

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

Fernando José Gondim Peixoto



**DETERMINAÇÃO DO LIMAR METABÓLICO
INDIVIDUAL DE LACTATO E ESTUDO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM EQUINOS DE ENDURO.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)	
<i>Fernando José Gondim Peixoto</i>	
e aprovada pela Comissão Julgadora.	

14/12/99 - V. V. M.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Instituição: Departamento de Bioquímica - IB/UNICAMP

1999



UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TEMPO	80/40591
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	\$ 11,00
DATA	18/03/00
N.º CPD	

CM-00139020-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP.**

Peixoto, Fernando José Gondim

P359d Determinação do limiar metabólico individual de lactato, e estudo do estresse oxidativo em eqüinos de enduro/Fernando José Gondim Peixoto.
-- Campinas, SP: (s.n.) 1999.
101f: illus.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1.Equino. 2.Stress. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 14 de dezembro de 1999.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Banca Examinadora:

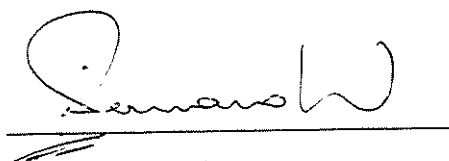
Titulares

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo
(IB - UNICAMP - Orientadora)



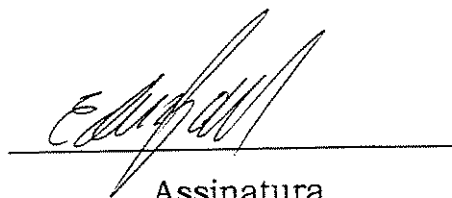
Assinatura

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes
(FVMZ - USP)



Assinatura

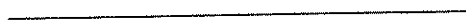
Prof. Dr. Eduardo Galembeck
(IB - UNICAMP)



Assinatura

Suplente

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva
(IB- UNICAMP)



Assinatura

“ Em ciência, a autoridade de um milhar, não é superior ao humilde raciocínio de uma só pessoa”

(Galileu Galilei)

AGRADECIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

À FAPESP , CNPq e FAEP pelo suporte financeiro.

Ao Centro Hípico Rio das Pedras, pela cessão de suas instalações.

À todos os proprietários dos cavalos utilizados nos experimentos, especialmente ao Prof. Dr. José Busnardo Neto, pelo auxílio nas traduções.

À AgribRANDS Purina do Brasil, nas pessoas do veterinário Sr. Sérgio Collaço da Silva, e do Sr. Celso Luis Fernandes Lourenzo pelo patrocínio em competições.

À Imprint/CB Tech do Brasil, na pessoa do Sr. Raimundo Eliel Nunes de Lima, pelo apoio financeiro nas competições.

À Ypiôca, nas pessoas dos Srs. Everardo Ferreira Telles e Carlos Augusto Gonçalves, pelo patrocínio em competições.

Ao Laboratório Lavizzo, na pessoa do Sr. José Giordano Penteado, pelo patrocínio em competições.

Aos meus amigos Witr van palas e Ws ibn morgaan, pela segurança de suas costas, e os indescritíveis e inesquecíveis momentos de felicidade que me proporcionaram e certamente ainda proporcionarão.

Ao Luciano Caobianco Saraiva, meu fiel escudeiro.

Ao meu amigo Jack Begaud pelos grandiosos ensinamentos.

À minha adorável e sábia mãe, Dona Jasiva pela eterna luminosidade.

À Renate, minha esposa, mãe, amiga, filha ... enfim, a mais completa definição de mulher, e a melhor companheira possível.

À minha grande incentivadora e orientadora Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo.

À Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva, pelas proficuas e enérgicas discussões.

À todos os colegas do laboratório, Agnes, Andrea, Daniel, Soraya, Guilherme, e especialmente ao Marcus, Cláudio, Leo e o generoso Armindo Antonio.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, pela valiosa correção desta tese.

Ao Prof. Dr. Eduardo Galembeck, pela cuidadosa correção desta tese.

Ao Donizete, competente cavalariço doWitr.

À Andrea, Marina e Mirian, pela simpatia e solicitude.

ÍNDICE

5
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Índice de tabelas e figuras.....	07
Lista de abreviações.....	08
Resumo	10
Abstract	11
Introdução	12
- Treinamento esportivo.....	14
- Exercício de resistência ou endurance.....	16
- Enduro eqüestre.....	17
- Formas de Produção de energia.....	20
- Metabolismo do lactato.....	25
- Limiar metabólico de lactato.....	29
- Estresse.....	32
- Estresse oxidativo.....	33
- Fontes produtoras de radicais livres no exercício.....	33
- Defesa antioxidante.....	35
- Papel das espécies reativas de O ₂ no organismo.....	35
- Treinamento X estresse oxidativo.....	36
Objetivos	39
- Parte I. Limiar de lactato.....	40
- Parte II. Estresse oxidativo.....	40
Material e Métodos	42
- Parte I. Limiar de lactato.....	43
Experimento I.....	44
Experimento II.....	44
Experimento III.....	45
- Parte II. Estresse oxidativo.....	46
Biomarcadores de ataque oxidativo.....	48
Biomarcadores do sistema de defesa antioxidante.....	49

