

JULIETA VOLPATO

**AVALIAÇÃO DA HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA CLÍNICA, ESTRESSE
OXIDATIVO E ISQUEMIA EM CÃES DE PASTOREIO SUBMETIDOS AO
EXERCÍCIO FÍSICO**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mere Erika Saito

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Andreza Yonezawa

LAGES - SC

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio
do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Volpato, Julieta

AVALIAÇÃO DA HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA CLÍNICA,
ESTRESSE OXIDATIVO E ISQUEMIA EM CÃES DE PASTOREIO
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO / Julieta Volpato. -
Lages , 2017.

77 p.

Orientadora: Mere Erika Saito

Co-orientadora: Letícia Andreza Yonezawa
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Exercício físico. 2. Cães. 3. Hemograma. 4.
Estresse oxidativo. 5. Albumina modificada pela
isquemia. I. Saito, Mere Erika . II. Yonezawa,
Letícia Andreza . , .III. Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. IV. Título.

JULIETA VOLPATO

**AVALIAÇÃO DA HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA CLÍNICA, ESTRESSE
OXIDATIVO E ISQUEMIA EM CÃES DE PASTOREIO SUBMETIDOS AO
EXERCÍCIO FÍSICO**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Banca Examinadora:

Orientadora: _____
Prof^a. Dr^a Mere Erika Saito
Universidade do Estado de Santa Catarina-CAV/UDESC

Membro: _____
Prof^o. Dr^o. Ademar Luiz Dallabrida
Universidade do Estado de Santa Catarina-CAV/UDESC

Membro: _____
Prof^a. Dr^a. Luciana Pereira Machado
Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS

Membro: _____
Prof^o. Dr^o. Marcos Jun Watanabe
Universidade Estadual Paulista-FMVZ/UNESP

Membro: _____
Prof^o. Dr^o. Paulo Cesar Jark
Universidade Castelo Branco-UNICASTELO

Lages, 20 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho a minha família!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de trilhar esse caminho podendo assim, contribuir como uma pequena gota nesse oceano.

Agradeço à minha família, meu pai Aldo Volpato, minha mãe Elisabete de Fátima Pereira Volpato e minha irmã Mariana Volpato pela ilha de amor, ternura e carinho que criamos durante toda a vida, e que mantemos ao longo do tempo. Vocês são extremamente importantes e indispensáveis para mim, nenhuma pesquisa ou título é mais importante do que vocês!

Ao meu noivo Filipe do Nascimento pelo amor, companheirismo, amizade e paciência que teve e tem comigo. Você é muito importante na minha vida e sua presença e amor me fazem crescer a cada dia. Obrigada por todo o apoio e o carinho que tens comigo. Da mesma forma, nenhuma pesquisa ou título é mais importante do que você!

Agradeço ainda à toda minha família que de longe ou de perto contribuem imensamente para minha formação, e que sempre estão presentes me apoiando em qualquer projeto de vida.

Agradeço à minha orientadora Mere Erika Saito pela oportunidade de iniciar, mesmo que somente no Mestrado, na rotina do Laboratório de Patologia Clínica. A identificação e amor por essa área demorou um pouco para aparecer, mas se tornou minha escolha profissional. Obrigada pelos ensinamentos e por contribuir para o meu crescimento.

À minha coorientadora Letícia Andreza Yonezawa por todo o auxílio durante o projeto, dosagens e redação com seu conhecimento e amizade. Muito obrigada pela sua dedicação e atenção. Estendo aqui ainda o agradecimento à Juliane, que foi parceira no início deste projeto.

Ao Laboratório de Patologia Clínica como estrutura, mas principalmente pelas pessoas que dele fizeram ou fazem parte. Ao Tucano ou, Cláudio R. S. Mattoso que não participou efetivamente do meu projeto de Doutorado, mas que me ajudou bastante na entrada no laboratório. Agradeço especialmente ao Adson, grande colega e amigo de profissão, não só pela ajuda, mas principalmente pela amizade. À Nádia, que também esteve presente somente no início do projeto, mas que me cativou com sua amizade e companheirismo. Estendo ainda meus agradecimentos aos pós-

graduandos Mirelly, Paulinho, Carla e Maysa, sem vocês nada disso seria possível. Vocês foram indispensáveis para esse trabalho. A todos os estagiários e bolsistas que contribuíram com esse trabalho e que se tornaram amigos, Mariah, Ana Cristina, Mariângela e Eduardo, muito obrigada! O ambiente do laboratório é muito mais do que somente de trabalho, laços são formados e estendidos por muito tempo.

Agradeço à Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Hospital de Clínicas Veterinárias pela estrutura fornecida para que a realização do trabalho fosse possível, e com isso estendo meus agradecimentos a todos os funcionários, professores, técnicos e estagiários. Muito obrigada!

Aos professores Ubirajara Maciel da Costa e Luiz Cláudio Milette responsáveis pelos setores CEDIMA e de Bioquímica da UDESC, respectivamente, agradeço por gentilmente terem cedido alguns de seus equipamentos e estrutura para a realização de algumas das dosagens desse estudo.

Agradeço especialmente aos cães que participaram desse estudo, e aos proprietários que aceitaram contribuir com ele, obrigada pela gentileza com a qual me cederam seus amigos.

Obrigada!

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”

Albert Schweitzer

RESUMO

VOLPATO, J. **Avaliação da hematologia, bioquímica clínica, estresse oxidativo e isquemia em cães de pastoreio submetidos ao exercício físico.** 2017. 77p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

O conhecimento das possíveis alterações laboratoriais causadas pelo exercício é de grande importância, sobretudo em cães que são utilizados em funções que causam desgaste físico, como os de pastoreio. Este estudo teve como objetivo a avaliação laboratorial de cães submetidos a testes de exercício de diferentes intensidades. Foram utilizados 11 cães de pastoreio machos e fêmeas, adultos, clinicamente hígidos. Estes foram submetidos a dois testes de exercício com diferentes protocolos, com pelo menos sete dias de intervalo entre eles. O protocolo I (PI) consistiu em exercício de longa duração e baixa velocidade, no qual cada cão foi submetido a 40 minutos ao passo na velocidade de 3,8 km/h, com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. No protocolo II (PII) cada cão foi submetido ao exercício de curta duração e alta velocidade, iniciando com 5 min ao passo a 3,8 km/h, 5 min ao trote a 7,0 km/h e por fim 5 min ao passo a 3,8 km/h também com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. Foram avaliadas frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR) antes do exercício, imediatamente após e 30 minutos após o exercício. Para a análise laboratorial, foram avaliados hemograma completo, proteína plasmática total, contagem de plaquetas, dosagem sérica de ureia, creatinina, proteína sérica total (PST), albumina, atividade de aspartato aminotransferase (AST), creatinaquinase (CK) e plasmática de glicose e lactato, além dos índices de estresse oxidativo por meio de malondialdeído plasmático (MDA) e glutathiona reduzida eritrocitária (GSH) e a da albumina modificada pela isquemia (AMI). As análises laboratoriais foram avaliadas antes do exercício (M0), no primeiro minuto após o término do exercício (M1) e em 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício. Os dados foram comparados entre momentos e entre testes por meio dos testes t pareado e Mann-Whitney para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Foi verificada diferença estatística na FC e TR em ambos os testes, com maiores valores após o exercício. Para contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, foram observados valores estatisticamente maiores em determinados momentos em comparação ao momento M0 somente no PI. O valor de hematócrito foi maior em M1 no teste PII em comparação ao PI. O número de plaquetas foi menor no M15 em relação a M1 no PI. A concentração da creatinina foi estatisticamente menor em M120 no PI e maior em M1 e M30 no PII. Houve aumento da concentração de glicose no PI no M120, e no M15, M30, M60 e M120 no PII, além disso, em M30 foi observado maior valor no PII. Na avaliação do estresse oxidativo, houve diferença somente da concentração de GSH, com maiores valores observados em M1 e que se manteve até M60 no PI. Os cães quando submetidos ao PII manifestaram maior concentração da AMI em M15, que também foi maior quando comparado com o mesmo momento no PI. Desse modo, foi possível concluir que principalmente PII provocou alterações hematológicas, bioquímicas, de estresse oxidativo e ainda nos valores do marcador de isquemia tecidual.

Palavras chave: Exercício físico. Cães. Hemograma. Estresse oxidativo. Albumina modificada pela isquemia.

ABSTRACT

VOLPATO, J. **Hematological, clinical biochemistry, oxidative stress and ischemia evaluation in herding dogs submitted to physical exercise.** 2017. 77 p. Thesis (Ph.D. in Animal Science) – University of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2017.

The knowledge of possible laboratory alterations caused by exercise has great importance, especially in dogs used in functions that cause physical wear, such as herding dogs. This study aimed to perform the laboratory evaluation of dogs submitted to exercise tests of different intensities. For this purpose, 11 male and female, adult herding dogs healthy were used. After the selection of the animals, they underwent two exercise tests with different protocols, with at least seven days interval. The protocol I (PI) consisted of a long duration and low intensity exercise, which each dog walked for 40 minutes at 3.8 km/h, at horizontal position (0% inclined). In the protocol II (PII), each dog underwent short duration and high intensity exercise test, starting with a walk for 5 min at 3.8 km/h, trot for 5 min at 7.0 km/h and walk again for 5 min at 3.8 km/h, also with the treadmill at horizontal position (0% inclined). Heart rate (HR) and rectal temperature (RT) were evaluated before exercise, immediately after and 30 minutes after exercise. For the laboratory analysis, complete blood count (CBC), total plasma protein, platelet count, serum biochemistry (urea, creatinine, total serum protein (PST), albumin, glucose, lactate levels, and aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) activity) were evaluated, as well as oxidative stress indexes by plasma malondialdehyde (MDA) and reduced erythrocyte glutathione (GSH) and ischemia-modified albumin (IMA) was evaluated as ischemia index. The laboratory analysis were evaluated before exercise (M0), immediately after exercise (M1) and at 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) and 120 (M120) minutes after the end of the exercise. Data were compared between times and between tests using the paired t-test and Mann-Whitney for parametric and non-parametric data, respectively. There was statistical difference in HR and TR values in both tests, with higher values observed after exercise. For erythrocyte count, hemoglobin concentration, and hematocrit, there were statistically higher values at few times compared to M0 only in PI. The hematocrit value was higher at M1 in the PII test compared to the same time in PI. The number of platelets was lower at M15 than at M1 in PI. The creatinine concentration was statistically lower at M120 in PI and higher at M1 and M30 in PII. There was increase in glucose concentration in the PI at M120, and at M15, M30, M60 and M120 in PII, also, at M30 a higher value was observed in PII. In the evaluation of the oxidative stress, there was difference only of the concentration of GSH, with higher values observed at M1, which remained until M60 in PI. Dogs in PII showed a higher concentration of AMI at M15, which was also higher when compared to the same time in PI. Thus, it was possible to conclude that especially PII could cause hematological, biochemical and oxidative stress changes, and also altered the values of the tissue ischemia marker.

Keywords: Physical exercise. Dogs. CBC. Oxidative stress. Ischemic modified albumin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01** - Média \pm desvio-padrão da frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR), de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, avaliados nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1) e 30 minutos (M30) após o término do exercício.....32
- Figura 02** - Mediana da concentração da AMI de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Média \pm desvio-padrão dos parâmetros do eritrograma de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....34
- Tabela 02** - Mediana (Percentil 25; Percentil 75) de leucograma de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....36
- Tabela 03** - Médias \pm desvio-padrão da contagem de plaquetas e mensuração de PPT de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....37
- Tabela 04** - Média \pm desvio-padrão da concentração de malondialdeído (MDA) e glutatona reduzida (GSH) de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....38
- Tabela 05** - Mediana (Percentil 25; Percentil 75) da atividade sérica de creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e concentração plasmática de lactato e glicose de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....53
- Tabela 06** - Média \pm desvio-padrão da concentração sérica de ureia e creatinina de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....55

Tabela 07 - Média \pm desvio-padrão da concentração sérica de proteína sérica total (PST), albumina e globulinas de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....69

Tabela 08 - Mediana (Percentil 25; Percentil 75) da concentração da AMI de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.....70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMI	Albumina Modificada pela Isquemia
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
CK	Creatina quinase
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Frequência Cardíaca
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
PI	Protocolo de exercício I
PII	Protocolo de exercício II
PST	Proteína Sérica Total
TR	Temperatura Retal
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VG	Volume Globular
VGM	Volume Globular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Referências.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 CAPÍTULO I	23
3.1 Introdução	25
3.2 Material e Métodos	28
3.3 Resultados e Discussão	32
3.4 Conclusão	40
3.5 Referências	41
4 CAPÍTULO II	44
4.1 Introdução	46
4.2 Material e Métodos	49
4.3 Resultados e Discussão	52
4.4 Conclusão	56
4.5 Referências	57
5 CAPÍTULO III	61
5.1 Introdução	63
5.2 Material e Métodos	65
5.3 Resultados e Discussão	69
5.4 Conclusão	73
5.5 Referências	74
6 CAPÍTULO IV	77
6.1 Intercorrências encontradas	77

1 INTRODUÇÃO

Historicamente os cães vivem muito próximos dos humanos e muitas vezes utilizados como animais para trabalho, no auxílio com rebanhos, na caça e como cães de guarda, e atualmente são mais utilizados como animais de companhia (FARRELL, et al., 2015).

Dessa forma, ao serem domesticados diminuíram a prática de exercício físico, já que não há a necessidade da caça. Assim, sem a prática de atividades físicas e recebendo uma carga energética às vezes superior às suas necessidades, os riscos de se tornarem obesos, cardiopatas e com problemas locomotores aumentam. Dentre outras alternativas para reverter ou prevenir esses problemas, está a realização de exercício físico, e para isso o condicionamento físico é de grande importância (LORENZ, 1997), assim como o conhecimento das possíveis alterações que o exercício físico pode proporcionar. Dentre vários motivos, o exercício vem se tornando uma questão de grande interesse e muitos cientistas o têm estudado em muitos aspectos (DZHELEBOV, et al., 2009).

Além do exercício físico ser cada vez mais procurado por proprietários de cães, diferentes raças estão associadas a diferentes tipos de exercício. Por esse motivo a procura por atendimento médico para esses pacientes se torna cada vez maior, como o exemplo de cães utilizados em trabalhos e provas de agilidade que são frequentemente levados a clínicas veterinárias, por se apresentarem intolerantes aos exercícios físicos aos quais são submetidos (TAYLOR, 2011).

A prática do exercício induz a uma variedade de alterações fisiológicas e laboratoriais, que estão ligadas às características do exercício como duração, intensidade e nível de treinamento e preparo físico do animal atleta (ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2008). Dentre as raças que mais estão relacionadas a estudos sobre o exercício estão o Husky Siberiano (QUERENGAESSER, et al., 1994), Galgo Inglês (PASQUINI, et al., 2010; LUCAS, et al., 2015), Labrador (MATWICHUK, et al., 1999) e Beagle (PICCIONE, et al., 2012). Os estudos também estão relacionados a exercício específico, como de salvamento (ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2008), agility (ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2007a; ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2007b), provas de trenó (ANGLE, et al., 2009) e corridas de resistência (WAKSHLAG, et al., 2010).

