes associated with long distance exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 13, p. 195-197, 1981.

STERNBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2641-2647, 1997.

TARRANT, J. M. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 278-288, 2005

TILG, H.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunology Today**, v. 18, p. 428-432, 1997.

UMEGAKI, K.; HIGUCHI, M.; INOUE, K.; ESASHI, T. Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. **International Journal of Sports Medicine**, v. 19, p. 581-585, 1998.

- VAN HALL, G.; STEENSBERG, A.; SACHETTI, M.; FISCHER, C.; KELLER, C.; SCHJERLING, P.; HISCOCK, N.; MOLLER, K.; SALTIN, B.; FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 3005-3010, 2003.
- VERMES, I.; HAANEN, C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 31, p. 177, 1994.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTSLINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.
- WANG, J. S.; HUANG, Y. H. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, p. 290-297, 2005.
- WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 125-163, 2002.
- WONG, C. W.; SMITH, S. E.; THONG, Y. H.; OPDEBEECK, J. P.; THORNTON, J. R. Effects of exercise stress on various immune functions in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 1414-1417, 1992.
- WONG, C. W.; THOMPSON, H. L.; THONG, Y. H.; THORNTON, J. R. Effect of strenuous exercise stress on chemiluminescence response of equine alveolar macrophages. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 33-35, 1990.
- WOOD, J. L. N.; NEWTON, J. R.; CHANTER, N.; MUMFORD, J. A. Association between respiratory diseases and bacterial and viral infections in British racehorses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.1, p. 120-126, 2005.
- WOODS, J. A.; DAVIS, J. M.; SMITH, J. A.; NIEMAN, D. C. Exercise and cellular innate immune function. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 31, p. 57-66, 1999.
- YANG, K. D.; HILL, H. R. Neutrophil function disorders: pathophysiology, prevention, and therapy. **Journal of Pediatrics**, v. 119, p. 343-354, 1991.
- ZOLOVICK, A.; UPSON, D. W.; ELEFThERIOU, B. E. Diurnal variation in plasma gluco-corticosteroid levels in the horse (*Equus caballus*). **Journal of Endocrinology**, v. 35, n. 3, p. 249-253, 1966.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados dos animais quanto a sexo, idade (em anos), distância da corrida (em metros), tipo de pista, categoria do páreo, colocação do animal na chegada, dia do evento e tipo de treinamento a que o animal foi submetido