Biomarcador de lesão muscular.....	51
Resultados e Discussão.....	52
- Parte I. Padronização da determinação da LMS.....	52
Experimento I - Determinação do PL.....	54
Experimento II - Determinação da LMS.....	56
Experimento III - Confirmação da LMS.....	64
- Parte II. Avaliação do ataque oxidativo e da defesa antioxidante.....	71
Conclusões.....	82
Referências bibliográficas.....	85
Anexo I (Premio Witr).....	98
Anexo II (resumo cesmas 98).....	99
Anexo III (resumo cesmas 2000).....	100
Anexo IV (congressos nacionais e atividades didáticas).....	101

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Pontuação para o prêmio de “Best condition”.....	20
Tabela 2 - Caracterização dos cavalos - determinação da LMS.....	43
Tabela 3 - Caracterização dos cavalos - competição de 210 km.....	46
Tabela 4 - Picos de lactato dos cavalos 1, 2, 3, 4 e 5.....	55
Tabela 5 - Picos de lactato dos cavalos 1 e 3, após o treinamento.....	56
Tabela 6 - LMS, lactato e FC. dos cavalos 1, 2, 3, 4 e 5.....	57
Tabela 7 - LMS, lactato e FC. dos cavalos 1 e 2, após o treinamento.....	58
Tabela 8 - Resultados parciais e finais da competição de 210 km.....	75
Tabela 9 - Dosagens dos biomarcadores de ataque oxidativo.....	76
Tabela 10 - Dosagens das atividades das enzimas antioxidantes.....	77
Tabela 11 - Dosagem da atividade da Creatina quinase.....	81
Figura 1 - Esquema da membrana mitocondrial interna.....	24
Figura 2 - Vias de formação de EROS.....	34
Figura 3 - Gráfico representativo da determinação da LMS.....	53
Figura 4 - Gráficos LMS do cavalo 1 antes do treinamento.....	59
Figura 5 - Gráficos LMS do cavalo 2.....	59
Figura 6 - Gráfico LMS do cavalo 3 após o treinamento.....	60
Figura 7 - Gráfico LMS do cavalo 4.....	60
Figura 8 - Gráfico LMS do cavalo 5.....	61
Figura 9 - Gráfico da CL do cavalo 1 antes do treinamento.....	64
Figura 10 - Gráfico da Confirmação de limiar do cavalo 2.....	65
Figura 11 - Gráfico da CL do cavalo 3 antes do treinamento.....	65
Figura 12 - Gráfico da Confirmação de limiar do cavalo 4.....	66
Figura 13 - Gráfico da Confirmação de limiar do cavalo 5	66
Figura 14 - Gráfico da CL do cavalo 1 após o treinamento.....	68
Figura 15 - Gráfico da CL do cavalo 3 após o treinamento.....	69

LISTA DE ABREVIÇÕES

AMP - Adenosina monofosfato
ADP - Adenosina difosfato
ATP - Adenosina trifosfato
BHT - Butil hidroxi tolueno
BPM - Batimentos por minuto
CAT - Catalase
CBH - Confederação brasileira de hipismo
CK - Creatina quinase
CL - Confirmação de limiar
DNA - Acido desoxiribonucleico
DNPH - 2,4dinitro fenil hidrazina
DTNB - Acido 5,5 – ditiobis (2- nitrobenzóico)
EDTA - Ácido etileno diamino tetracético
EROS - Espécies reativas de oxigênio
FADH₂ - Flavina adenina dinucleotídeo
FC - Frequência cardíaca
FEI - Federação eqüestre internacional
FMVZ - Faculdade de medicina veterinária e zootecnia
GPX - Glutathione peroxidase
GR - Glutathione reductase
GSH - Glutathione reduzida
GSSG - Glutathione oxidada
GSTNB - Glutathione ligada ao ácido tiobis-nitrobenzóico
Hb - hemoglobina
IB - Instituto de biologia
IAT - Individual aerobic threshold
LMS - Velocidade de lactato mínimo
LT - Lactate threshold
MSSLAC - Maximum steady state lactate accumulation

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo - reduzida
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - reduzida
NO - Óxido nítrico
OBLA - Onset of blood lactate accumulation
OPLA - Onset of plasma lactate accumulation
ONOO - Peroxinitrito
PC - Fosfocreatina
PL - Pico de lactato
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SOD - Superóxido dismutase
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEP - Tetraetoxipropano
TMC - Transportadores de mono carboxilatos
TNB - Ácido tiobis-nitrobenzóico
TRAP – Total peroxy radical-trapping antioxidative parameter
VO₂max. - Consumo máximo de oxigênio
XO - Xantina oxidase

RESUMO

Metodologias que possibilitem avaliar as características atléticas individuais e ao longo do tempo monitorar as adaptações induzidas pelo treinamento, são especialmente importantes em eqüinos atletas devido à dificuldade de interpretação das repostas por eles fornecidas, e por serem involuntariamente exercitados.

Primeiramente adaptamos e padronizamos para cavalos iniciantes em competições de enduro eqüestre, o protocolo LMS, que determina a máxima velocidade em mínima lactatemia (Tegtbur, et al. 1993), também denominado limiar aero/anaeróbio. Verificamos que esta metodologia pode ser facilmente empregada em condições de campo e constitui-se em um confiável parâmetro de condicionamento físico.