Dentre os diferentes tipos de exercício específico realizado pelos cães está o trabalho de pastoreio, que é bastante difundido principalmente na região sul do Brasil. Como em outros tipos de exercício, algumas raças possuem aptidão a esse trabalho, como por exemplo o Australian Cattle Dog, que se destaca entre as raças caninas utilizadas neste trabalho. De origem australiana, do ano de 1840, introduziu-se raças como Dálmata e Collie, entre outras diversas, além de Dingos. Reconhecido hoje como um dos cães mais eficientes do mundo para se utilizar no trabalho com o gado, é um animal extremamente inteligente, forte e ágil, que trabalha muitas vezes durante a maior parte do dia em fazendas, exigindo grande esforço físico (BRIGGS, 2001).

Outra raça bastante utilizada para o trabalho de pastoreio é a Border Collie, originário de cães que foram domesticados e depois criados como companheiros constantes de fazendeiros, realizando trabalhos com rebanhos de ovinos e bovinos (WILSON, 2012).

Cada tipo de exercício pode gerar um requerimento diferente e com isso alterações específicas, assim, a avaliação do exercício pode sofrer variações ambientais principalmente em relação a condições climáticas e de relevo. Dessa forma, o uso da esteira possibilita a realização de testes de exercício em ambientes fechados, padronizando as condições ambientais, como temperatura, umidade, vento, além de permitir o controle sobre a velocidade e angulação em que a atividade física deve ser realizada (BUCHNER, et al., 1994).

A avaliação hematológica de cães submetidos ao exercício em esteira pode se tornar uma importante ferramenta nessa espécie, assim como já ocorre em equinos, quando são realizados testes para avaliação do desempenho atlético, investigando as variáveis hematimétricas como hematócrito, eritrócitos e concentração de hemoglobina, que podem ser utilizadas para avaliação dos efeitos tanto do exercício como do treinamento (TYLER-MCGOWAN, et al., 1999). As alterações metabólicas transitórias incluem ainda variações hematológicas, no controle ácido-base, bem como nas concentrações de eletrólitos e atividade de enzimas musculares (QUERENGAESSES, 1994; MATWICHUK, et al., 1999; ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2008).

Durante o exercício físico, podem ser utilizadas vias aeróbicas e anaeróbicas para obtenção de energia, ou de uma combinação das duas. Exercício de baixa intensidade tem como maior fonte de energia a via aeróbica, que vai se tornando progressivamente menor a medida que a intensidade do exercício aumenta, sendo

obtida na sua maioria pela via anaeróbica (HINCHCLIFF, et al. 2002). A capacidade atlética de um animal sofre influência de fatores que podem dificultar a obtenção de oxigênio, reduzindo assim suprimentos para via aeróbica. Da mesma forma, o condicionamento físico à atividade aumenta a capacidade aeróbica do animal melhorando seu desempenho (LACOMBE, et al. 1999). A medida que o exercício físico vai ganhando intensidade, ocorre o aumento na concentração de lactato plasmático (SCHUBACK e ESSÉN-GUSTAVSSON, et al, 1998), e que pode ser utilizado na avaliação fisiológica da resistência durante a prática do exercício físico, sendo uma importante variável a ser avaliada (PICCIONE et al, 2012).

A prática do exercício físico contínuo pode estar acompanhada também da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO), que provocam alterações das membranas celulares, o que causa lesão acompanhada por processo inflamatório das fibras musculares. Várias causas foram sugeridas para estas alterações, entre as quais o alto grau de estresse provocado pelo exercício, alterações da microcirculação, produção de metabólitos tóxicos e depleção intramuscular dos substratos energéticos (CÓRDOVA e NAVAS, 2000). Porém, o organismo possui proteção antioxidante composta por sistemas enzimáticos, como a superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase e não enzimáticos, como vitaminas C e E. Mas, além disso, as ERO desempenham importantes funções benéficas no organismo, como síntese de componentes biológicos essenciais para regulação de funções celulares como, sinalização, transcrição, ativação e proliferação celular, além ainda de produção de energia e fagocitose (MARLIN, et al, 2002; FERNANDES, et al., 2012).

Frente às possíveis lesões celulares que o exercício físico pode causar, a investigação da ocorrência de isquemia pode ser de grande importância para entender as respostas por parte do animal. Assim, a determinação da albumina modificada pela isquemia (AMI) também se faz importante nesse contexto, além disso, na Medicina Veterinária existem poucos relatos do estudo da AMI, que está presente principalmente na avaliação de equinos atletas (YONEZAWA, et al., 2012). Não existem, portanto, relatos desse marcador em cães, sendo este o primeiro estudo. A determinação da albumina modificada pela isquemia, neste trabalho relacionada ao exercício, se torna um início no conhecimento desse teste como marcador de lesões isquêmicas em cães, podendo se tornar uma nova ferramenta ao predizer lesões e perdas teciduais futuras.

Em relação ainda aos tipos de exercício, protocolos de exercício físico utilizando esteira em cães ainda não são bem estabelecidos, assim como as possíveis alterações que podem causar. A avaliação laboratorial das diferentes respostas causadas pelo exercício físico nos cães destinados ao pastoreio pode elucidar vários mecanismos ainda desconhecidos. Dessa forma, os achados laboratoriais oriundos dos protocolos de exercício instituídos fornecem informações sobre estas raças bastante utilizadas no trabalho de campo como o pastoreio, sobretudo na região sul do Brasil.

1.1 REFERÊNCIAS

ANGLE, C.T. et al. Hematologic, serum biochemical, and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs.

Veterinary Clinical Pathology, v.38, p.370–374, 2009.

BRIGGS, P. **O Livro Gigante do Cão**. Edição portuguesa. Centralivros, Ltda. 415p, 2001.

BUCHNER, H.H.F. et al. Kinematics of treadmill versus overground locomotion in horses. **The Veterinary Quarterly**, v.16, p.87-90, 1994.

CÓRDOVA, A; NAVAS, F.J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. Departamento de Fisiologia e Bioquímica. E. U. **Fisioterapia da Universidade de Soria-Espanha. Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.6, p.208, 2000.

DZHELEBOV, P.V. et al. Effects of experimental prolonged strenuous exercise on haematological parameters in dogs. **Bulgarian Journal of veterinary Medicine**, v.12, p.112-118, 2009.

FARRELL, L.L. et al. The challenges of pedigree dog health: approaches to combating inherited disease. **Canine Genetics and Epidemiology**, v.2, p.1-14, 2015.

FERNANDES, W.R. et al. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutatona reduzida (GSH) eritrocitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 677-680, 2012.

HINCHCLIFF, K.W. et al. High intensity exercise conditioning increases accumulates oxygen deficit of horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p.9-16, 2002.

LACOMBE, V.A. et al. Exercise that induces substantial muscle glycogen depletion impairs subsequent anaerobic capacity. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.293-297, 1999.

LORENZ, K. **E o homem encontrou o cão**. Lisboa. Ed. Relógio D'água, 262p., 1997.

LUCAS, V. et al. Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v.76, p.637-643, 2015.

MARLIN, D.J. et al. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1622-1627, 2002.

MATTWICHUC, C.L. et al. Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy labrador retrievers before and after strenuous exercise. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, p.88-92, 1999.

PASQUINI, A. et al. Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise. **Research in veterinary science**, v.89, p.120-123, 2010.

PICCIONE, G. et al. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained Beagle Dogs. **Experimental Animals**, v.61, p.511–515, 2012.

QUEREHGAESSER, A. et al. Blood changes during training and racing in sled dogs. **The Journal of Nutrition**, v.124, p.2760-2764, 1994.

ROVIRA, S., MUNOZ A., BENITO, M. Fluid and Electrolyte Shifts During and After Agility Competitions in Dogs. **Clinical Pathology**, v. 69, p.31-35, 2007a.

ROVIRA, S., MUNOZ A., BENITO, M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, p. 30-35, 2007b.

ROVIRA, S.; MUNOZ A.; BENITO, M. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. **Veterinari Medicina**, v.58, p.333-346, 2008.

SCHUBACK, K.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Muscle anaerobic response to a maximal treadmill exercise test in Standardbred trotters. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.504-510, 1998.

TAYLOR, S.M. **Diagnostic Approach Exercise Intolerance in Hunting Dogs**. Abstracts from the European Veterinary Conference Voorjaarsdagen. Chapter 2. 2011.

TYLER-MCGOWAN, C.M. et al. Haematological and biochemical responses to training and overtraining. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.621-625, 1999.

WAKSHLAG, J.J. et al. Evaluation of exercise-induced changes in concentrations of C-reactive protein and serum biochemical values in sled dogs completing a long-distance endurance race. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 1207-1213, 2010.

WILSON, W.B. **Border Collie: Smart Owner's Guide**. Ed. i5 Publishing, 176p, 2012.

YONEZAWA, L.A. et al. Ischaemia modified albumin in horses exercised at different intensities in treadmill. **Comparative Exercise Physiology**, v.8, p.233-237, 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliação de parâmetros laboratoriais de cães de pastoreio submetidos a exercício físico em esteira ergométrica em diferentes intensidades.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar a hematologia e a bioquímica de cães de pastoreio submetidos a exercício físico de diferentes intensidades em esteira ergométrica.

Avaliar o estresse oxidativo por meio da avaliação de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) em cães de pastoreio submetidos a exercício de diferentes intensidades em esteira.

Avaliar a isquemia por meio da albumina modificada pela isquemia em cães de pastoreio submetidos a exercício de diferentes intensidades em esteira.

3 CAPÍTULO I

Capítulo 1: Avaliação hematológica e de estresse oxidativo em cães de pastoreio submetidos ao exercício físico em esteira ergométrica.

RESUMO

O exercício físico está presente na medicina veterinária nas mais diferentes formas. Várias raças de cães estão associadas a diferentes treinos e trabalhos, que envolvem o desgaste físico e alterações celulares desses animais. As raças Australian Cattle Dog e Border Collie possuem aptidão ao pastoreio, e a resposta fisiológica desses animais frente ao exercício não é totalmente conhecida. Assim, este estudo teve como objetivo a avaliação hematológica e do estresse oxidativo de cães submetidos a exercício de diferentes intensidades. Foram utilizados 11 cães de pastoreio machos e fêmeas, adultos, que foram submetidos inicialmente a exame clínico (exame físico completo, hemograma, perfil bioquímico) para constatação de hígidez. Após a seleção dos animais, estes foram submetidos a dois testes de exercício, com pelo menos sete dias de intervalo entre eles. O protocolo I (PI) consistiu em exercício de longa duração e baixa velocidade, no qual cada cão foi submetido a 40 minutos ao passo na velocidade de 3,8 km/h, com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. No protocolo II (PII) cada um dos cães foi submetido ao exercício de curta duração e alta velocidade, iniciando com 5 min ao passo a 3,8 km/h, 5 min ao trote a 7,0 km/h e por fim 5 min ao passo a 3,8 km/h também com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. Foram avaliadas frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR) antes do exercício, imediatamente após e 30 minutos após o exercício. Para a análise hematológica foram avaliados hemograma completo, proteína plasmática total e contagem de plaquetas, e para a avaliação do estresse oxidativo foram mensurados o malondialdeído plasmático (MDA) e a glutathiona reduzida eritrocitária (GSH), nos momentos antes do exercício (M0), imediatamente após o exercício (M1), e em 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício. Os dados foram comparados entre momentos e entre testes, por meio dos testes t pareado e Mann-Whitney para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Foi realizado ainda o teste de Pearson para avaliação de possível correlação entre as variáveis. Foram verificadas diferenças estatísticas dos valores de FC e TR em ambos os protocolos, com maiores valores sendo observados após o exercício. Para contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito, foram observados valores estatisticamente maiores em determinados momentos em comparação ao momento M0 somente no PI. O valor de hematócrito foi maior em M1 no PII em comparação ao mesmo momento no PI. O número de plaquetas foi menor no momento M15 em relação a M1 no PI. Na avaliação do estresse oxidativo, foi observada diferença estatística somente da concentração de GSH no PI, que apresentou maior valor no M1 em relação ao M0, e se manteve aumentado até M60. A intensidade e duração do exercício praticado não foram suficientes para aumentar a lipoperoxidação, avaliada pelo MDA. O aumento de GSH no PII sinaliza aumento na resposta antioxidativa frente ao exercício proposto.

Palavras chave: Exercício físico. Cães. Pastoreio. Hemograma. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Physical exercise is present in veterinary medicine in the most different forms. Several dog breeds are associated with different training and work, which involve physical wear and cellular changes of these animals. The Australian Cattle Dog and Border Collie are grazing ability, and the physiological response of these animals to exercise is not fully understood. Thus, this study aimed to investigate the hematological evaluation and oxidative stress of dogs submitted to exercise of different intensities. For this purpose, 11 male and female, adult herding dogs healthy were used. After the selection of the animals, they were submitted to two exercise tests, with at least seven days interval between them. The I protocol (IP) consisted of a long duration and low intensity exercise, which each dog was submitted to walk for 40 minutes at 3.8 km/h, with the treadmill in the horizontal position, without inclination. In the II protocol (IIP), each dog was submitted to short duration and high intensity exercise test, starting with a walk for 5 min at 3.8 km/h, trot for 5 min at 7.0 km/h and walk again for 5 min at 3.8 km/h, also with the treadmill in horizontal position, without inclination. Heart rate (HR) and rectal temperature (RT) were evaluated before exercise, immediately after and 30 minutes after exercise. For hematological analysis, CBC, total plasma protein and platelet count were evaluated. Plasma malondialdehyde (MDA) and erythrocyte reduced glutathione (GSH) were measured for the evaluation of oxidative stress. All analysis were performed before exercise (M0), immediately after exercise (M1), and at 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) and 120 (M120) minutes after the end of the exercise. The data were compared between moments and between tests, by means of paired t-test and Mann-Whitney for parametric and non-parametric data, respectively. The Pearson test was also performed to evaluate possible correlation between the variables. After analysis of the results, statistical differences in HR and RT values were verified in both protocols, with higher values after exercise. For erythrocyte, hemoglobin and hematocrit, there were statistically higher values at certain times compared to M0 only at IP. Hematocrit value was higher at M1 in the II test compared to the same time in IP. The platelet count was lower at M15 in relation to M1 in IP. In the evaluation of oxidative stress, there was a statistical difference only for GSH concentration, with higher values at M1 which remained up to M60. The intensity and duration of the exercise were not sufficient to induce an increase in lipoperoxidation, evaluated by MDA concentration. The increase of GSH in PII signal an antioxidative response to the proposed exercise.

Keywords: Physical exercise. Dogs. Herding. CBC. Oxidative stress.

3.1 INTRODUÇÃO

A atividade física coloca as exigências metabólicas acima da taxa basal e a incapacidade de adaptação às necessidades fisiológicas do exercício está associada não só à fadiga e insucesso, mas também com lesões específicas induzidas pelo exercício e doenças que podem comprometer o desempenho físico e, em última instância, a saúde e bem-estar do cão de trabalho (DAVIS, 2009). Em virtude das modificações que o exercício físico promove, alterações em diversas variáveis fisiológicas e laboratoriais podem ser observadas, dependentes da duração, intensidade do exercício e nível de treinamento (ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2008).