animais	sexo	idade	distância	tipo	categoria do páreo	colocação	data do evento	treinamento
1.	F	2	1.400	grama	potrancas de 2 anos sem vitória	7 ^o	02/05/04	A*
2.	M	4	1.600	areia	produtos de 3 anos ou mais	5 ^o	02/05/04	A**
3.	F	3	1.400	grama	potrancas de 3 anos sem vitória	8 ^o	02/05/04	A
4.	F	3	1.800	grama	² misto	3 ^o	16/05/04	A
5.	M	4	1.600	grama	Grande Prêmio (produtos de 3 anos ou mais)	12 ^o	16/05/04	A
6.	M	3	2.400	grama	Grande Prêmio (produtos de 3 anos ou mais)	2 ^o	16/05/04	A
7.	F	3	1.800	grama	potrancas de 3 anos sem mais de 1 vitória	10 ^o	16/05/04	A
8.	F	3	1.800	grama	potrancas de 3 anos sem mais de 1 vitória	9 ^o	16/05/04	A
9.	M	4	1.500	areia	³ produtos de 4 a 6 anos	2 ^o	12/06/04	A
10.	M	5	1.600	areia	⁴ misto	7 ^o	12/06/04	A*
11.	M	2	1.500	grama	produtos de 2 anos s/ vitória	2 ^o	13/06/04	A
12.	M	3	1.400	areia	produtos de 3 anos s/ vitória	2 ^o	18/06/04	A*
13.	F	5	2.000	areia	Grande Prêmio (produtos de 4 anos ou mais)	4 ^o	18/06/04	A
14.	F	3	1.500	grama	potrancas de 3 anos s/ vitória	2 ^o	18/06/04	A*
15.	F	3	1.500	grama	potrancas de 3 anos s/ vitória	1 ^o	18/06/04	A
16.	M	5	1.400	grama	produtos de 4 anos ou mais	1 ^o	27/08/05	A*
17.	F	3	1.400	grama	potrancas de 3 anos com até 1 vitória	4 ^o	27/08/05	A**
18.	F	3	1.400	grama	potrancas de 3 anos s/ vitória	7 ^o	27/08/05	A*
19.	M	3	1.400	grama	produtos de 3 anos s/ vitória	7 ^o	28/08/05	A
20.	M	3	1.600	grama	Grande Prêmio (produtos de 3 anos)	3 ^o	03/09/05	A
21.	M	3	1.600	grama	Grande Prêmio (produtos de 3 anos)	4 ^o	03/09/05	A
22.	M	5	2.400	areia	Grande Prêmio (produtos de 4 anos ou mais)	5 ^o	04/09/05	A
23.	M	4	2.400	areia	Grande Prêmio (produtos de 4 anos ou mais)	1 ^o	04/09/05	A
24.	M	6	2.400	areia	Grande Prêmio (produtos de 4 anos ou mais)	6 ^o	04/09/05	A*
25.	F	3	2.000	grama	produtos de 3 anos com até 1 vitória	8 ^o	08/10/05	A
26.	F	3	2.000	grama	Grande Prêmio (potrancas de 3 anos)	4 ^o	08/10/05	A
27.	M	4	2.400	grama	Grande Prêmio (produtos de 4 anos ou mais)	3 ^o	08/10/05	A
28.	M	3	2.000	grama	Grande Prêmio (produtos de 3 anos)	10 ^o	08/10/05	A
29.	M	3	2.000	grama	Grande Prêmio (produtos de 3 anos)	3 ^o	08/10/05	A
30.	M	4	2.400	grama	Grande Prêmio (produtos de 4 anos ou mais)	9 ^o	08/10/05	A

Fonte: Programas Oficiais das corridas do Hipódromo Paulistano – JCSP – Cidade Jardim, nas datas referidas

Variação do tempo médio de corrida (em minutos): de 1'25"403 (nos páreos de 1.400 m) a 2'29"595 (nos páreos de 2.400 m)

1: sistemas de treinamento esquematizados no APÊNDICE B (A, A* e A**)

2: éguas de 3 anos s/ mais de 3 vitórias, de 4 anos s/ mais de 4 vitórias, de 5 anos s/ mais de 6 vitórias, de 6 anos s/ mais de 8 vitórias e de 7 anos s/ mais de 9 vitórias

3: produtos de mais de 4 anos s/ de 1 vitória, de 5 anos s/ mais de 2 vitórias e de 6 anos s/ mais de 4 vitórias

4: produtos de 3 anos s/ mais de 2 vitórias, 4 anos s/ mais de 3 vitórias, de 5 anos s/ mais de 5 vitórias, de 6 anos s/ mais de 7 vitórias e mais anos s/ mais de 8 vitórias

APÊNDICE B – Módulos de Treinamento A, A* e A**

MÓDULO DE TREINAMENTO – A (Sistema tradicional de treinamento para cavalos PSI no Brasil) – A

1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28






	Períodos de repouso de exercício na raia
	Exercícios diários matinais (passo, trote e galope suaves)
	Apronto de velocidade (metade da distância da corrida)
	Trabalho forte de distância (distância da corrida)
	Corrida

Figura A1 – Esquema do módulo de treinamento disposto em vinte e oito dias

MÓDULO DE TREINAMENTO - A*

A diferença em relação ao treinamento A é que os “aprontos de velocidade”, exercícios fortes, não são realizados.

MÓDULO DE TREINAMENTO - A**

A diferença básica com o treinamento A é que o exercício forte de distância é conduzido em sessão única, 14 dias antes da corrida, e o “apronto de velocidade” é também conduzido em sessão única, sete dias antes da corrida. Neste grupo, aos exercícios diários matinais, esporadicamente, são acrescentadas sessões diárias de natação em piscina hípica, em distâncias de 50 a 500m.