Posteriormente avaliamos o grau de estresse oxidativo a que nove cavalos foram submetidos, durante uma competição de 210 Km, dosando as concentrações plasmáticas de dois marcadores de ataque oxidativo a lipídeos (Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico – Tbars) e a proteínas (Proteína Carbonilada) e as atividades de duas enzimas do sistema de defesa antioxidante (Catalase e Glutathione Redutase).

Constatamos que os cavalos que obtiveram boas colocações na competição responderam positivamente ao estímulo da competição, demonstrando aumento nas atividades das defesas antioxidantes enzimáticas, enquanto os níveis dos marcadores de ataque oxidativo permaneceram aumentados em relação ao repouso, mas em concentrações estáveis. Quanto aos cavalos que foram eliminados, ocorreu uma resposta negativa na avaliação dos marcadores de defesa antioxidante, onde as atividades das enzimas diminuía enquanto as concentrações dos marcadores de ataque oxidativo aumentavam, demonstrando uma correlação direta entre níveis aumentados de estresse oxidativo e baixo desempenho atlético.

ABSTRACT

Methodologies that can evaluate the individual athletic characteristics and follow the training induced adaptations, are very important to athletic horses. It's difficult for horse's coach and riders to explain the physiological horse responses without any technical support.

First, we standardized the human LMS protocol (Tegtbur et al.1993) for endurance horses. This protocol determine the maximal speed in minimal blood lactate concentration, known as aerobic / anaerobic treshold. We concluded that this methodology can be easily used under field conditions, and is a good parameter to evaluate the physical conditioning in horses.

Afterwards, we followed the oxidative stress levels in nine endurance horses during a three days race of 210 km . Two biomarkers of oxidative attack were chosen. One was used to determine the lipid oxidation (thiobarbituric reactive species - TBARS) and one was used to protein oxidation (carbonylated protein). Two enzymes of antioxidant system also had their activities measured (Catalase and Glutathione reductase).

The successfull horses showed a positive response to the competition stimulus. An increase of antioxidant enzyme activities and a steady state of biomarker levels of oxidative attack occurred. However, the unsuccessful horses showed a negative response, and a decrease in the antioxidant enzyme activities while the biomarker levels of oxidative attack increased. These data support a direct relationship between the oxidative stress and poor athletic performance.

INTRODUÇÃO

O conhecimento das características atléticas intrínsecas de qualquer indivíduo, humano ou animal, e seu potencial de desempenho é desejável em qualquer modalidade desportiva. Esta caracterização pode ser feita através de parâmetros estáticos e dinâmicos. O conhecimento da resistência aeróbia de um indivíduo é um parâmetro particularmente importante em competições de longa duração. Neste tipo de competição, uma boa estratégia de consumo de suas reservas energéticas oxidáveis é desejável, principalmente quanto ao glicogênio muscular e as reservas de lipídeos, que devem ser disponibilizadas e metabolizadas pela via aeróbia, proporcionando um maior rendimento energético.

A seleção criteriosa de animais para competições de longa distância (enduros) pode ser fator determinante de bom desempenho, pois a resistência aeróbia aparentemente possui fortes características hereditárias (Fink et al., 1977).

O desenvolvimento de metodologias que possibilitem avaliar as características atléticas de um cavalo e ao longo do tempo monitorar o seu desempenho, propiciam um melhor entendimento das adaptações induzidas pelo treinamento, e podem auxiliar na busca de um melhor desempenho atlético do animal, despertando um grande interesse nos profissionais que trabalham com a medicina veterinária desportiva equina.

Em eqüinos de sela (animais que são montados para o lazer ou a prática desportiva), metodologias para o monitoramento de adaptações induzidas pelo treinamento são talvez mais importantes do que em humanos, pois estes animais, apesar de possuírem características orgânicas naturais de um atleta, são submetidos a um regime artificial de vida e involuntariamente exercitados.

A utilização de marcadores biológicos como indicadores do estado metabólico de sistemas, órgãos e tecidos é universalmente praticada e possui reconhecida relevância em todas as áreas das ciências biológicas (Ryan and Hightower, 1996). Cada área desenvolve seu próprio repertório de biomarcadores, definidos por Ryan e Hightower em 1996 como,

“medidas em qualquer nível de organização, que possibilitam a construção de uma escala sensitiva do efeito de algum fator”.

Biomarcadores moleculares são biomoléculas sintetizadas por um organismo em resposta a um estímulo externo, evidenciando sua exposição e sua correspondente resposta a este estímulo. A utilização de uma escala de biomarcadores depende de algumas características destas moléculas, que possibilitem uma adequada interpretação do significado de suas concentrações plasmáticas ou teciduais.

Um bom biomarcador, segundo Ryan e Hightower (1996) deve possuir significância biológica, ter uma boa relação de proporcionalidade entre estímulo e resposta, possuir sensibilidade em diferentes sistemas biológicos, ser detectável através de metodologia fácil, confiável e acessível e ser suficientemente bem conhecido. Biomoléculas com estas características podem ser utilizadas em modelos experimentais tais como o condicionamento físico de eqüinos.