Dentre as alterações encontradas em decorrência da realização do exercício físico estão a eritrocitose, que pode estar presente após o exercício físico ou em resposta à ação da adrenalina, liberada em animais excitados, com medo ou dor, e normalmente é caracterizada por aumento temporário do hematócrito sem aumento das proteínas plasmáticas (COWEL et al., 1999). A resposta pode ser evidente também no leucograma, que pode ter valores de leucócitos acima dos valores considerados de referência em cães submetidos ao exercício físico extremo (DAVIS et al., 2008), devido a esplenocontração, liberando principalmente linfócitos e ainda pela demarginação de neutrófilos, também relacionados a adrenalina (STOCKHAM; SCOTT, 2008b).

Segundo Couto et al. (2011), a contagem de plaquetas pode aumentar em relação aos valores de referência, em cães da raça Galgo após o exercício. O aumento significativo de plaquetas também é observado em equinos, que similarmente aos eritrócitos aumentam na corrente sanguínea em decorrência da liberação de catecolaminas, esplenocontração e hemoconcentração (HIDEO et al., 1999). Adicionalmente, a concentração de proteína plasmática total pode se elevar após exercício físico, devido a uma redistribuição de fluidos e eletrólitos que ocorre do compartimento vascular para o espaço extracelular (ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2007).

Para que o exercício físico seja possível, o oxigênio é um componente essencial, com íntima relação com o metabolismo celular, todavia, qualquer situação que ocorra excesso de consumo, como exercício aeróbico, pode levar à produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) (KERKSICK e WILLOUGHBY,

2005). Radicais livres são moléculas ou átomos simples que possuem um elétron desparelhado em sua órbita externa, o qual diminui sua estabilidade e aumenta sua reatividade com outras moléculas ou átomos, principalmente lipídios celulares, proteínas e bases nucleicas (MARLIN et al., 2002). A produção de radicais livres durante o exercício depende de alguns fatores, tais como frequência, intensidade e duração do exercício e do tipo de exercício executado, aeróbio ou anaeróbio (CAZZOLA, et al., 2003). As ERO incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, que são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com muitos compostos (AGARWAL, et al., 2005).

O estresse oxidativo é um fenômeno bioquímico que ocorre a partir de um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de oxidantes (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007), como quando a produção de ERO aumenta até o ponto em que o sistema antioxidante celular não consegue remover ou neutralizar tudo que é produzido. Uma das consequências do estresse oxidativo mais importante é a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. A membrana das células é uma camada lipídica dupla na forma de um mosaico líquido com receptores e proteínas de transporte e, a propriedade de fluidez da membrana está relacionada com ácidos graxos poli-insaturados e a viabilidade da célula com esta flexibilidade. As ERO reagem com os lipídios das membranas celulares induzindo a lipoperoxidação, causando perda da fluidez da membrana e aumento da permeabilidade com liberação das proteínas e enzimas lisossomais do citoplasma no espaço extracelular, lesionando os tecidos (SJÖDIN et al., 1990). Além disso, impede a passagem de nutrientes, como proteínas e glicose, e diminui a capacidade de reação do sistema imunológico (KERKSICK e WILLOUGHBY, 2005).

A peroxidação lipídica pode ser quantificada pela mensuração do acúmulo de subprodutos resultantes desse processo, como o malondialdeído (MDA), que serve como índice da intensidade da ocorrência de tal reação (KERKSICK e WILLOUGHBY, 2005), sendo um dos produtos finais da lipoperoxidação (TODOVORA et al., 2005).

Os eritrócitos possuem, além da função de troca gasosa, mecanismos efetivos na desativação das ERO produzidas em outros tecidos, representando assim, uma importante fonte antioxidante para o sangue. Entre todos os mecanismos que estas células possuem, o mais importante é o sistema da glutathione, que consiste na glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e nas duas enzimas funcionalmente relacionadas, a glutathione peroxidase (GPX) e glutathione redutase. Na

presença de ERO, a forma reduzida da glutathiona é oxidada por ação da glutathiona peroxidase, diminuindo os níveis circulantes de GSH. Normalmente, essa forma oxidada é rapidamente reconvertida em GSH por ação da glutathiona redutase (JANIÁK et al., 2009). A GSH é um dos antioxidantes endógenos mais importantes, existente tanto no citosol quanto na mitocôndria, e o fígado é o local de ressíntese, suprindo 90% da GSH circulante e exportando GSH para o plasma e musculatura esquelética em exercícios prolongados (SUN et al., 2010).

Frente a tantas possíveis respostas relacionadas a diferentes tipos de exercício o objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis alterações hematológicas e relacionadas ao estresse oxidativo em cães de raças com aptidão ao trabalho de pastoreio, submetidos a diferentes protocolos de exercício.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pela Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob o número de protocolo 1.07.15.

Local

O estudo foi realizado nas dependências do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages/SC e contou com a colaboração dos Serviços do Laboratório Clínico Veterinário e de Cardiologia Veterinária da instituição.

Animais

Foram utilizados 11 cães adultos de raças com aptidão ao pastoreio, sendo sete animais da raça Australian Cattle Dog, quatro machos e três fêmeas com peso médio de $20,9 \pm 4,5$ kg e idade média de $3,1 \pm 2,2$ anos, e quatro animais da raça Border Collie, dois machos e duas fêmeas com peso médio de $17,8 \pm 1,7$ kg e $1,0 \pm 0,7$ anos de idade, clinicamente sadios. Os cães foram provenientes de proprietários particulares que permitiram sua participação nesse estudo mediante termo de consentimento. Para avaliação da higidez foi obtido o histórico dos animais, e os mesmos foram avaliados por meio de exame físico completo (FEITOSA, 2008), hemograma (JAIN, 1993) e de bioquímica sérica, para constatação de higidez. Os animais foram submetidos a jejum hídrico de duas horas e sólido de no mínimo 4 horas.

Testes de exercício físico

Os animais foram submetidos ao exercício em esteira sem condicionamento prévio, apenas com adaptação ao aparelho, com o objetivo de avaliar os animais sem treinamento, eram mantidos na esteira por meio de estímulos visuais e auditivos. Foram submetidos a dois testes de exercício físico em esteira ergométrica (Johnson Treo T101, Indaiatuba-SP), com no mínimo 7 dias de intervalo entre eles. Os protocolos de exercício foram baseados no estudo de Piccione et al. (2012) com modificações. Os testes foram realizados sempre no mesmo período do dia.

Protocolo I (PI) exercício de longa duração e baixa velocidade: duração de 40 minutos na velocidade de 3,8 km/h ao passo e 0% de inclinação da esteira.

Protocolo II (PII) exercício de curta duração e alta velocidade: duração de 5 min na velocidade de 3,8 km/h ao passo, seguido de 5 min na velocidade de 7,0 km/h ao trote e 5 min na velocidade de 3,8 km/h (período de desaquecimento), com 0% de inclinação da esteira.

Durante os testes de exercício físico, a temperatura e umidade relativa do salão foram controladas por aparelho de ar condicionado digital e monitoradas por meio de termo-higrômetro digital, e seus valores anotados nos momentos M1 e M30 de cada teste.

Amostras

As amostras de sangue foram colhidas por meio de punção da veia jugular, sendo colhidos cerca de 8 mL de sangue por momento. Foram utilizadas agulhas 21G (Vacutainer®, BD, Juiz de Fora-MG) em sistema a vácuo, sendo acondicionados 4 mL de sangue em dois tubos contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer®, BD, Juiz de Fora-MG), para realização de hemograma e para obtenção de plasma com EDTA após centrifugação, a 2000g por 10 minutos, para a mensuração do malondialdeído (MDA). Para a dosagem da glutatona reduzida eritrocitária (GSH), foi utilizada a papa de eritrócitos desta mesma amostra.

Momentos

As amostras foram colhidas em momentos pré-estabelecidos em ambos os testes de exercício físico: momento anterior ao início do exercício físico (M0), no primeiro minuto após o término do exercício (M1) e 15, 30, 60 e 120 minutos após o término do exercício denominados de M15, M30, M60 e M120, respectivamente.

Avaliação da frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR)

Os animais foram submetidos à avaliação da FC e da TR nos momentos M0, M1 e M30. A avaliação da FC foi realizada por meio de auscultação indireta com o auxílio de estetoscópio (Littmann® Classic II 2201, 3M, St. Paul, EUA) e da TR com o auxílio de termômetro digital (Termo Med® 1.0, Incoterm, Porto Alegre-RS).

Hemograma

O hemograma foi processado segundo Jain (1993). O hematócrito foi mensurado pelo método de microhematócrito em centrífuga (MicroSpin, Jaboticabal-SP). A contagem total de eritrócitos e leucócitos foi realizada em contador automático de células (SDH-3 Vet, Labtest, Lagoa Santa-MG). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensão sanguínea corado com corante hematológico rápido (NewProv, Pinhais-PR). Além disso, foi também realizada a estimativa de plaquetas em esfregaço sanguíneo e mensurada a proteína plasmática total pelo método de refratometria, com o auxílio de refratômetro portátil (Digit-Biosystems, Curitiba-PR).

Avaliação do estresse oxidativo

A concentração de MDA e GSH foi determinada por meio de ensaio colorimétrico com o auxílio do kit comercial para o MDA (Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e para a dosagem de GSH plasmática (Glutathione Assay Kit e Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A leitura dos dois testes foi realizada em leitor de ELISA (Biotek EILx-800, Vermont, EUA) com o auxílio do programa computacional Gen 5 1.10. Após a realização dos testes, os valores foram obtidos por meio de curvas padrão.

Análise estatística

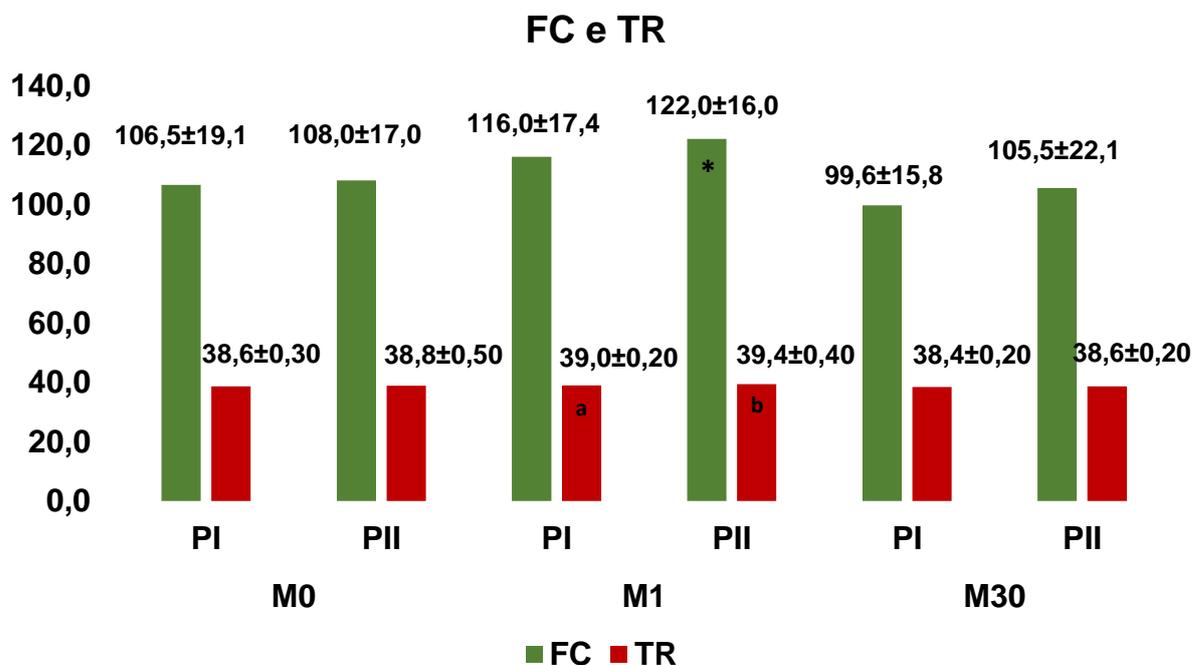
Inicialmente, os valores foram analisados segundo a sua distribuição pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram analisados estatisticamente comparando o momento M0 aos momentos subsequentes, e entre testes para cada momento. A análise dos dados foi realizada pelo teste t pareado para dados paramétricos e pelo teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Foi realizada ainda a correlação pelo teste de Pearson entre variáveis. As análises foram processadas com o auxílio de programa estatístico computadorizado (GraphPad Prism versão 5) com o nível de significância de 5%.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais de ambas as raças completaram os dois protocolos de exercício sem intercorrências.

Os resultados de FC e TR apresentaram diferença estatística. A FC no PII foi significativamente maior ($p=0,040$) no momento M1 em relação ao momento M0 (Figura 01). Essa alteração pode ser justificada pelo aumento no débito cardíaco e consequente requerimento de oxigênio em resposta ao exercício (ROVIRA; MUNOZ; BENITO; 2008). Os valores de FC encontrados logo após o exercício foram semelhantes aos valores encontrados por Piccione et al. (2012) em cães da raça Beagle após trote de 20 min a uma velocidade de 7,2 km/h, porém, foram menores do que os encontrados em cães de diferentes raças em treinamento de resgate, após 20 minutos de exercício sem que a velocidade e a marcha pudessem ser controladas (ROVIRA, et al., 2008), e em Labradores imediatamente após exercício em esquema de circuito pelo tempo de 10 minutos (MATWICHUK, et al., 1999).

Figura 01 - Média \pm desvio-padrão da frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR), de 11 cães das raças Australian Cattle Dog ($n=7$) e Border Collie ($n=4$) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, avaliados nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1) e 30 minutos (M30) após o término do exercício.



* Diferenças entre momentos em relação ao momento M0.

^{ab} Diferenças entre testes nos mesmos momentos.

Porém, os cães utilizados nesse estudo apresentaram ainda no M0 valores de frequência cardíaca relativamente altos, quando comparados com os valores de referência para a espécie (FEITOSA, 2008), o que pode refletir a ação de catecolaminas em virtude do estresse agudo que esses animais podem ter apresentado antes mesmo do início do exercício (ERICKSON; DETWEILER, 2004).

Os valores de TR foram maiores em M1 em relação ao momento M0 no PI ($p=0,001$) e no PII ($p=0,004$) (Tabela 01). Houve também diferença entre testes, sendo significativamente maior em M1 no PII em relação ao PI (Tabela 01). O aumento na TR encontrado em ambos os testes é esperado em animais após a realização de exercício físico, pois o trabalho muscular gera um aumento na temperatura corporal (ROVIRA; MUNOZ; BENITO, 2008), e que foi evidenciado no PII devido à maior intensidade do exercício físico em relação ao PI. Os valores de TR não foram maiores do que os encontrados por Rovira, Munoz e Benito (2008) em cães de diferentes raças durante treinamento para salvamento, e foram semelhantes aos encontrados por Piccione et al. (2012) em cães da raça Beagle durante exercício em esteira, em velocidade semelhante e tempo superior aos aplicados neste estudo.