Diante da similaridade entre os tipos de treinamento e do pequeno número de animais pertencentes aos treinamentos A* e A**, em relação ao treinamento A, esta diferença não foi considerada na apresentação dos resultados.

ANEXOS

ANEXO A - CITOMETRIA DE FLUXO

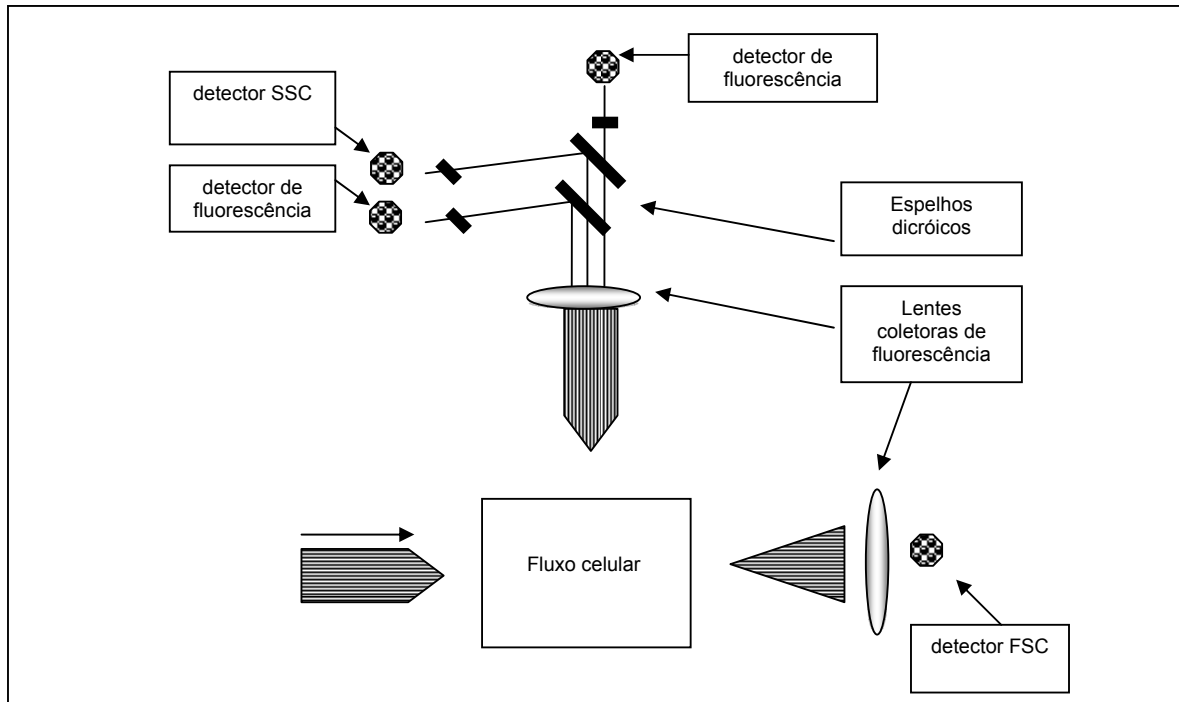


Figura A2 - Esquema da citometria de fluxo (TARRANT et al. 2005). As células são atravessadas pelo laser no fluxo celular. A luz dispersa é coletada por detectores posicionados em diferentes angulações, menores (forward scatter, FSC) e maiores (side scatter, SSC) que mensuram as propriedades físicas da célula, respectivamente, tamanho e granulosidade/ complexidade da célula