Treinamento esportivo

O treinamento esportivo, tradicionalmente empregado em humanos, consiste numa seqüência de cargas de esforço repetitivas e crescentes com o objetivo de aumentar a performance do atleta. O processo tradicional de treinamento se divide em períodos chamados ciclos. A quantidade de ciclos durante um ano competitivo pode variar de acordo com a modalidade praticada ou o número de competições das quais se deseja participar (Weineck, 1989).

Normalmente no início do ciclo há uma predominância de atividades aeróbias de menor intensidade e maior duração (treinamento contínuo) e a medida em que se aproxima o período de competição este perfil se altera, contendo atividades de maior intensidade e menor duração (treinamento intermitente), com predomínio nesta fase do metabolismo anaeróbio como gerador de ATP, durante o período do exercício (Denadai, 1995). Neste tipo

de treinamento os exercícios são sempre intercalados com uma pausa curta onde predomina o metabolismo aeróbio, importante para a reposição das reservas energéticas musculares, principalmente de fosfocreatina. É importante lembrar que este treinamento simula uma condição de **isquemia/reperfusão** para as células musculares (Hess e Manson, 1984; Sjödín et al., 1990). A porcentagem de sessões de treinamento contínuo e intermitente varia de acordo com o tipo de desporto praticado. Por exemplo, um esporte que utiliza mais velocidade deve ter um percentual maior de sessões de treinamento intermitente em relação a esportes que requerem mais resistência e vice-versa em relação a sessões de treinamento contínuo. Quando se chega ao final de um ciclo de treinamento, supõe-se que o atleta tenha atingido o pico de sua forma física, podendo render seu máximo na competição (Denadai, 1995).

Do ponto de vista fisiológico, o processo de treinamento é uma somatória de estímulos que resultam na quebra da homeostase intracelular. O estresse induzido pelo exercício parece ser o principal responsável pelo desencadeamento das respostas bioquímicas e fisiológicas que restabelecem uma nova homeostase celular (Virus, 1984). Entretanto, o processo de recuperação não acaba com a restauração da homeostase mas continua até o organismo obter uma supercompensação, ou seja, a homeostase readquirida após o estímulo apresenta uma maior capacidade, comparada a homeostase pré-estímulo, de suportar novos estímulos de maior intensidade. O momento ideal para uma nova carga de treino seria quando a supercompensação estivesse no seu nível mais alto. Quando uma nova carga de treinamento é executada sem a prévia recuperação do organismo, o atleta entra num processo de "overtraining", e a medida em que este processo se acumula por meses ou anos, a consequência final é a diminuição do rendimento até o desencadeamento de lesões mais graves e muitas vezes irreversíveis. Portanto, o limiar entre um treinamento ideal e o "overtraining" é muito tênue e a preocupação em não pecar pela falta de treinamento pode ocasionar um

menor rendimento devido ao excesso de cargas de esforço sem pausa para a recuperação ideal (Kuipers, 1997).

Na medicina veterinária desportiva um grande problema reside especialmente na interpretação das respostas do processo adaptativo fornecidas pelos eqüinos atletas, que é extremamente complicada. Tradicionalmente, a sensibilidade de profissionais com diferentes níveis de formação técnica é a responsável pela tradução das respostas. A confiabilidade desta tradução é no mínimo questionável. Suas informações são imprecisas e não possuem um padrão ou linguagem que possam ser fielmente transmitidas. Portanto, um adequado repertório de parâmetros fisiológicos e bioquímicos é indispensável para um melhor entendimento dos processos biológicos envolvidos no condicionamento físico eqüino.

Exercício de resistência ou endurance

O termo endurance pode ser bioquimicamente definido como resistência à fadiga. Precisamente não se trata de resistir, mas de retardar ou limitar o aparecimento da fadiga. O conceito de fadiga envolve a incapacidade fisiológica de prosseguir com o esforço, que no caso de competições de enduro, é um esforço submáximo e prolongado. A fadiga em termos simples pode ser definida como a incapacidade do organismo em manter a produção de energia, ou a deficiência orgânica de manutenção de uma determinada tensão muscular por um determinado tempo (Edwards, 1981). A fadiga que se desenvolve durante a contração muscular voluntária máxima tem uma causa diferente daquela que ocorre quando as contrações são moderadas e repetitivas (Allen et al., 1995). Ambas também são diferentes daquela que ocorre durante a prática de exercícios em ambientes quentes (Edwards, 1981). Finalmente, todas as formas de fadiga são conseqüências da incapacidade do organismo em produzir energia em quantidades suficientes para suprir as necessidades de contração do músculo esquelético. Portanto, os principais fatores

limitantes em um exercício físico de endurance são:

- A capacidade do organismo em absorver, distribuir e utilizar o oxigênio;
- A disponibilidade de suficientes reservas de substratos oxidáveis e a capacidade de mobilização e utilização destes substratos;
- A capacidade do organismo em metabolizar o lactato formado pelo metabolismo anaeróbio;
- A ocorrência de estresse térmico, provocando a diminuição e/ou inativação de reações metabólicas importantes;
- A ocorrência de estresse oxidativo, alterando tanto a permeabilidade das membranas celulares quanto importantes reações enzimáticas responsáveis pela manutenção da homeostase celular.
- A ocorrência de estresse mecânico, provocando danos tissulares que poderão provocar períodos de inatividade.