As condições do local revelaram temperatura e umidade relativa do ar bastante semelhantes, não apresentando diferença significativa, tendo como temperatura nos momentos M1 e M30 de $18,3 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ e $18,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$, respectivamente, e umidade relativa de $75,5 \pm 5,5\%$ (M1) e $76,3 \pm 7,4\%$ (M30) nas avaliações do protocolo I. Já o protocolo II foi executado em uma temperatura de $19,5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (M1) e $19,2 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ (M30) e com umidade relativa de $75,0 \pm 8,7\%$ (M1) e $80,5 \pm 7,8\%$ (M30). Assim, a maior temperatura retal no M1 do PII em relação ao PI não tem relação com a temperatura ambiente.

As alterações no eritrograma foram discretas. O número de eritrócitos foi menor em M30 ($p=0,026$) e a concentração de hemoglobina em M30 ($p=0,040$) e M120 ($p=0,039$), enquanto o hematócrito foi menor somente em M1 ($p=0,001$), somente no PI. Além disso, o hematócrito de M1 do PII foi maior em relação ao mesmo momento do PI ($p=0,039$). Não foi encontrada diferença nas demais avaliações do eritrograma (Tabela 02). Essa redução da série vermelha encontrada em alguns momentos após o término do exercício no PI difere do que é descrito pela literatura, que cita aumento no hematócrito em função do exercício causado pela esplenocontração, desidratação e extravasamento de fluidos para a musculatura, o que contribui para a diminuição do

volume plasmático e consequente aumento no hematócrito (STOCKHAM; SCOTT, 2008a; ANGLE, et al., 2009; PICCIONE, et al., 2012).

Tabela 01 - Média \pm desvio-padrão dos parâmetros do eritrograma de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	p	M15	M30	p	M60	M120	p
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	PI	6,34 \pm 0,63	6,19 \pm 0,46		6,24 \pm 0,90	6,04 \pm 0,30*	0,026	5,95 \pm 0,69	5,97 \pm 0,54	
	PII	6,02 \pm 0,76	6,31 \pm 1,03		5,81 \pm 0,58	6,01 \pm 0,63		5,89 \pm 0,51	5,89 \pm 0,58	
	p									
Hemoglobina (g/dL)	PI	14,9 \pm 1,7	14,5 \pm 1,2		14,7 \pm 1,3	14,1 \pm 0,9*	0,04	14,1 \pm 1,2	14,0 \pm 1,4*	0,039
	PII	14,7 \pm 1,5	15,0 \pm 1,4		14,3 \pm 1,5	14,3 \pm 1,5		14,4 \pm 1,2	14,0 \pm 1,2	
	p									
Hematócrito (%)	PI	43,5 \pm 4,2	41,3 \pm 3,5 ^A	0,001	41,2 \pm 3,3	41,7 \pm 2,4		41,8 \pm 4,0	41,4 \pm 4,5	
	PII	42,1 \pm 4,0	42,7 \pm 3,1 ^B		41,4 \pm 3,6	41,5 \pm 3,8		41,9 \pm 3,8	41,1 \pm 3,7	
	p		0,039							
VGM (fL)	PI	69,2 \pm 5,1	66,8 \pm 1,4		66,5 \pm 6,3	69,1 \pm 4,2		70,6 \pm 5,6	69,3 \pm 3,4	
	PII	70,4 \pm 5,3	68,7 \pm 8,2		71,5 \pm 5,4	69,4 \pm 6,1		71,3 \pm 4,9	70,0 \pm 4,9	
	p									
CHGM (%)	PI	34,4 \pm 1,7	35,1 \pm 1,4		35,6 \pm 1,4	33,8 \pm 1,6		33,9 \pm 2,3	33,8 \pm 1,7	
	PII	35,0 \pm 1,3	35,1 \pm 1,7		34,5 \pm 1,4	34,4 \pm 1,4		34,4 \pm 1,3	34,4 \pm 1,0	
	p									

* Diferenças entre momentos em relação ao momento M0.

^{AB} Diferenças entre testes nos mesmos momentos.

Dzhelebov et al. (2009) e Lucas et al. (2015) também observaram diminuição do hematócrito logo após o exercício em cães sem raça definida e em Greyhounds, respectivamente, que foi atribuída ao treinamento dos cães, alterando os valores basais destes animais. Porém, neste estudo os cães não foram submetidos a treinamento e o período de exercício não foi extenso. Contudo, pode ser observado que os valores do eritrograma se mostram maiores no M0, principalmente no PI, em relação aos demais momentos, o que pode ter ocorrido em consequência de um possível estresse agudo sofrido por esses animais antes da prática do exercício, o

que pode ter contribuído para a liberação de catecolaminas, como a adrenalina, com consequente esplenocontração (STOCKHAM; SCOTT, 2008a). Mas, essas diferenças observadas não apresentam relevância clínica, já que os valores se mantiveram dentro do intervalo de referência para a espécie (JAIN, 1993).

Não houve diferença estatística nos valores de leucograma dos cães avaliados nos diferentes testes de exercício (Tabela 03). Diferentemente, outros autores em equinos (ZOBBA, et al. 2011) e em cães (DAVIS, et al., 2008; LUCAS, et al., 2015), observam leucocitose após o exercício, podendo ser causado pela ação de catecolaminas em relação à mobilização marginal de neutrófilos além da liberação de linfócitos devido à esplenocontração (MUNOZ, et al., 1999). Além disso, pode estar associado ao dano causado à musculatura, em que pode ocorrer uma resposta imune ativando os leucócitos para que aconteça a sinalização molecular inflamatória, o que culminará com a migração de células inflamatórias para o tecido (NIEMAN; NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994; WALSH, et al., 2011). Neutrófilos podem ser mobilizados para a circulação após o exercício, e podem posteriormente se infiltrar no tecido prejudicado (BEATON, et al., 2002). Entretanto, essas alterações dependem da intensidade e frequência do exercício para provocarem uma resposta imune, podendo aumentar ou diminuir a mesma (ORTEGA, 2003). O fato desse estudo não ter encontrado resultados semelhantes aos demais autores quanto às respostas eritrocitária e leucocitária, pode ser justificada pela aptidão que a raça possui para a realização de exercícios físicos, de modo que os testes não configuraram um desafio suficiente para provocar alterações semelhantes. Além disso, os valores de mantiveram dentro dos intervalos de referência para a espécie (JAIN, 1993), não gerando relevância clínica.

Mesmo sem diferença estatística, foi observada uma tendência ao aumento de neutrófilos e uma diminuição de linfócitos nos momentos M60 e M120, que poderia ser em resposta a liberação de cortisol, em consequência de estresse crônico desenvolvido por esses animais devido a manipulação para coletas sequenciais de amostras de sangue (STOCKHAM; SCOTT, 2008b). Porém, este estudo não mensurou as concentrações de cortisol, que poderiam elucidar esta resposta.

Tabela 02 - Mediana (Percentil 25; Percentil 75) de leucograma de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	M15	M30	M60	M120
Leucócitos (μL)	PI	12120 (8000;17650)	11880 (9800;14300)	13330 (10025;18150)	10700 (8800;15400)	11410 (10300;14850)	11420 (9600;16700)
	PII	15080 (11680;16600)	15110 (10470;16680)	13000 (9880;16680)	12450 (10400;17120)	14100 (10930;17500)	13950 (11200;16720)
Neutrófilos (μL)	PI	7389 (6106;9687)	7991 (6596;10583)	9305 (6129;11935)	7210 (6806;9702)	8910 (7416;9768)	8610 (6816;11644)
	PII	8709 (7128;11159)	9996 (6839;11135)	6838 (6050;11901)	9416 (6720;10716)	10673 (6384;11478)	10336 (7505;11160)
Linfócitos (μL)	PI	2871 (975;3312)	2425 (1573;2851)	2722 (2016;3427)	2247 (1610;2575)	1957 (1308;2656)	1940 (1470;2464)
	PII	2354 (891;3270)	3020 (1584;3432)	2280 (1838;3370)	2835 (1906;3546)	2320 (1313;2934)	1805 (1618;2584)
Eosinófilos (μL)	PI	988 (345;2456)	1188(254;2.123)	914 (340;1756)	858 (264;2324)	1430 (299;1782)	854 (226;1968)
	PII	904 (471;2483)	624 (296;1994)	1596 (490;2746)	357 (294;2179)	420 (138;3119)	380 (95;2842)
Basófilos (μL)	PI	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	PII	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
Monócitos (μL)	PI	450 (364;756)	373 (285;579)	783 (462;996)	774 (249;818)	332 (111;700)	492 (138;616)
	PII	755 (331-1168)	314 (213;495)	541 (292;817)	373 (0;630)	391 (202;580)	448 285;680)

Os cães apresentaram menores valores de contagem de plaquetas em M15 em relação ao momento M0 no PI ($p=0,032$) (Tabela 4). Uma diminuição de plaquetas também foi encontrada em equinos após o término do exercício (ZOBBA, et al., 2011), mas, assim como neste estudo, difere da literatura, que descreve o aumento na contagem de plaquetas em resposta à contração esplênica resultante da liberação de catecolaminas no exercício físico (HIDEO, et al., 1999). Esse achado também pode ser interpretado baseando-se na ocorrência de uma possível estresse agudo ainda no M0, o que levaria a ocorrência de esplenocontração em resposta a ação de adrenalina, que geraria um aumento na contagem de plaquetas (THRALL, 2007). Fato esse, que pode ser observado também no eritrograma deste estudo. Porém, como os valores se

mantiveram dentro da normalidade para a espécie (JAIN, 1993), não há relevância clínica.

Quanto à concentração de PPT, não houve diferença estatística (Tabela 04). A manutenção dos valores de PPT durante os momentos, sem que houvesse aumento após o término do exercício, como observado também em cães da raça Galgo após exercício de corrida (LUCAS, 2015) pode ser em razão da aptidão da raça ao exercício, não demonstrando assim alterações compatíveis com a adaptação necessária a desafios maiores. Os valores de PPT se mantiveram dentro dos valores de referência para a espécie (KANEKO, 2008).

Tabela 03 - Médias \pm desvio-padrão da contagem de plaquetas e mensuração de PPT de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	M15	p	M30	M60	M120
Plaquetas (x10 ³ /μl)	PI	427,3±217,6	306,3±59,2	302,6±52,9*	0,032	334,3±61,8	352,1±54,0	333,9±68,9
	PII	390,2±130,7	323,4±65,1	333,7±72,2		330,2±54,6	323,2±42,4	340,7±47,6
	p							
PPT (g/dl)	PI	6,58±0,37	6,46±0,46	6,60±0,43		6,44±0,50	6,44±0,65	6,50±0,39
	PII	6,73±0,42	6,70±0,39	6,70 ±0,48		6,73±0,58	6,67±0,51	6,61±0,44
	p							

* Diferenças entre momentos em relação ao momento M0.

Na avaliação do estresse oxidativo não foi observada diferença estatística para o MDA, que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica que ocorre como consequência do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (SUN, et al. 2010). Contudo, houve diferença estatística para variável GSH, com maiores valores observados nos momentos M1 (p=0,002), M15 (p=0,007), M30 (p=0,007) e M60 (p=0,049) no PI (Tabela 05). Esse aumento na concentração de GSH pode indicar modificações musculares recentes, mas como ocorre uma adaptação rápida ao exercício com aumento de seus níveis celulares e consequentemente poucas alterações após o exercício por ser parte importante do sistema antioxidante celular

(WILLIAMS, et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em equinos, cujos grupos que realizavam exercício físico em diferentes intensidades apresentaram maiores valores de GSH em relação àquele grupo que não realizava exercício físico (FERNANDES, et al., 2012). O que pode ser explicado fundamentado em outros estudos que indicam que as fibras musculares esqueléticas se adaptam a doses regulares de exercício de alta intensidade aumentando os níveis de GSH (LEEUWENBURGH, et al., 1994).

Tabela 04 - Média \pm desvio-padrão da concentração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	p	M15	p	M30	p	M60	p	M120
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	PI	1,42 \pm 0,60	1,51 \pm 0,04		1,35 \pm 0,45		1,49 \pm 0,03		1,50 \pm 0,03		1,50 \pm 0,03
	PII	1,35 \pm 0,45	1,35 \pm 0,45		1,49 \pm 0,03		1,35 \pm 0,45		1,48 \pm 0,02		1,35 \pm 0,45
GSH (nmol/ μl)	PI	3,75 \pm 0,09	3,97 \pm 0,52*	0,002	3,90 \pm 0,20*	0,007	3,94 \pm 0,19*	0,007	4,00 \pm 0,69*	0,049	3,83 \pm 0,20*
	PII	3,79 \pm 0,11	3,80 \pm 0,13		3,86 \pm 0,38		3,89 \pm 0,44		3,83 \pm 0,18		3,96 \pm 0,60

* Diferenças entre momentos em relação ao momento M0.

Os valores de MDA não apresentaram diferença estatística, porém no PII houve um discreto aumento no momento M15 em relação ao momento M0. O grau de peroxidação lipídica pode ser avaliado por meio da quantificação do acúmulo de subprodutos resultantes desse processo como por exemplo o MDA, que pode servir como índice da intensidade da ocorrência desta reação (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005). A resposta em cães neste estudo para a concentração de MDA foi diferente da encontrada por Yonezawa et al. (2014) em equinos, que observaram aumento após o exercício físico. Porém, a falta de significância pode indicar que o exercício proposto não chegou a gerar um evento de peroxidação lipídica, mas o aumento de GSH logo após o exercício pode ser considerado uma resposta antioxidante satisfatória desses cães, e que como resposta ao estímulo à oxidação, não permitiu que a lipoperoxidação

ocorresse. Contudo a relação entre MDA e GSH não pôde ser considerada já que o teste estatístico não revelou correlação entre as variáveis no PI ($r=0,078$; $p=0,543$) e no PII ($r=0,070$; $p=0,587$). Esse fato foi observado também por Fernandes et al. (2012), que não observaram correlações entre MDA e GSH em equinos de trote submetidos a exercício físico. Em relação aos resultados encontrados, poderia ter sido observada uma correlação positiva entre as variáveis, sendo que, a medida em há aumento de MDA há também elevação nos valores de GSH, como resposta e controle do metabolismo oxidativo.

3.4 CONCLUSÃO

A avaliação da hematologia e de marcadores de estresse oxidativo em cães das raças Australian Cattle Dog e Border Collie submetidos a exercício físico em esteira ergométrica permite concluir que os protocolos de exercício utilizados não produzem alterações relevantes no hemograma, contagem de plaquetas e proteína plasmática total, e além disso, não induz lipoperoxidação, mas foi suficiente para promover resposta antioxidante.

3.5 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproduction Biology Endocrinology** v.3, p.328, 2005.

ANGLE, C.T. et al. Hematologic, serum biochemical, and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, p.370–374, 2009.

BEATON, L.J. et al. Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, p. 798-805, 2002.