ANEXO B - INTERAÇÕES ENTRE SISTEMA NERVOSO, SISTEMA ENDÓCRINO E SISTEMA IMUNE

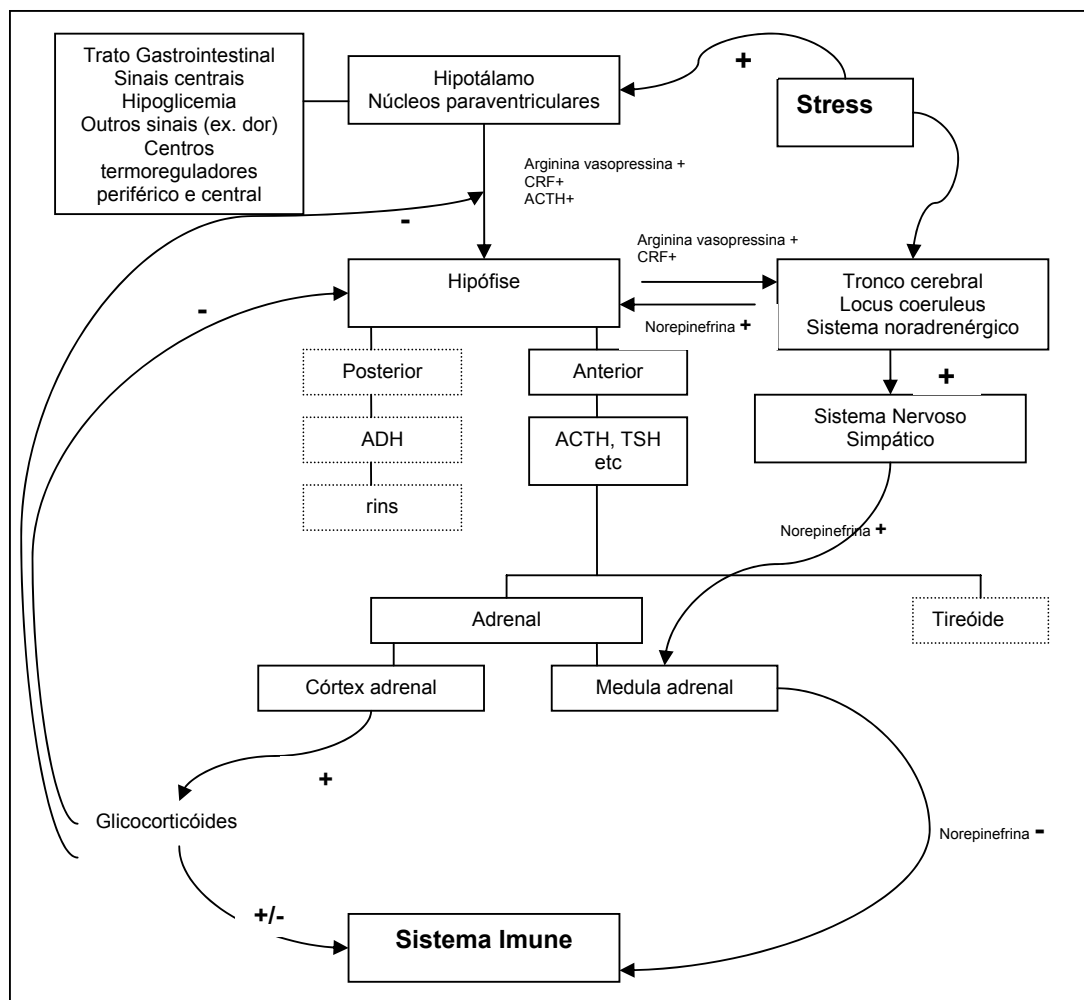


Figura A3 - Interações entre sistema nervoso, sistema endócrino e sistema imune. ADH hormônio antidiurético; ACTH hormônio corticotrófico; CRF hormônio liberador de corticotrofina; TSH hormônio estimulante da tireóide. Adaptado de REICH et al. 2004 e COENEN 2005