Enduro eqüestre

O enduro eqüestre de competição é uma modalidade esportiva originária do turismo eqüestre. É um esporte praticado em quase todos os países da Europa, Oceania, América do Sul, Estados Unidos, África e Oriente Médio. É uma competição onde cavalo e cavaleiro devem percorrer uma trilha com obstáculos naturais, demarcada, ou em um tempo pré-determinado, ou em velocidade livre. Vence a prova o cavalo que chegar ao final no menor tempo, ou no tempo mais próximo do ideal, dependendo do tipo de regulamento utilizado (Regulamento FEI).

O enduro eqüestre civil praticado atualmente foi criado por "Wendell Robie", nos Estados Unidos, em 1955, através da "Tevis Cup", a mais famosa prova do mundo. A intenção era simular as viagens do "Poney Express" (correio a cavalo americano), com o objetivo de cumprir 100 milhas em 24 horas, em um único cavalo. Existem também competições de

até 300 km, realizada em vários dias. Esta modalidade assemelha-se ao “raid” de cavalaria, tática de guerra universalmente empregada pelas cavalarias. Trata-se de uma incursão rápida e surpreendente ao território inimigo, com um grande contingente de tropa, que retorna imediatamente após o ataque. Atualmente raid e enduro são considerados sinônimos. Existem “raids” de até 750 km, que são disputados durante 15 dias. No Uruguai uma competição deste tipo é denominada de Marcha Azul e é disputada desde a década de trinta.

Na década de 60, o Enduro Eqüestre começou a ser praticado na Austrália, tornando-se um esporte muito popular. Atualmente este País também é um importante centro de pesquisas na área da fisiologia desportiva eqüina. Inúmeros trabalhos de acompanhamento de competições de enduro são publicados periodicamente na Austrália e em vários outros países (Hodgson e Rose , 1994).

Na França em 1975, foi idealizada a competição de FLORAC - A Tevis Cup Francesa - que é considerada o mais belo e difícil desafio a cavalo em um evento de um dia.

No Brasil, o enduro eqüestre nasceu em Tremembé/SP, em 08 de outubro de 1989, ocasião em que 25 conjuntos (cavalo e cavaleiro) largaram para cumprir um percurso de 60 km com velocidade controlada de 12 km/h. Em 1994 uma competição em Campinas/SP, reuniu 522 conjuntos em um evento registrado no livro Guinness de recordes, como a maior competição eqüestre de uma mesma modalidade. Em nosso País existem três tipos bem diferentes de enduro eqüestre. A Confederação Brasileira de Hipismo (CBH), regulamentou as modalidades: velocidade livre, regularidade e trail. Esta última é uma invenção nacional semelhante aos “rallys” de moto onde a trilha é seguida com o auxílio de uma planilha. O regulamento de regularidade é semelhante ao regulamento francês, que prevê qualificações sucessivas em provas com trilha sinalizada e com velocidade controlada. As distâncias elevam-se gradualmente em função das qualificações, começando com provas de 30 km, até atingir distâncias

maiores que são corridas em velocidade livre. A CBH é a entidade regulamentadora filiada à FEI - Federação Equestre Internacional, e promove anualmente o Campeonato Brasileiro da modalidade. Também existe no Brasil uma associação de enduristas que organiza campeonatos, a Liga de Cavaleiros de Enduro do Brasil organiza anualmente um outro Campeonato Nacional e o Campeonato Paulista.

Atualmente o enduro equestre é regulamentado por rigorosas normas da FEI com a premissa de preservar a integridade física do animal, que é controlada sistematicamente em postos veterinários denominados “Vet-checks”, instalados ao longo do percurso.

Nas competições internacionais oficiais o percurso é de 160 km, dividido em 4 etapas de aproximadamente 40 km e que devem ser cumpridas em velocidade livre. No final de cada etapa vários parâmetros são avaliados nos “Vet-checks”, tais como: índice de recuperação cardíaca, grau de desidratação, claudicações, dentre vários outros. Após o final de cada etapa de no máximo 40 km, o competidor só recebe a autorização de re-largada se todos os parâmetros estiverem dentro da faixa de normalidade fixada pelo regulamento (regulamento veterinário da FEI). Mesmo após o término da competição, que é realizada em velocidade livre, o exame veterinário é realizado para a confirmação do resultado. O tempo limite para este exame é de 30 minutos após a chegada, onde a frequência cardíaca não pode superar o limite de 64 bpm, a temperatura retal não pode ultrapassar 39,5° C e o cavalo não pode mancar. Cavalos de todas as raças, puros ou mestiços, podem participar desde que tenham no mínimo 4 anos ao se inscreverem nas categorias inferiores. Além disso, um prêmio especial chamado “best condition” é dado ao cavalo que obtiver a melhor pontuação utilizando-se a tabela de pontos descrita na Tabela 1.

Portanto, do ponto de vista científico, o Enduro Equestre é um excelente modelo experimental de condicionamento físico, irreprodutível em laboratório, que serve para o estudo das alterações bioquímicas induzidas pelo exercício de longas distâncias e duração.

Tabela 1: Critérios utilizados para a determinação do animal em melhores condições. Pontuação para “Best condition” segundo regulamento FEI.