CAZZOLA, R. et al. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. **European Journal of Clinical Investigation**, v.33, n.10, p.924-930, 2003.

COUTO, C.G. et al. Haematology of the Spanish Greyhound using IDEXX LaserCyte haematology analyser. **Clin Vet Pequenos Anim**, v.31, p.205-207, 2011.

COWEL, R.L., TYLER, R.D., MEINKOTH, J.H. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 2 ed. Philadelphia: Mosby, 1999.

DAVIS, M.S. et al. Effects of training and strenuous exercise on hematologic values and peripheral blood leukocyte subsets in racing sled dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.232, p.873- 878, 2008.

DAVIS, M.S. **Physiological demands and adaptations of working dogs**. In: HELTON, W. Canine ergonomics: the science of working dogs. Boca Raton, EUA: CRC Press, p. 245-262, 2009.

DZHELEBOV, P.V. et al. Effects of experimental prolonged strenuous exercise on haematological parameters in dogs. **Bulgarian Journal of veterinary Medicine**, v.12, p.112-118, 2009.

ERICKSON, H. H; DETWEILER, D. K. Regulação cardíaca. In: SWENS, M. J.; REECE, W.O. *Dukes fisiologia dos animais domésticos*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.239-251, 2004.

FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária – A arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 735p, 2008.

FERNANDES, W.R. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 677-680, 2012.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **The chemistry of free radicals and related “reactive species”**, Free Radicals in biology and medicine. 4 ed. New York: Oxford. 2007.

HIDEO, I. et al. Norepinephrine, but not epinephrine, enhances platelet reactivity and coagulation after exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, p. 133–138, 1999.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 417p., 1993.

JANIAK, M. et al. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition**, v. 94, p. 137-145, 2009.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6ed. Academic Press, 916p., 2008.

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

LEEUWENBURGH, C. et al. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 439–445, 1994.

LUCAS, V. et al. Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 76, p. 637-643, 2015.

MARLIN, D.J., et al. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **Journal of Nutrition**, v. 132, p.1622-1627, 2002.

MATWICHUK, C.L. et al. Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. **American Journal of Veterinary Research**. v. 60, p. 88–92, 1999.

MUNOZ, A. et al. Cardiovascular and metabolic adaptations in horses competing in cross-country events. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, p. 13–20, 1999.

NIEMAN, D.C; NEHLSSEN-CANNARELLA, .SL. The immune response to exercise. **Seminars in Hematology**, v. 31, p. 166-179, 1994.

ORTEGA, E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. **Exercise Immunology Review**, v. 9, p. 70-93, 2003.

PICCIONE, G. et al. Effect of Moderate Treadmill Exercise on Some Physiological Parameters in Untrained Beagle Dogs. **Experimental Animal**, v.61, p. 511–515, 2012.

ROVIRA, S., MUNOZ A., BENITO, M. Fluid and Electrolyte Shifts During and After Agility Competitions in Dogs. **Clinical Pathology**, v. 69, p.31-35, 2007.

ROVIRA, S.; MUNOZ A.; BENITO, M. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. **Veterinary Medicine**, v. 53, p. 333–346, 2008.

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

STOCKHAM, S.L.; SCOTT M.A. **Eritrócitos**. In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT M.A. Fundamentos de patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Guanabara Koogan. p. 107-222. 2008a.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT M.A. **Leucócitos**. In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT M.A. Fundamentos de patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Guanabara Koogan. p. 53-106. 2008b.

SUN, L. et al. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sciences**, v.86, p.39-44, 2010.

THRALL, M. A. **Classificação e diagnóstico de policitemia**. In: THRALL, M. A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca, p. 114-117, 2007.

TODOVORA, I. et al. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. **Comparative Clinical Pathology**, v.13, p.190-194, 2005.

WALSH, N.P; et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 17, p. 6-63, 2011.

WILLIAMS, C.A. et al. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 588-594, 2004.

YONEZAWA, L.A.; BARBOSA, T.S.; WATANABE, M.J. Metabolismo oxidativo e cardíaco de equinos submetidos a exercício de baixa intensidade antes e após suplementação com antioxidante. **Ciência Rural**, v.44, n.6, p.1060-1065, 2014.

ZOBBA, R. et al. Physical, hematological and biochemical responses to acute intense exercise in polo horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.31, p.542-548, 2011.

4 CAPÍTULO II

Capítulo 2: Avaliação de variáveis bioquímicas em cães de pastoreio submetidos a exercício físico em esteira ergométrica.

RESUMO

O exercício físico pode induzir alterações celulares, dependendo da sua intensidade e duração. O conhecimento dos limites a partir dos quais essas alterações ocorrem é de grande importância principalmente para o diagnóstico e tratamento de cães utilizados em trabalhos que exigem esforço físico. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes variáveis bioquímicas clínicas em cães submetidos a exercícios de diferentes intensidades. Para isso, foram utilizados 11 cães de pastoreio machos e fêmeas, adultos, clinicamente saudáveis. Após a seleção dos animais, estes foram submetidos a dois testes de exercício, com pelo menos sete dias de intervalo entre eles. O protocolo I (PI) consistiu em exercício de longa duração e baixa velocidade, sendo que cada cão foi submetido a 40 minutos ao passo na velocidade de 3,8 km/h, com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. No protocolo II (PII) cada um dos cães foi submetido ao exercício de curta duração e alta velocidade, iniciando com 5 min ao passo a 3,8 km/h, 5 min ao trote a 7,0 km/h e por fim 5 min ao passo a 3,8 km/h também com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. A avaliação das enzimas musculares foi realizada por meio da determinação da atividade de aspartato aminotransferase (AST) e creatinaquinase (CK). Ainda foram mensuradas as concentrações de lactato e glicose plasmáticos, além de ureia e creatinina séricas. Os cães foram avaliados antes do exercício (M0), imediatamente após o exercício (M1), e em 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício. Os valores das enzimas musculares e de lactato não apresentaram diferença estatística. Já a concentração de creatinina foi estatisticamente menor em M120 no PI e maior em M1 e M30 no PII. A concentração de glicose apresentou aumento no PI em M120, e em M15, M30, M60 e M120 no PII. Além disso, em M30 foi observado um maior valor no PII em relação ao PI. Desse modo, foi possível concluir que exercício de diferentes durações e intensidades provocaram alterações bioquímicas, porém a intensidade e duração do exercício neste estudo não apresentou um desafio muito evidente para estes cães.

Palavras chave: Exercício físico. Cães. Pastoreio. Enzimas musculares. Bioquímica clínica.

ABSTRACT

Physical exercise can induce cellular changes depending on intensity and duration. Knowledge of the limits from which these alterations occur has great importance mainly for the diagnosis and treatment of dogs used in works that require physical effort, which can vary in intensity. The objective of this study was to evaluate different clinical biochemical variables in dogs submitted to exercise of different intensities. For this purpose, 11 male and female, adult herding dogs healthy were used. After the selection of the animals, they underwent two exercise tests, with at least seven days interval. The protocol I (PI) consisted of a long duration and low intensity exercise, which each dog walked for 40 minutes at 3.8 km/h, at horizontal position (0% inclined). In the protocol II (PII), each dog underwent short duration and high intensity exercise test, starting with a walk for 5 min at 3.8 km/h, trot for 5 min at 7.0 km/h and walk again for 5 min at 3.8 km/h, also with the treadmill at horizontal position (0% inclined). Muscle enzymes were evaluated by determining the activity of aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK). Plasma lactate and glucose levels, as well as serum urea and creatinine levels, were measured. The dogs were evaluated before exercise (M0), immediately after exercise (M1), and at 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) and 120 (M120) minutes after the exercise. The values of muscle enzymes and lactate were not statistically different. The creatinine concentration was statistically lower at M120 in PI and higher at M1 and M30 in PII. The glucose concentration increased in PI at M120, and at M15, M30, M60 and M120 in PII. In addition, at M30 a higher value was observed in PII in relation to PI. Thus, it was possible to conclude that the exercise of different durations and intensities caused biochemical changes, but the intensity and duration of exercise in this study did not present a very evident challenge for these dogs.

Keywords: Physical exercise. Dogs. Herding. Muscle enzymes Clinical biochemistry.

4.1 INTRODUÇÃO

O exercício físico pode induzir uma série de alterações em fluidos, eletrólitos e balanço ácido-básico, mas dependem de vários fatores como intensidade e duração do exercício, nível de treinamento, termorregulação e condições climáticas (HINCHCLIFF, et al., 1997). A avaliação de uma possível lesão muscular é bastante utilizada em animais atletas, na qual a determinação da atividade sérica das enzimas musculares ocupa papel importante, sendo as principais enzimas avaliadas a creatinaquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e a lactato desidrogenase (LDH). Suas atividades séricas aumentam quando ocorre lesão muscular esquelética e/ou cardíaca (CARDINET, 1997; GONZÁLEZ, 2006).

A enzima AST está presente em muitos tecidos como duas isoformas, no citosol e na mitocôndria, sendo mais abundante no fígado e nos músculos, é utilizada como indicador de danos nesses tecidos (VALBERG, 2008), e a lesão muscular indicada pela AST pode ser reversível ou irreversível (STOCKHAM; SCOTT, 2008a). O comportamento das enzimas CK e AST é diferente, sendo que a CK apresenta aumento e depuração anteriores à AST (GONZÁLEZ, 2006), tendo um pico de quatro a seis horas após a realização do exercício (MACLEAY, et al., 2000), e níveis persistentemente altos indicativos de lesão contínua. Assim, o padrão dessas enzimas pode indicar o estágio do problema (GONZÁLEZ, 2006). Entre as causas de aumento da atividade sérica de CK se destaca o exercício de alta intensidade (STOCKHAM, 1995). Comparando diferentes intensidades de exercício em equinos, Siciliano et al. (1995) observaram que as atividades de CK e AST foram mais intensas em resposta ao exercício moderado quando comparado com o exercício intenso. O aumento da atividade dessas enzimas também foi observado em galgos após exercício físico (LUCAS, et al., 2015).

Outra avaliação laboratorial importante relacionada ao exercício é a mensuração do lactato, que é produzido como produto do trabalho muscular durante todo tipo de exercício. A relação entre sua concentração sanguínea e a velocidade de exercício pode ilustrar a situação na qual a contribuição do metabolismo aeróbico começa a ser insuficiente frente aos requisitos energéticos totais (ERICKSON, 1996). No exercício realizado em alta velocidade, no qual a carga de trabalho está entre 65% a 85% do consumo máximo de oxigênio, as células mantêm o requisito energético de

ATP para a contração muscular por meio do metabolismo anaeróbico da glicose, que resultam no acúmulo do ácido láctico nas células musculares com consequente desenvolvimento de acidemia (EVANS, 2000). A glicose é a principal fonte energética para a contração muscular que ocorre, predominantemente, por via aeróbica, nos animais submetidos a provas de longa duração (FERNANDES; LARSSON, 2000), fatores endócrinos como insulina, glucagon, adrenalina e noradrenalina são importantes reguladores do fluxo de glicose durante o exercício (COGGAN, 1991).

O músculo esquelético responde por cerca de 90% do oxigênio total consumido durante um trabalho muscular muito ativo. No sistema contrátil das células dos músculos esqueléticos, a miosina e a actina são especializadas na transdução de energia química, a partir da hidrólise de ATP, em movimento mecânico. A quantidade de ATP armazenada no músculo é relativamente pequena, por isso a capacidade de executar uma intensidade de exercício depende da taxa de produção de ATP a partir de outras fontes, sendo utilizados ácidos graxos, corpos cetônicos e glicose como substratos, dependendo do grau de atividade muscular (LEHNINGER, et al., 2014). O músculo é, provavelmente, o tecido corporal com maior variação na sua taxa metabólica, uma vez que o músculo em repouso dispende muito pouca energia enquanto um músculo em exercício máximo pode aumentar o seu metabolismo em 20 vezes ou mais (DAVIS, 2009).

O exercício físico, dentre outros fatores pré renais como a desidratação, podem causar aumento nas quantidades de ureia e creatinina, que são marcadores de função renal (McGWAN; HODGSON, 2014). A ureia se origina da metabolização hepática de compostos nitrogenados e é eliminada do organismo por via renal (FERNANDES; LARSSON, 2000). A maior parte da ureia é excretada pelos rins e, por isso, é considerada um dos índices que avaliam a taxa de filtração glomerular, com valores inversamente proporcionais (SCHOSSLER, et al., 2001). Em estudos realizados com equinos sob exercício, foram verificadas alterações relacionadas à dosagem de ureia, antes e após o exercício, como descrito por Fernandes et al. (2010).

Da mesma forma que a ureia, a creatinina é utilizada na avaliação da função renal, a maior parte da creatinina se origina da creatina endógena. Os aminoácidos arginina e glicina se combinam para formar guanidinoacetato no pâncreas, rins e intestino delgado. No fígado, a metionina fornece um grupo metil para conversão de guanidinoacetato em creatina, que circula no plasma e é captada pelos músculos, onde a energia é armazenada na forma de fosfocreatina e, por meio de uma quebra

não enzimática espontânea, origina-se a creatinina. Este produto não sofre apreciável metabolismo, sendo excretado quase que exclusivamente por filtração glomerular (CHEW; Di BARTOLA, 1992). A massa muscular individual é um dos principais fatores limitantes à utilização da creatinina, uma vez que a sua concentração plasmática é reflexo da sua produção. Quando há lesão de miócitos com adequada função renal, o excesso de creatinina é rapidamente removido do plasma (MARTINEZ, et al., 2003; HOJS, et al., 2006).

Todas as possíveis alterações bioquímicas relacionadas ao exercício podem ser expressas em diferentes modos ou intensidades, nas diferentes espécies e raças. Assim, este estudo procurou avaliar a resposta demonstrada em exames bioquímicos frente ao exercício físico realizado por cães de raça com aptidão ao trabalho de pastoreio.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pela Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob o número de protocolo 1.07.15.

Local

O estudo foi realizado nas dependências do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages/SC e contou com a colaboração dos Serviços do Laboratório Clínico Veterinário e do Serviço de Cardiologia Veterinária da instituição.

Animais

Foram utilizados 11 cães adultos de raças com aptidão ao pastoreio, sendo sete animais da raça Australian Cattle Dog, quatro machos e três fêmeas com peso médio de $20,9 \pm 4,5$ kg e idade média de $3,1 \pm 2,2$ anos, e quatro animais da raça Border Collie, dois machos e duas fêmeas com peso médio de $17,8 \pm 1,7$ kg e $1,0 \pm 0,7$ anos de idade, clinicamente sadios. Os cães foram provenientes de proprietários particulares que permitiram sua participação nesse estudo mediante termo de consentimento. Para avaliação da higidez foi obtido o histórico dos animais, e os mesmos foram avaliados por meio de exame físico completo (FEITOSA, 2008), hemograma (JAIN, 1993) e de bioquímica sérica, para constatação de higidez. Os animais foram submetidos a jejum hídrico de duas horas e sólido de no mínimo 4 horas.