Várias condições que rompem o equilíbrio metabólico, induzem a uma resposta endócrina. Sinais gerados pelo trato gastrointestinal ou pelo tecido nervoso central estimulam a comunicação com a glândula hipófise. O estresse mental dispara o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de forma bastante eficiente –fenômeno descrito em animais selvagens – mas pode resultar em doença ou morte, principalmente devido a uma depressão da competência imune. O mesmo princípio é aplicado quando o estresse

metabólico é induzido, como ocorre durante o exercício. Várias condições, que incluem o aumento do requerimento de energia e a diminuição do suprimento energético durante um determinado período de tempo, são caracterizados por um aumento dos níveis de cortisol (COENEN 2005). O controle da concentração dos hormônios glicocorticóides é feito através da secreção de uma cascata de hormônios iniciada pela secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, dentro do sistema de vasos porta-hipofisário, o que resulta na secreção de hormônio adreno-corticotrófico (ACTH) da glândula hipófise, na sua porção anterior, e estimula a secreção de cortisol do córtex da supra-renal. Os neurônios dos núcleos paraventriculares estão intimamente conectados a muitos outros centros de estresse do cérebro, inclusive o sistema noradrenérgico do tronco cerebral. Estes centros recebem sinais de todas as partes do cérebro (PAUL 2003).

ANEXO C - LIGAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES A SEUS RECEPTORES INTRACELULARES

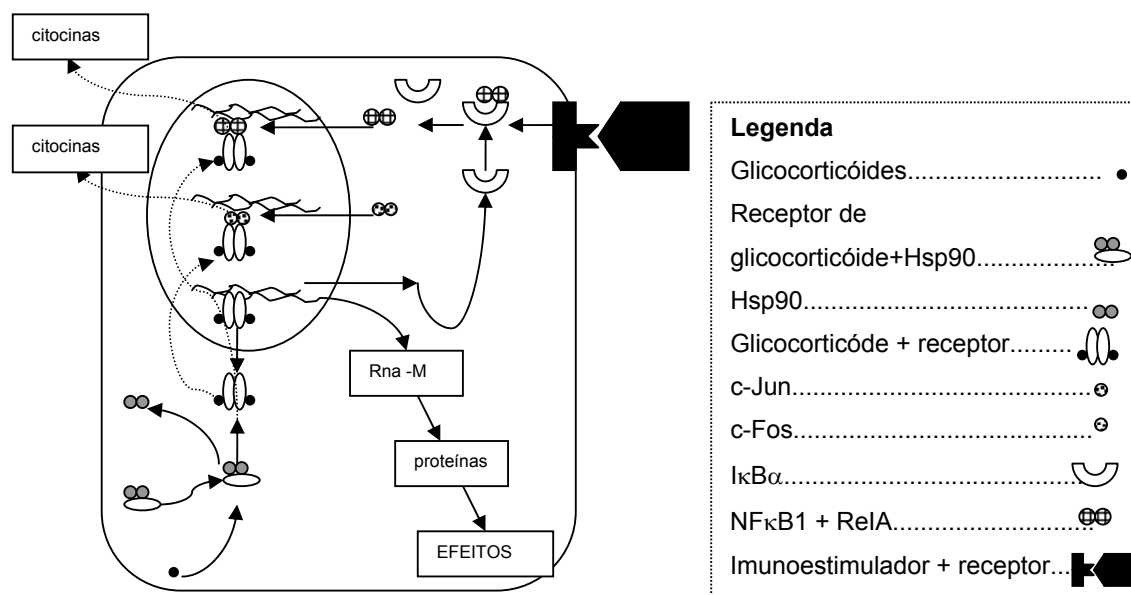


Figura A4 - Diagrama esquemático dos mecanismos moleculares dos efeitos de glicocorticóides sobre a função da célula imune. Adaptado de WEBSTER et al. 2002 apud PAUL 1003. Hsp90 (heat shock protein); IκBα inibidor de NFκB1; NFκB1 fator nuclear de transcrição que controla a expressão de cadeias κ das imunoglobulinas nos linfócitos B

Os receptores dos glicocorticóides são proteínas intracelulares que se apresentam como um complexo de alto peso molecular, que contém a proteína Hsp-90 (*heat shock protein*). Quando o hormônio se fixa no receptor, a proteína Hsp-90 é liberada e o complexo receptor-hormônio é translocado para o núcleo, dimerizado, liga-se ao DNA. Dependendo do gene-alvo, os receptores ativados podem estimular – transativação – ou inibir – transrepressão – a transcrição gênica (ALMAWI et al 2002)