<i>Critérios veterinários (apreciado por vários veterinários)</i>	
Fatores metabólicos	Pontos
1. Recuperação (temperatura, respiração, coração)	10
2. Mucosas (elasticidade capilar), desidratação, ruídos intestinais, tônus anal)	20
3. Impulsão (fadiga muscular)	20
Fatores mecânicos	
4. Pernas inchadas, pesadas, sensibilidade aumentada	10
5. Defeitos de locomoção (encurtamento, rigidez, manqueiras)	30
6. Critérios exteriores (escoriações de equipamento, etc.)	10
Total multiplicado por 3	300
<i>Critérios de tempo</i>	
Tempo do vencedor	200
Tempo de cada concorrente: Desconta-se um ponto por minuto de atraso em relação ao vencedor.	
<i>Critérios de peso</i>	
Peso do cavaleiro mais pesado	100
Peso de cada concorrente: Desconta-se um ponto por quilo abaixo do peso do cavaleiro mais pesado.	
TOTAL GERAL	600

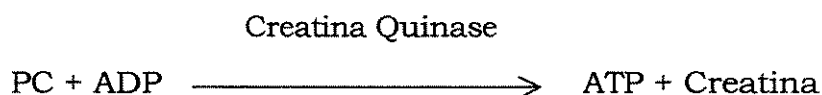
Formas de produção de energia

O músculo é o órgão essencial para a motricidade e utiliza somente ATP como fonte de energia: sob forma mecânica, para a contração muscular; sob forma elétrica, para a formação do gradiente eletro-químico responsável pela condução de impulsos nervosos; sob forma química, garantindo as reações do metabolismo. Entretanto, as reservas

intracelulares de ATP são muito baixas, não permitindo mais que um segundo de trabalho. Para prosseguir o esforço o músculo deve ressintetizar ATP através de três vias metabólicas, que diferem entre si na sua latência, intensidade e capacidade de gerar energia.

Sistema ATP-fosfocreatina:

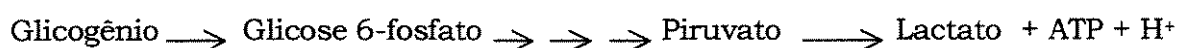
Neste sistema, a ressíntese do ATP provém da reserva muscular fosfocreatina (PC). Como esta via envolve apenas uma reação, catalisada pela enzima creatina quinase, tem a capacidade de ressintetizar ATP de forma extremamente rápida, embora não seja capaz de prover grandes quantidades de energia:



A PC pode ser rapidamente utilizada, ou rearmazenada para posterior utilização, funcionando como um tampão energético, extremamente sensível às alterações nas concentrações intracelulares de ATP e ADP (Jones et al., 1985). Desta maneira este sistema garante os movimentos rápidos e vigorosos que não poderiam ser realizados sem um fornecimento rápido de energia. Hultman e Sjoholm (1983), documentaram que esta via fornece até 9.0 mmoles de ATP/Kg de músculo durante um protocolo de estimulação elétrica com duração de 1,28 segundos.

Glicólise Anaeróbia ou Sistema do Lactato:

Esta é a outra via de ressíntese de ATP que não utiliza O₂. Envolve dez reações químicas, onde a quebra parcial da molécula de glicose ou do glicogênio muscular proporciona a formação de ATP também de forma rápida, além de produzir lactato no final do processo:



Embora o saldo energético desta via seja baixo, em relação a via aeróbia de ressíntese de ATP ela também provê ATP às fibras em atividade de forma rápida, e possui uma capacidade energética muito maior em relação ao sistema ATP-PC, (3 mmol ATP/mmol unidade glicosil contra 38 mmol ATP/unidade glicosil da via aeróbia). Corresponde aos exercícios de alta intensidade e curta duração, tais como os piques de 400 e 800 m. Entretanto, sua utilização é limitada no tempo e não permite mais que três minutos de esforço em humanos. Persistindo a predominância desta via metabólica durante o exercício, pode-se observar uma acidose metabólica, resultante do concomitante efluxo de íons H^+ e lactato do interior da célula para o líquido extra-celular (Juel, 1996). Assim, nesta via, o fator limitante do esforço não é o esgotamento das reservas, mas o acúmulo dos produtos de seu metabolismo.

Até pouco tempo atrás acreditava-se que num exercício físico o recrutamento das duas vias anaeróbias era seqüencial. Margaria e colaboradores (1964-1969), propuseram que a PC era o único substrato para ressíntese de ATP durante os primeiros 10 segundos de esforço máximo, e que a participação da glicólise anaeróbia só se iniciava após a depleção total das reservas de PC. No entanto, estudos mais recentes contestam esta teoria. Saltin et al. (1968), demonstrou que voluntários pedalando 10 segundos em intensidade relativa à 110% de seu VO_2 max. apresentaram concentração de lactato muscular aumentada em relação aos valores basais de repouso. Da mesma forma vários outros autores demonstraram aumento da concentração de lactato durante este período de tempo em diversos modelos experimentais e modalidades de atividade física (Boobis et al., 1982; Jacobs et al., 1983; Hultman e Sjoholm, 1983; Nevill et al. 1989). Atualmente acredita-se que a glicólise é a via anaeróbia de ressíntese de ATP mais significativa, com participação crescente em situações extremas. Durante esforços de alta intensidade, de aproximadamente 3 minutos, a glicólise anaeróbia em humanos, é

responsável por até 80% do ATP necessário para sua realização (Spriet, 1995).