Testes de exercício físico

Os animais foram submetidos ao exercício em esteira sem condicionamento prévio, apenas com adaptação ao aparelho, com o objetivo de avaliar os animais sem treinamento, eram mantidos na esteira por meio de estímulos visuais e auditivos. Foram submetidos a dois testes de exercício físico em esteira ergométrica (Johnson Treo T101, Indaiatuba-SP), com no mínimo 7 dias de intervalo entre eles. Os protocolos de exercício foram baseados no estudo de Piccione et al. (2012) com modificações. Os testes foram realizados sempre no mesmo período do dia.

Protocolo I (PI) exercício de longa duração e baixa velocidade: duração de 40 minutos na velocidade de 3,8 km/h ao passo e 0% de inclinação da esteira.

Protocolo II (PII) exercício de curta duração e alta velocidade): duração de 5 min na velocidade de 3,8 km/h ao passo, seguido de 5 min na velocidade de 7,0 km/h ao trote e 5 min na velocidade de 3,8 km/h (período de desaquecimento), com 0% de inclinação da esteira.

Amostras

As amostras de sangue foram colhidas por meio de punção da veia jugular, sendo colhidos cerca de 10 mL de sangue por momento. Foram utilizadas agulhas 21G (BD Vacutainer, Juiz de Fora-MG) em sistema a vácuo, sendo acondicionados 8 mL de sangue em tubos sem anticoagulante, com ativador e separador do coágulo (BD Vacutainer, Juiz de Fora-MG) para obtenção de soro e 2 mL de sangue em tubos contendo fluoreto de sódio (BD Vacutainer, Juiz de Fora-MG) para obtenção de plasma com fluoreto, ambos destinados às dosagens bioquímicas.

Momentos

As amostras foram colhidas em momentos pré-estabelecidos em ambos os testes de exercício físico: momento M0 anterior ao início do exercício físico, no

primeiro minuto após o término do exercício (M1) e 15, 30, 60 e 120 minutos após o término do exercício, denominados de momentos M15, M30, M60 e M120, respectivamente.

Dosagens bioquímicas

Para a realização das dosagens dos parâmetros bioquímicos, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000g para a obtenção de soro e plasma, que foram posteriormente acondicionados em microtubos de polipropileno e armazenados a -20°C até o processamento. Foram realizadas as dosagens séricas da atividade de creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) pelo método UV, e da concentração de ureia (método enzimático UV) e creatinina (método Picrato alcalino-Jaffé). As dosagens de lactato (método enzimático-Trinder) e glicose (metodologia GOD-Trinder) foram realizadas nas amostras de plasma com fluoreto de sódio. Todas as dosagens foram realizadas por meio de testes colorimétricos com kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa-MG) em analisador automático (Labmax Pleno, Labtest, Lagoa Santa-MG).

Análise estatística

Inicialmente, os valores foram analisados segundo a sua distribuição pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram analisados estatisticamente comparando o momento M0 aos momentos subsequentes, e entre testes para cada momento. A análise dos dados foi realizada pelo teste t pareado para dados paramétricos e pelo teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Foi realizada ainda a correlação pelo teste de Pearson entre as variáveis. As análises foram processadas com o auxílio de programa estatístico computadorizado (GraphPad Prism versão 5) com o nível de significância de 5%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais de ambas as raças, completaram os dois protocolos de exercício sem intercorrências.

Os valores das enzimas musculares não revelaram diferença estatística (Tabela 06), o que diverge dos resultados encontrados na literatura em cães de trenó em exercícios longos (QUERENGAESSER, et al., 1994; WAKSHLAG, et al., 2010), em cães da raça Beagle em exercício em esteira (PICCIONE, et al., 2012), em equinos praticando polo (ZOBBA, et al. 2011) e em humanos em maratona (KANDA, et al., 2014), que sugerem um aumento na atividade sérica de CK após atividade física o que tem sido associado à lesão muscular, que pode ainda resultar em dor, diminuição da amplitude de movimento, inchaço e queda de desempenho (McLELLAN, et al., 2011). A mensuração da atividade AST sobretudo em conjunto com a da CK sérica pode indicar se a lesão muscular está resolvida ou se está se apresentando de forma contínua (SCOTT MONCRIEFF, et al., 1990). Segundo Procajlo et al. (2006), que estudou o exercício em cães de trenó, a falta de treinamento e consequente adaptação física ao exercício é o responsável pela ocorrência de lesões musculares, e consequentemente do aumento da atividade das enzimas musculares. Nesse estudo, os cães não foram submetidos a treinamento para o exercício físico realizado, e, esses achados podem evidenciar a aptidão da raça para o exercício físico, não representando estes protocolos propostos, desafio suficiente para que fossem observadas alterações musculares.

Tabela 05 - Mediana (Percentil 25; Percentil 75) da atividade sérica de creatina-quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e concentração plasmática de lactato e glicose de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	M15	p	M30	p	M60	p	M120	p
CK (UI/L)	PI	96 (68;117)	94 (65;121)	90 (68;143)		93 (68;113)		84 (62;112)		70 (59;99)	
	PII	84 (73;153)	105 (47;155)	72 (56;137)		92 (44;164)		83 (42;194)		75 (31;130)	
AST (UI/L)	PI	22 (16;31)	23 (19;30)	24 (20;30)		24 (18;29)		24 (17;26)		21 (17;27)	
	PII	24 (15;34)	21 (16;29)	22 (15;29)		25 (14;28)		20 (17;26)		23 (15;31)	
Lactato (nmol/L)	PI	1,22 (0,67;4,00)	1,11 (0,67;2,11)	1,11 (0,56;2,11)		1,11 (0,56;2,11)		1,00 (0,67;2,89)		1,00 (0,56;2,11)	
	PII	1,33 (0,67;3,66)	1,55 (0,89;2,44)	1,33 (0,56;2,44)		1,22 (0,78;2,00)		1,00 (0,56;1,89)		1,00 (0,67;1,89)	
Glicose (mg/dL)	PI	102,0 (96;110)	104,0 (92;112)	106,0 (95;110)		104,0 (89;109) ^A		109,0 (91;119)		117,0 (107;120) [*]	0,03
	PII	105,0 (94;108)	98,5 (90;108)	109,0 (100;118) [*]	0,038	108,0 (103;119) [*] B	0,012	115,0 (108;120) [*]	0,0005	120,0 (109;134) [*]	0,0003
	p					0,035					

^{*} Diferenças entre momentos em relação ao momento M0.

^{AB} Diferenças entre grupos nos mesmos momentos.

Os valores de lactato, embora tenham demonstrado um discreto aumento logo após o exercício no PII, não apresentaram diferença significativa (Tabela 6). O aumento de lactato é amplamente descrito na literatura (ROVIRA; MUNOZ; BENITO, 2007a; ROVIRA; MUNOZ; BENITO 2007b; ROVIRA, 2008; PICCIONE, et al., 2012), pois o mesmo começa a ser produzido quando o oxigênio não é suficiente para produzir toda a energia que é necessária para o esforço físico. No entanto, o sistema cardiovascular tem uma capacidade de reserva de tal maneira que o metabolismo anaeróbico (limiar de lactato) não se inicia até que a tensão de oxigênio no sangue venoso diminua a um determinado valor (KITTLESON, et al., 1996). No cão, em contraste com o que é observado em humanos e em equinos, um aumento da carga de trabalho no exercício não parece induzir alterações abruptas na concentração do lactato sanguíneo, embora variações significativas tenham sido observadas entre as diferentes fases de esforço (FERASIN; MARCORA, 2009).

A concentração de glicose foi estatisticamente maior em M120 no PI, e em M15, M30, M60 e M120 no PII. Além disso, a glicemia em M30 no teste PII foi maior do que PI (Tabela 06). Esse aumento pode estar associado a uma importante ação simpática com subsequente redução de insulina (ROVIRA, et al., 2007b) relacionada à liberação das catecolaminas no exercício físico. Esse achado corrobora com Angle et al. (2009), que também encontraram o aumento na concentração de glicose após o exercício em cães de várias raças em treino com trenó. Porém, várias citações na literatura não descreveram alterações significativas em relação à glicose (ROVIRA, et al., 2007b; ROVIRA, et al., 2008) ou relataram uma diminuição gerada por uma hipoglicemia causada pelo exercício (PICCIONE, et al., 2012). Esse aumento observado principalmente nos momentos M60 e M120 podem ainda ser resultado da ação de cortisol, em consequência ao possível estresse crônico sofrido por esses animais em virtude da manipulação para coleta de amostras de sangue (STOCKHAM; SCOTT, 2008b).

Na avaliação da função renal foi observada diferença significativa somente para a concentração de creatinina sérica (Tabela 7), que se apresentou menor no PI em M120 e um maior no PII em M1 e M30. Uma diminuição na concentração de creatinina também foi observada por Wakshlag et al. (2010), porém com um protocolo de exercício muito mais intenso. Como os valores se mantiveram dentro da referência (KANEKO, 2008) para espécie, essa diferença pode ser oriunda de um achado ocasional. O aumento na concentração de creatinina logo após o exercício e em M30 em PII pode ser justificado pelo aumento da formação em virtude do catabolismo muscular durante o exercício e diminuição na excreção renal durante o exercício (ROVIRA, 2008), fato também encontrado em cães de trenó (QUERENGAESSER, et al., 1994; ANGLE, et al., 2009).

Tabela 06 - Média \pm desvio-padrão da concentração sérica de ureia e creatinina de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	p	M15	M30	p	M60	M120	p
Ureia (mg/dL)	PI	37,0 \pm 11,6	38,9 \pm 10,3		33,9 \pm 6,65	36,9 \pm 11,1		37,0 \pm 11,1	35,3 \pm 12,0	
	PII	35,5 \pm 4,1	36,5 \pm 15,7		35,0 \pm 13,7	35,7 \pm 15,4		31,8 \pm 14,7	30,0 \pm 11,2	
	P									
Creatinina (mg/dL)	PI	1,24 \pm 0,20 ^a	1,28 \pm 0,25		1,25 \pm 0,21	1,26 \pm 0,26		1,22 \pm 0,19	1,19 \pm 0,19 ^b	0,045
	PII	1,22 \pm 0,24 ^a	1,36 \pm 0,30 ^b	0,012	1,27 \pm 0,27	1,29 \pm 0,27 ^b	0,023	1,24 \pm 0,26	1,24 \pm 0,23	
	P									

^{ab} Diferenças entre momentos em relação ao momento M0.

A avaliação dos dados por testes de correlação poderia revelar correlação positiva entre as variáveis estudadas, CK, AST e lactato, que podem apresentar a tendência de aumento conjuntamente. Porém, os testes de correlação realizados entre CK e lactato (PI $r=0,178$; $p=0,162$; PII $r=0,106$; $p=0,429$), CK e AST (PI $r=0,149$; $p=0,245$; PII $r=0,165$; $p=0,216$) e AST e lactato (PI $r=0,2158$; $p=0,085$; PII $r=-0,064$; $p=0,615$) não foram estatisticamente significativos. Além disso, a correlação entre lactato e glicose (PI $r=-0,190$; $p=0,129$; PII $r=-0,053$; $p=0,674$) também não foi estatisticamente significativa, diferente do que foi observado em humanos submetidos a exercício físico (OLIVEIRA et al., 2006).

4.4 CONCLUSÃO

Segundo os resultados observados pôde-se concluir que os cães das raças Australian Cattle Dog e Border Collie submetidos aos testes de exercício físico sob as condições utilizadas nesse estudo não apresentaram lesões musculares ou alterações na função renal e glicemia relevantes.

4.5 REFERÊNCIAS

ANGLE, C.T. et al. Hematologic, serum biochemical, and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, p. 370–374, 2009.

CARDINET, G. H. **Skeletal Muscle Function**. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, p. 426-429, 1997.

CHEW, D.J., Di BARTOLA, S.P. **Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal**. In: ETTINGER, S.J. Tratado de medicina interna veterinária, São Paulo: Manole, cap. 107. p.1975-2046, 1992.

COGGAN, A.R. et al. Plasma glucose metabolism during exercise in humans. **Sports Med**, v.11, p.102-124, 1991.

DAVIS, M.S. **Physiological demands and adaptations of working dogs**. In: HELTON, W. Canine ergonomics: the science of working dogs. Boca Raton, EUA: CRC Press, p. 245-262, 2009.

ERICKSON, H.H. **Fisiologia do exercício**. In: SWENS, M. J.; REECE, W.O. Dukes fisiologia dos animais domésticos. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.278-296, 2004.

EVANS, D.L. **Training and fitness in athletic horses**. Sidney: RIRDC, 87p. 2000.

FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária – A arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 735p, 2008.

FERASIN, L; MARCORA, S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador Retrievers. **Journal of Compared Physiology**, v. 179, p. 839-845, 2009.

FERNANDES, W. R. et al. Avaliação dos níveis séricos de ureia, creatinina, sódio e potássio em cavalos da raça PSI submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, p. 359-366, 2010.

FERNANDES, W. R.; LARSSON, M. H. M. A. Alterações nas concentrações séricas de glicose, sódio, potássio, ureia e creatinina em equinos submetidos a provas de enduro de 30km com velocidade controlada. **Ciência Rural**, v. 30, p. 393-398, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. In: GONZÁLEZ, F. H. D; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2 ed. Porto Alegre: Editora URGs, 198p. 2006.

HINCHCLIFF, W.K. et al. Exercise-associated hyponatremia in Alaskan sled dogs: urinary and hormonal responses. **Journal of Applied Physiology**, v.83, p. 824–829, 1997.

HOJS, R.; et al. Serum cystatin C as an endogenous marker of renal function in patients with mild to moderate impairment of kidney function. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 1855-1862, 2006.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 417p., 1993.

KANDA, K. Evaluation of serum leaking enzymes and investigation into new biomarkers for exercise induced muscle damage. **Exercise Immunology Review**, v. 20, p.20-39, 2014.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6ed. Academic Press, 916p., 2008.

KITTLESON, M. D; JOHSON, L. E; PION, P. D. Submaximal exercise testing using lactate threshold and venous oxygen tension as endpoints in normal dogs and in dogs with heart failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, p. 21-27, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 6°ed. Porto Alegre: Artmed, 1298p., 2014.

LUCAS, V. et al. Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 76, p. 637-643, 2015.

MACLEAY, J. M. et al. Effect of ration and exercise on plasma creatine kinase activity and lactate concentration in Thoroughbred horses with recurrent exercional rhabdomyolysis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 1390-1395, 2000.

MARTINEZ, I. et al. Polypoid cystitis in 17 dogs (1978-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17, p. 499-509, 2003.

McGWAN, C.M.; HODGSON, D.R. **Hematology and Biochemistry**. In: HODGSON, D.R.; McKEEVER, K.H.; McGOWAN, C.M. The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine. 2 ed. St. Louis: Elsevier Saunders, p.64, 2014.

McLELLAN, C.P. et al. Biochemical and endocrine response to impact and collision during elite rugby league match play. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 25, p, 1553–1562, 2011.

OLIVEIRA, J.C. et al. Identificação de lactato e limiar glicêmico em exercícios resistidos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.12, p. 1-6,2006.