Sistema do Oxigênio ou Metabolismo Oxidativo:

Nesta via de ressíntese o ATP é formado através da oxidação total dos carboidratos (principalmente degradação de glicogênio) ou dos ácidos graxos (provenientes de triglicérides) a CO_2 e H_2O , às custas do O_2 molecular. Sabemos que a produção aeróbia de ATP acontece nas mitocôndrias, mais precisamente pelo acoplamento do ciclo de Krebs no caso dos carboidratos, e do ciclo de Lynen, no caso dos ácidos graxos à cadeia respiratória.

A produção de ATP está intimamente ligada à formação de um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) na membrana mitocondrial interna, conhecido como força próton-motriz.

A formação do ($\Delta\mu\text{H}^+$) é garantida pela reoxidação das coenzimas NADH e FADH_2 (formadas nas reações de óxido-redução na matriz mitocondrial) pelas proteínas da cadeia de transporte de elétrons, situadas na membrana mitocondrial interna. Ou seja, as reações de óxido-redução que ocorrem pela passagem de elétrons pelos quatro complexos protéicos, com o O_2 funcionando como acceptor final de elétrons, gera energia suficiente para bombear prótons unidirecionalmente da matriz para o espaço intermembranas. A volta específica de prótons pela enzima FoF1 ATPase (ATP sintetase), também localizada na membrana mitocondrial interna, é termodinamicamente favorável e é imprescindível para a liberação do ATP formado (Mitchell, 1961).

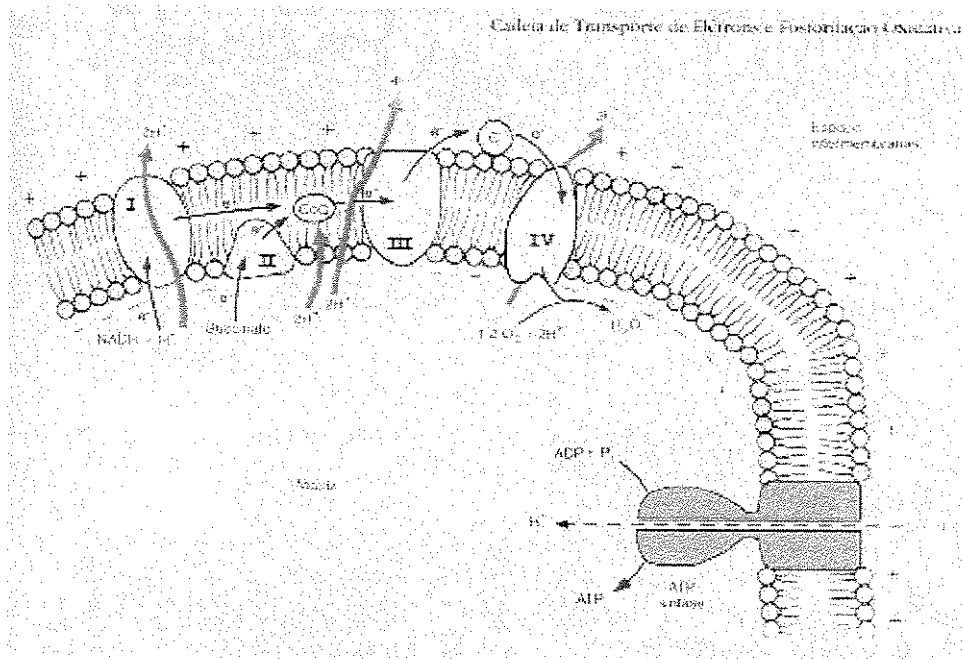


Figura 1: Esquema da membrana interna da mitocôndria, mostrando a formação do $\Delta\mu H^+$ e a entrada de prótons pela *FoF1-ATP sintetase*, imprescindível para a síntese de ATP in vivo. (Extraído de Bioquímica Básica, Marzzoco A. e Torres B.B., Guanabara Koogan 2ª ed.)

Esta via é recrutada principalmente em atividades de longa duração e também durante as pausas, na recuperação de esforços intensos. Embora seja mais lenta que as anteriores fornece uma grande quantidade de energia, proporcionando um maior rendimento, sem acúmulo de metabólitos. É a via privilegiada nos esforços do tipo endurance ou de resistência, onde a capacidade orgânica de fornecer oxigênio para a oxidação total da molécula de substrato, é o principal fator limitante.

Ao longo de uma competição de endurance, em particular na partida ou em função da velocidade momentaneamente desenvolvida, ou da topografia do percurso em determinados trechos, o metabolismo anaeróbio prevalece, pois o organismo tem uma necessidade momentânea e urgente de uma grande quantidade de energia, que é disponibilizada

através da ação da adrenalina. Portanto, há formação de lactato muscular ao longo de um exercício de longa duração, mas o organismo é capaz de remover e metabolizar o lactato formado, reutilizando-o como fonte de energia. Estabelece-se então um equilíbrio entre a produção e a metabolização do lactato sanguíneo. Entretanto, se este equilíbrio for rompido, a lactatemia aumentará exponencialmente em comparação à intensidade de esforço, levando à fadiga através da depleção do glicogênio muscular, impossibilitando a continuidade do esforço (Iuliano et al., 1992).

Metabolismo do lactato.