PICCIONE, G. et al. Effect of Moderate Treadmill Exercise on Some Physiological Parameters in Untrained Beagle Dogs. **Experimental Animals**. v.61, p. 511–515, 2012.

PROCAJLO, A. Diagnostic efficacy of indicators of muscle damage in sled dogs during training. **Meddycyna Weterynaryjna**, v. 62, p.306–310, 2006.

QUERENGAESSER, A.; IBSEN, C., LEIBETSEDER, J. Blood changes during training and racing in sled dogs. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 2760–2764, 1994.

ROVIRA, S. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. **Veterinary Medicine**, v.58, p.333-346, 2008.

ROVIRA, S., MUNOZ A., BENITO, M. Fluid and Electrolyte Shifts During and After Agility Competitions in Dogs. **Clinical Pathology**. v. 69, p.31-35, 2007a.

ROVIRA, S., MUNOZ A., BENITO, M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 36, p. 30-35, 2007b.

SCHOSSLER, D. et al. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e ketoprofeno durante o trans e pós-operatório. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, p. 46-51, 2001.

SCOTT MONCRIEFF, J.C; HAWKINS, E.C; COOK, J.R. Canine muscle disorders. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 12, p. 31-39, 1990.

SICILIANO, P. D. et al. Effect of conditioning and exercise type on serum creatinekinase and aspartate aminotransferase activity. **Equine Veterinary Journal, London**, v.27, p. 243-247, 1995.

STOCKHAM, S. L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.11, p. 393-408, 1995.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT M.A. **Enzimas**. In: Fundamentos de patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Guanabara Koogan. p. 639-764. 2008a.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT M.A. **Leucócitos**. In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT M.A. Fundamentos de patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Guanabara Koogan. p. 53-106. 2008b.

VALBERG, S. J. **Skeletal muscle function**. In: KANEKO, J; HARVEY, J; BRUSS, M. Clinical biochemistry of domestic animals. 6 ed. Ed Academic Press, p. 459-484, 2008.

WAKSHLAG, J. J. et al. Evaluation of exercise-induced changes in concentration of C-reactive protein and serum biochemical values in sled dogs completing a long-distance endurance race. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 1207-1213, 2010.

ZOBBA, R. et al. Physical, hematological and biochemical responses to acute intense exercise in polo horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 542-548, 2011.

5 CAPÍTULO III

Capítulo 3: Determinação da albumina modificada pela isquemia em cães de pastoreio submetidos a exercício físico em esteira ergométrica.

RESUMO

Cães de pastoreio podem desenvolver atividades que envolvem exercícios de grande intensidade. Os níveis mais altos de exercício podem ter relação com o trabalho muscular com menores níveis de oxigênio. A hipóxia gerada pode levar à isquemia tecidual, e a albumina modificada pela isquemia (AMI) mostra-se como um marcador precoce para avaliação de eventos isquêmicos. Por isso, este estudo objetivou a avaliação do efeito de exercícios de diferentes intensidades com o intuito de avaliar esse marcador precoce de isquemia em cães sob esse possível modelo de isquemia tecidual. Para isso, foram utilizados 11 cães de pastoreio machos e fêmeas, adultos, hípidos. Após a seleção dos animais, os mesmos foram submetidos a dois testes de exercício, com pelo menos sete dias de intervalo entre eles. O protocolo I (PI) consistiu em um exercício de longa duração e baixa velocidade, no qual cada cão foi submetido a 40 minutos ao passo na velocidade de 3,8 km/h, com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. No protocolo II (PII) cada um dos cães foi submetido ao exercício de curta duração e alta velocidade, iniciando com 5 min ao passo a 3,8 km/h, 5 min ao trote a 7,0 km/h e por fim 5 min ao passo a 3,8 km/h também com a esteira na posição horizontal, sem inclinação. A avaliação das proteínas foi realizada por meio da dosagem bioquímica de proteína sérica total (PST) e albumina, e da obtenção do valor de globulinas pela diferença entre elas. Para a análise da isquemia foi realizada a mensuração da AMI. Os cães foram avaliados antes do exercício (M0), imediatamente após o exercício (M1), e em 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício. Os dados foram comparados entre momentos e entre testes, por meio dos testes t e de Mann-Whitney. Foi realizada ainda a correlação pelo teste de Pearson entre as variáveis. Após a análise estatística dos resultados foi observado que os cães quando submetidos ao PII manifestaram aumento na concentração da AMI em M15, sendo maior também em relação ao PI. Além disso houve correlação entre as variáveis AMI e albumina. Este estudo, nestas condições, demonstrou que o exercício de curta duração e alta velocidade induz isquemia suficiente para alterar a concentração de AMI.

Palavras chave: Exercício físico. Cães. Pastoreio. Proteínas. Albumina modificada pela isquemia.

ABSTRACT

Herding dogs can develop activities that involve intense exercise. Higher levels of exercise may be related to muscle work with lower oxygen levels. Hypoxia may lead to tissue ischemia. Studies on the early marker of ischemia, ischemia-modified albumin (AMI), have been increasing in human medicine to assess ischemic events. Therefore, this study aimed to perform laboratory evaluation of dogs submitted to exercise of different intensities in order to evaluate this early marker of ischemia as possible model of tissue ischemia. For this purpose, 11 male and female, adult herding dogs healthy were used. After the selection of the animals, they underwent two exercise tests, with at least seven days interval. The protocol I (PI) consisted of a long duration and low intensity exercise, which each dog walked for 40 minutes at 3.8 km/h, at horizontal position (0% inclined). In the protocol II (PII), each dog underwent short duration and high intensity exercise test, starting with a walk for 5 min at 3.8 km/h, trot for 5 min at 7.0 km/h and walk again for 5 min at 3.8 km/h, also with the treadmill at horizontal position (0% inclined). Serum protein and albumin was measured by biochemical assay, and the globulin value obtained by the difference among them. AMI was measured as ischemia index. The dogs were evaluated before exercise (M0), immediately after exercise (M1), and at 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) and 120 (M120) minutes after the exercise. The data were compared between moments and between tests, using the t test and Mann-Whitney test. After the statistical analysis of the results, it was observed that the dogs when submitted to the PII showed an increase in the AMI concentration at M15, being also greater in relation to the PI. In addition, there was a correlation between AMI and albumin variables. This study, under these conditions, demonstrated that the exercise of short duration and high velocity induces sufficient ischemia to alter the concentration of IMA.

Keywords: Physical exercise. Dogs. Herding. Proteins. Ischemia-modified albumin.

5.1 INTRODUÇÃO

O exercício ou treinamento podem ser causas de variações fisiológicas com correspondentes alterações nos componentes hematológicos periféricos em várias espécies, e podem refletir em adaptações fisiológicas apropriadas às demandas do exercício (KINGSTON, 2004) ou em anormalidades patofisiológicas em decorrência do estresse causado pelo exercício (RICKETTS, 2004). Além disso, o exercício induz modificações significativas em alguns parâmetros laboratoriais que devem ser diferenciados daqueles causados por doença ou exaustão (ROVIRA, 2008).

O fornecimento de energia para a contração muscular no exercício pode ser derivado dos metabolismos aeróbio e anaeróbio. Durante o exercício, existe uma zona de transição na qual ocorre mudança da predominância de metabolismo aeróbio para o anaeróbio. Essa zona de transição é considerada importante na avaliação do condicionamento físico e na prescrição de treinamento (TEGTBUR, et al., 2001). Quando o consumo de oxigênio muscular aumenta abruptamente, o mecanismo imediato para suprir a demanda é um processo de extração do oxigênio das moléculas de hemoglobina do sangue circulante. Normalmente, no músculo em descanso a extração de oxigênio ocorre entre 20 a 40% e aumenta para 70 a 80% com o exercício (PROCTOR, et al., 1998; BEEKVELT, et al., 2001).

A isquemia é um processo que ocorre em virtude da demanda circulatória ser mais elevada em relação à circulação sanguínea, de modo que a oxigenação celular se torna inadequada (GAZE, 2009). A restrição do fornecimento de oxigênio aos tecidos causa prejuízo à demanda tecidual por oxigênio para o metabolismo celular normal (HAZINI, et al., 2015). A dosagem da albumina modificada pela isquemia (AMI) vem sendo utilizada como um marcador para detecção de isquemia cardíaca e indicador de estresse oxidativo (MA, et al., 2012). A mensuração de AMI é realizada indiretamente pelo método de ligação do cobalto à albumina, sendo que uma quantidade de cobalto constante reage com o soro do paciente e se liga à albumina, enquanto que o cobalto não ligado remanescente é mensurado por espectrofotometria (YONEZAWA, et al., 2010). Uma das proteínas mais abundantes do sangue é a albumina que é sintetizada pelo fígado, tem baixo peso molecular (66,5 kDa) e é solúvel em água. Entre outras funções, atua na manutenção da osmolaridade entre o compartimento sanguíneo e intersticial, transporte de fármacos e metais

(BHAGAVAN, 2003). Tem grande capacidade de se ligar a vários tipos de moléculas pequenas, apresentando capacidade de ligação a muitos compostos endógenos e exógenos como ácidos graxos, íons metálicos, fármacos e hormônios. A flexibilidade da estrutura da albumina se adapta prontamente aos ligantes e seus três domínios fornecem uma variedade de sítios de ligação de baixa e alta afinidade (PETERS, 1995). Contudo, níveis de albumina sérica altos por causas como desidratação e dieta rica em proteínas, ou baixos no caso de comprometimento na síntese hepática, má absorção, redução de captação proteica ou aumento da permeabilidade capilar podem afetar os resultados de AMI, produzindo baixos ou altos valores, respectivamente (LIPPI, et al., 2007).

A porção aminoterminal da albumina plasmática normalmente tem afinidade com metais de transição como o cobalto, cobre e níquel. Em condições de isquemia, a falta de oxigênio induz uma série de reações envolvendo espécies reativas de oxigênio (ERO), levando à alteração da estrutura aminoterminal da albumina e produzindo a AMI com baixa afinidade aos metais (YONEZAWA, et al., 2012). Além da hipóxia, condições como acidose, redução da tensão de oxigênio, disfunção da bomba de íons e geração de radicais livres podem promover modificações no sítio de ligação e diminuir essa capacidade de afinidade pelo cobalto (BHAGAVAN, et al., 2003; CHO, 2007). Essa alteração conformacional da albumina ocorre muito rapidamente após a isquemia, com um pico em 6 horas, permanecendo por até 12 horas após o evento isquêmico em humanos (BAR-OR et al., 2001). Vários outros processos isquêmicos em que há alterações vasculares de pH, hipóxia ou outro mecanismo que desencadeie o estresse oxidativo, podem levar à formação de AMI. Dessa forma, a AMI pode também representar um marcador clínico na isquemia do músculo esquelético (FALKENSAMMER, et al, 2007) e possui um alto valor diagnóstico, como um marcador de isquemia tecidual e de lesão oxidativa em uma infinidade de doenças (SCHNELLE, et al., 2015).

A avaliação da albumina modificada pela isquemia neste estudo teve como objetivo o conhecimento do comportamento desta molécula em cães frente ao exercício físico de diferentes intensidades, uma vez que não há registros na literatura de mensuração nesta espécie.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pela Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob o número de protocolo 1.07.15.

Local

O estudo foi realizado nas dependências do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages/SC e contou com a colaboração dos Serviços do Laboratório Clínico Veterinário e do Serviço de Cardiologia Veterinária da instituição.

Animais

Foram utilizados 11 cães adultos de raças com aptidão ao pastoreio, sendo sete animais da raça Australian Cattle Dog, quatro machos e três fêmeas com peso médio de $20,9 \pm 4,5$ kg e idade média de $3,1 \pm 2,2$ anos, e quatro animais da raça Border Collie, dois machos e duas fêmeas com peso médio de $17,8 \pm 1,7$ kg e $1,0 \pm 0,7$ anos de idade, clinicamente sadios. Os cães foram provenientes de proprietários particulares que permitiram sua participação nesse estudo mediante termo de consentimento. Para avaliação da higidez foi obtido o histórico dos animais, e os mesmos foram avaliados por meio de exame físico completo (FEITOSA, 2008), hemograma (JAIN, 1993) e de bioquímica sérica, para constatação de higidez. Os animais foram submetidos a jejum hídrico de duas horas e sólido de no mínimo 4 horas.

Testes de exercício físico

Os animais foram submetidos ao exercício em esteira sem condicionamento prévio, apenas com adaptação ao aparelho, com o objetivo de avaliar os animais sem treinamento, eram mantidos na esteira por meio de estímulos visuais e auditivos. Foram submetidos a dois testes de exercício físico em esteira ergométrica (Johnson Treo T101, Indaiatuba-SP), com no mínimo 7 dias de intervalo entre eles. Os protocolos de exercício foram baseados no estudo de Piccione et al. (2012) com modificações. Os testes foram realizados sempre no mesmo período do dia.

Protocolo I (PI) exercício de longa duração e baixa velocidade: duração de 40 minutos na velocidade de 3,8 km/h ao passo e 0% de inclinação da esteira.

Protocolo II (PII) exercício de curta duração e alta velocidade): duração de 5 min na velocidade de 3,8 km/h ao passo, seguido de 5 min na velocidade de 7,0 km/h ao trote e 5 min na velocidade de 3,8 km/h (período de desaquecimento), com 0% de inclinação da esteira.

Amostras

As amostras de sangue foram colhidas por meio de punção da veia jugular, sendo colhidos cerca de 8ml de sangue por momento. Foram utilizadas agulhas 21G (Vacutainer®, BD, Juiz de Fora-MG) em sistema a vácuo, sendo acondicionada 6mL em tubo sem anticoagulante, com ativador e separador do coágulo para obtenção de soro para dosagem das proteínas e da albumina modificada pela isquemia (AMI). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000g para a obtenção de soro, que foram transferidas para microtubos de polipropileno e armazenado a -20°C até o processamento.

Momentos

As amostras foram colhidas em momentos pré-estabelecidos em ambos os testes de exercício físico: momento M0 anterior ao início do exercício físico, no primeiro minuto após o término do exercício (M1), 15, 30, 60 e 120 minutos após o término do exercício, denominados de momentos M15, M30, M60 e M120, respectivamente.

Determinação das proteínas

Foram realizadas as dosagens séricas de proteína sérica total (PST) pelo método de Biureto e albumina pelo método de verde de Bromocresol, e o valor das globulinas foi obtido pela diferença entre os valores de proteína sérica total e albumina. Todas as dosagens foram realizadas por meio de testes colorimétricos com a utilização de kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa-MG) em analisador automático (Labmax Plenno, Labtest, Lagoa Santa-MG).

Determinação do marcador de isquemia

A concentração da albumina modificada pela isquemia (AMI) foi determinada no soro para a avaliação de isquemia, por meio de leitura espectrofotométrica, em leitor espectrofotométrico (Bioespectro, SP22, Curitiba-PR) conforme a técnica descrita por Fagan et al. (2002), que detecta quantitativamente a AMI pela capacidade de ligação do cobalto à albumina sérica.

Análise estatística

Inicialmente, os valores foram analisados segundo a sua distribuição pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram analisados estatisticamente comparando o momento M0 aos momentos subsequentes, e entre testes para cada momento. A análise dos dados foi realizada pelo teste t pareado para dados paramétricos e pelo teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Foi realizada ainda a correlação pelo teste de Pearson entre as variáveis. As análises foram processadas com o auxílio de programa estatístico computadorizado (GraphPad Prism versão 5) com o nível de significância de 5%.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais de ambas as raças, completaram os dois protocolos de exercício sem intercorrências.

Não foi observada diferença estatística na avaliação de proteína sérica total, albumina e globulinas (Tabela 8), o que corrobora com os resultados encontrados por Baltzer, et al. (2012) que avaliaram cães das mais diferentes raças de pequeno, médio e grande porte, que foram submetidos ao exercício físico de agilidade e não demonstraram alterações nas concentrações das proteínas antes e depois do exercício. Já em cães de trenó foi observado uma diminuição sobretudo da albumina após a realização de exercício físico, que foi atribuída a perda nas fezes, urina ou catabolismo excessivo, porém, esses cães foram submetidos a exercício de maior duração. Nesse estudo a falta de alteração significativa na avaliação das proteínas pode ser atribuída ao fato de que os cães, devido ao seu bom condicionamento, não encontraram nos testes aplicados desafio suficiente para tal.

Tabela 07 - Média \pm desvio-padrão da concentração sérica de proteína sérica total (PST), albumina e globulinas de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	M15	M30	M60	M120
PST (g/dL)	PI	7,41 \pm 1,08	6,93 \pm 0,38	7,02 \pm 0,63	6,96 \pm 0,55	6,99 \pm 0,72	6,78 \pm 0,65
	PII	7,44 \pm 1,02	7,34 \pm 0,81	7,31 \pm 0,92	7,17 \pm 0,72	7,21 \pm 0,67	7,18 \pm 0,94
Albumina (g/dL)	PI	3,30 \pm 0,17	3,27 \pm 0,14	3,28 \pm 0,21	3,26 \pm 0,21	3,27 \pm 0,20	3,20 \pm 0,20
	PII	3,32 \pm 0,19	3,25 \pm 0,24	3,30 \pm 0,19	3,23 \pm 0,15	3,18 \pm 0,19	3,23 \pm 0,20
Globulinas (g/dL)	PI	4,11 \pm 1,00	3,65 \pm 0,33	3,68 \pm 0,52	3,70 \pm 0,44	3,71 \pm 0,57	3,57 \pm 0,49
	PII	4,12 \pm 0,92	4,09 \pm 0,79	4,01 \pm 0,84	3,93 \pm 0,72	4,02 \pm 0,62	3,94 \pm 0,84

Os valores de AMI estão dispostos na Tabela 09. Houve diferença estatística da concentração de AMI no teste de exercício de curta duração e alta velocidade (PII), cujos valores em M15 foram maiores em relação ao momento M0.

Tabela 08 - Mediana (Percentil 25; Percentil 75) da concentração da AMI de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.

Parâmetro	Teste	M0	M1	M15	p	M30	M60	M120
AMI (ABS)	PI	0,626 (0,443;0,713)	0,672 (0,339;0,753)	0,614 (0,431;0,702) ^A	0,026	0,687 (0,377;0,755)	0,665 (0,411;0,860)	0,655 (0,471;0,741)
	PII	0,543 (0,290;0,664)	0,707 (0,339;0,913)	0,981 (0,581;1,040) ^B		0,791 (0,473;1,095)	0,652 (0,390;0,975)	0,659 (0,449;0,863)
	p			0,033				

^A Diferenças entre momentos em relação ao momento M0.

^{AB} Diferenças entre grupos nos mesmos momentos.

Alterações em relação a AMI também foram encontradas em outros estudos realizados avaliando o exercício em humanos em que Apple et al. (2002) observaram que após corrida em maratona não ocorreu diferença estatística de AMI em 24 horas, mas, após um período de 24 a 48 horas houve um aumento significativo, o que pode sugerir algum nível de isquemia da musculatura esquelética. Outro estudo envolvendo uma isquemia muscular isolada também em humanos revelou aumento significativo de AMI logo após a liberação de torniquete realizado em membro inferior dos participantes, o que indica também a AMI como sendo um marcador de isquemia muscular esquelética (REFAAI, et al. 2006).

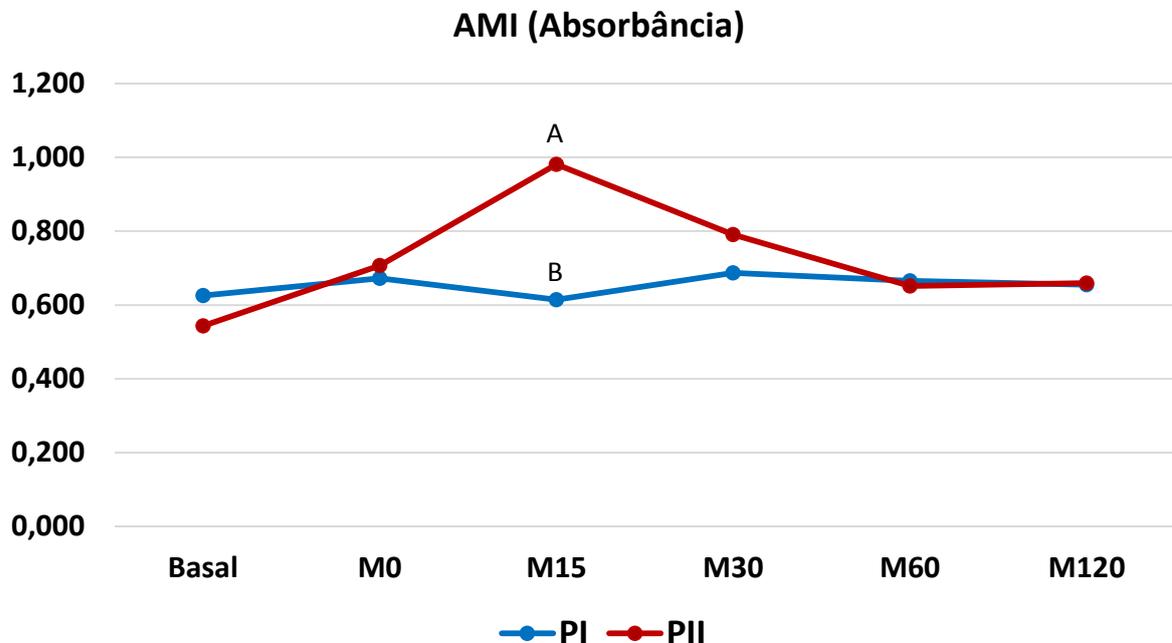
Falkensammer, et al. (2007) em seu estudo provocou necrose por meio de compressão em humanos, comprovada por meio de ressonância magnética, e encontrou um aumento significativo de AMI logo após o término do exercício físico, porém, os valores voltaram a aos níveis basais trinta minutos após o término do exercício, demonstrando meia-vida curta nesta espécie e sob estas condições. Fato semelhante foi encontrado neste estudo, cuja diferença significativa foi observada quinze minutos após o término do exercício, demonstrando um provável momento em

que a capacidade de ligação da albumina está diminuída, frente a uma alteração na sua porção terminal, indicando provavelmente um processo isquêmico muscular. Porém essa alteração não se manteve nos demais momentos avaliados, se mostrando como uma alteração pontual, o que pode refletir uma depuração mais eficaz nessa espécie sob essas condições.

Entretanto, difere de outras literaturas como Lippi et al., (2008) que avaliaram o comportamento da AMI em humanos antes e após a realização de uma corrida de maratona, e não observaram diferença significativa logo após ou até 24 horas após o término do exercício. Já sobre o exercício na medicina veterinária a literatura é escassa na avaliação da AMI. Em um estudo em equinos submetidos a exercício físico em esteira, não foi observada diferença estatística da concentração da AMI (YONEZAWA, et al., 2012).

Além disso, foi observada diferença estatística para AMI no M15 em relação aos dois protocolos, apresentando maiores valores no PII (Figura 2). Essa diferença expressa provavelmente, o maior esforço físico apresentado pelos cães no PII, que envolvia um menor tempo de exercício, porém uma maior velocidade e, portanto, desgaste desses animais.

Figura 02 Mediana da concentração da AMI de 11 cães das raças Australian Cattle Dog (n=7) e Border Collie (n=4) submetidos a testes de exercício de longa duração e baixa velocidade (PI) e de curta duração e alta velocidade (PII) em esteira ergométrica, nos momentos antes do exercício (M0), no primeiro minuto (M1), 15 (M15), 30 (M30), 60 (M60) e 120 (M120) minutos após o término do exercício.



^{AB} Diferenças entre grupos nos mesmos momentos.

Embora não houve diferença dos valores de albumina entre os momentos, o teste de correlação foi estatisticamente significativo entre as variáveis albumina e AMI, demonstrando uma correlação negativa somente no PI ($r=-0,412$; $p=0,0007$), demonstrando um aumento na concentração de AMI tendo relação com a diminuição das concentrações de albumina sérica. Esse fato também foi observado em outros estudos (VAN DER ZEE, et al., 2005; FALKENSAMMER, et al., 2007).

Assim, os valores obtidos por este estudo revelam um real aumento nas concentrações de AMI, já que não foi observada diferença estatística significativa para os valores de albumina sérica, o que acaba se tornando um agravante na utilização desse marcador, já que depende diretamente das concentrações de albumina. Sendo assim, na presença de hipoalbuminemia esse marcador pode ter sua interpretação prejudicada como citado por Lippi, et al. (2007).

5.4 CONCLUSÃO

O exercício de curta duração e alta velocidade causa aumento na concentração da AMI de maneira pontual com pico em 15 minutos após o término do exercício, provavelmente devido a um possível evento isquêmico durante o exercício. O exercício de longa duração e baixa velocidade não provocou isquemia suficiente para alterar as concentrações de AMI.

5.5 REFERÊNCIAS

- APPLE, F.S. et al. Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. **Clinical Chemistry**, v.48, p.1097, 2002.
- BALTZER, W. I. et al. The effect of agility exercise on eicosanoid excretion, oxidant status, and plasma lactate in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 2-11, 2012.
- BAR-OR, D. et al. Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. **European Journal Biochemistry**, v.268, p.42-47, 2001.
- BEEKVELT, V.M.C. et al. Blood flow and muscle oxygen uptake at the onset and end of moderate and heavy dynamic forearm exercise. **American Journal Physiology Regul Integr Comp Physiol**, v.280, p.1741–1747, 2001.
- BHAGAVAN, N.V. et al. Evaluation of Human Serum Albumin Cobalt Binding Assay for the Assessment of Myocardial Ischemia and Myocardial Infarction. **Clinical Chemistry**, v.49, v. 581–585, 2003.
- CHO, D.K; CHOI, J.O; KIM, S.H. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. **Coronary. Artery Dis**, v. 18, p. 83-87, 2007.
- FAGAN, G.J. et al. The albumin cobalt binding test: analytical performance of a new automated chemistry assay for the detection of ischemia modified albumin (IMA). **Journal of Clinical Ligand Assay**, v.25, p.178-187, 2002.
- FALKENSAMMER, J. et al. Serum levels of ischemia-modified albumin in healthy volunteers after exercise induced calf muscle ischemia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.45, p.535-540, 2007.
- FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária – A arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 735p, 2008.
- GAZE, D.C. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. **Drug Metab Pharmacokinet**, v.24, n.4, p.333-341, 2009.
- HAZINI, A. et al, Investigation of ischemia modified albumin, oxidant and antioxidant markers in acute myocardial infarction. **Postep Kardiol Inter**. v.11, p.298–303, 2015.
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 417p., 1993.
- KINGSTON, J.K. **Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training**. In: HINCHCLIFF, K.W; KANEPS, A.J, GEOR, R.J, eds. Equine sports medicine and surgery. London, England: Elsevier Ltd, p. 939– 948, 2004.

LIPPI, G. et al, Standardization of ischemia-modified albumin testing: adjustment for serum albumin. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.45, p.261-262, 2007.

LIPPI, G. et al. Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers. **Clinical Chemistry Laboratory Medical**, v.46, p.1313-1318, 2008.

MA, S.G. et al. Evaluation of ischemia-modified albumin and C reactive protein in type 2 diabetics with and without ketosis. **Biomark Insights**, v.7, p.19-26, 2012.

PETERS, T. **The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties**. In: PETERS, T. All About Albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Elsevier. p. 9-75, 1995.

PICCIONE, G. et al. Effect of Moderate Treadmill Exercise on Some Physiological Parameters in Untrained Beagle Dogs. **Experimental Animals**. v.61, p. 511–515, 2012.

PROCTOR, D.N. et al. Reduced leg blood flow during dynamic exercise in older endurance-trained men. **J Appl Physiol**. v. 85, p.68–75, 1998.

REFAAI, M.A. et al. Ischemia-modified albumin increases after skeletal muscle ischemia during arthroscopic knee surgery. **Clinica Chimica Acta**, v.366, p.264-268, 2006.

RICKETTS, S.W. **Hematologic and biochemical abnormalities in athletic horses**. In: HINCHCLIFF, K.W; KANEPS, A.J; GEOR, R.J, eds. Equine sports medicine and surgery. London, England: Elsevier Ltd, p. 949–966, 2004.

ROVIRA, S. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. **Veterinary Medicine**, v.58, p.333-346, 2008.

SCHNELLE, A.M. et al. Characterization offeline serum–cobaltbinding. **Vet Clin Pathol**, v. 44, p. 275–286, 2015.

TEGTBUR, U; MACHOLD, H; MEYER, H; et al. Determining the extent of extensive physical performance in patients with coronary heart disease. **Zeitec Kardiology**, v.90, p.627-645, 2001.

VAN DER ZEE, P.M. et al. Ischemia-modified albumin measurements in symptom-limited exercise myocardial perfusion scintigraphy reflect serum albumin concentrations but not myocardial ischemia. **Clinical Chemistry**, v.51, p.1744-1746, 2005.

YONEZAWA, L.A. et al. Ischaemia modified albumin in horses exercised at different intensities in treadmill. **Comparative Exercise Physiology**, v.8, p.233-237, 2012.

YONEZAWA, L.A. et al. Marcadores cardíacos na medicina veterinária. **Ciência Rural**, v.40, p.222-230, 2010.

6 CAPÍTULO IV

Capítulo 4: Intercorrências encontradas

O presente estudo teve como maior intercorrência a cooperação dos animais no uso da esteira ergométrica. Foram recrutados cerca de 35 cães da raça Australian Cattle Dog, porém a maioria deles não colaborou na realização do exercício em esteira, demonstrando inquietação e tentativas sequenciais de desistência. Além disso, muitos deles realizavam um dos testes e hesitavam na realização do segundo.

Quanto aos cães da raça Border Collie, a maior dificuldade foi na seleção de animais que se encaixassem na classificação mínima para a raça, reduzindo assim bastante a quantidade de animais possíveis para participação no estudo, aliado ainda a falta de disponibilidade por parte dos proprietários.