A concentração de um metabólito no sangue, como por exemplo o lactato, reflete a diferença entre a velocidade de seu transporte, dos locais onde é produzido, para o sangue e a de sua metabolização, nos tecidos. Portanto, um aumento da lactatemia não significa necessariamente que sua produção tenha aumentado pois pode estar ocorrendo uma diminuição na sua remoção o que também pode aumentar a concentração do lactato circulante. É fato que o déficit de oxigênio acelera a produção de lactato, via glicólise anaeróbia. No entanto acreditou-se por muito tempo que a presença de lactato no sangue e no músculo durante o exercício fosse fruto somente de metabolismo anaeróbio. Segundo Connett, (1984) o lactato é contínua e freqüentemente formado e eliminado em alta velocidade, mesmo em repouso, em músculos adequadamente oxigenados. Portanto, um aumento da lactatemia significa apenas que o índice de sua entrada no sangue excedeu o índice de sua remoção. Em indivíduos em repouso o lactato é formado em diversos tecidos tais como nos intestinos, nos músculos esqueléticos, nas hemáceas e até mesmo em algumas partes do fígado, embora a glicólise das hemáceas pareça ser sua principal fonte. Nesta situação os tecidos onde o lactato é removido incluem o coração, certas partes do fígado, rins e possivelmente fibras musculares de contração espasmódica lenta, responsáveis pela manutenção do tônus

muscular. Esta remoção consiste na sua oxidação mitocondrial até CO_2 e H_2O ou na síntese de glicose através da gliconeogênese, via reversa da glicólise (McDermontt, 1993).

Durante um treinamento extenuante os níveis de lactato no sangue aumentam muito. Com o início do exercício, há uma enorme aceleração na velocidade de quebra do glicogênio muscular (glicogenólise) e na absorção e catabolismo da glicose (glicólise) (Brooks, 1984). O aumento da glicólise no músculo conduz inevitavelmente a um aumento na produção de lactato e a conseqüente elevação de sua concentração no sangue. Embora o nível de lactato durante o exercício dependa de vários fatores, a duração e a intensidade do exercício parecem ser as determinantes principais. Assim, grande parte do aumento na demanda por energia no início do exercício será suprida pela quebra incompleta da molécula de glicose, basicamente através da glicogenólise e glicólise anaeróbia. Uma vez que apenas uma pequena quantidade de energia (ATP) é produzida para cada molécula de glicose nesse processo, a velocidade da glicólise anaeróbia deverá ser mais alta do que a capacidade da mitocôndria, relativamente ativa do músculo de oxidar o lactato em H_2O e CO_2 . Conseqüentemente, há um aumento do lactato sangüíneo porque o lactato muscular é “derramado” no sangue. Se o exercício for submáximo, a fosforilação oxidativa das mitocôndrias musculares oxidará o lactato proporcionando maior rendimento energético além de diminuir a solicitação da via glicolítica anaeróbia. Desta forma, a velocidade de aumento da concentração de lactato no sangue diminuirá (Brooks, 1986).

Pesquisas recentes com isótopos marcados em seres humanos, e em outras espécies mamíferas e não mamíferas, demonstraram que os índices elevados de produção e eliminação de lactato, mantidos a 300-500% dos índices em repouso, embora o consumo de oxigênio tenha se estabilizado em níveis submáximos (Brooks et al., 1985; Stanley, 1985). Assim, níveis estáveis de lactato podem ser mantidos durante exercício prolongado apesar do aumento na sua produção, uma vez que os mecanismos de

remoção são adequados para que este se iguale à produção.

Mc Garry e colaboradores (1983) tentaram explicar, através de experimentos utilizando glicose e lactato marcados com isótopos radioativos, como a produção e eliminação do lactato são balanceadas durante o exercício, e como esse balanceamento afeta a concentração de lactato no sangue (Brooks, 1986) . Essa hipótese de Mc Garry sustenta que o lactato, quando formado em lugares onde há quebra de glicose e glicogênio em alta velocidade, pode atingir lugares onde pode ser usado como combustível, ou servir como fonte para a gliconeogênese ou para a ressíntese do glicogênio (Gaesser et al., 1980).

Assim, o lactato liberado de fibras musculares glicolíticas ativas seria reciclado por este mesmo músculo em poucos segundos, tornando-se disponível para fibras oxidativas que ali co-habitam. Segundo Juel (1996) e Marieangela et al. (1998), as fibras oxidativas do tipo I possuem uma maior quantidade de transportadores (translocases) de monocarboxilatos (TMC), do que as fibras do tipo II, o que favoreceria o influxo celular de lactato. Conseqüentemente, aproximadamente 75% do lactato produzido durante exercício estável e submáximo é rapidamente usado como fonte de produção de energia aeróbia. Segundo Gleesson (1996), esta taxa pode chegar, em algumas espécies, a 90 %. Sua conversão em glicose no fígado e nos rins parece ser responsável por aproximadamente 25% de sua remoção durante o exercício. Tal remoção evitaria que o sistema acumule quantidade elevada de lactato no sangue. Além disso, a gliconeogênese hepática a partir do lactato parece ser o principal meio de manter a quantidade adequada de glicose sangüínea durante o exercício prolongado (Gleesson, 1996).

Ahlborg et al. (1986), demonstrou que o transporte vascular de lactato dos músculos inativos para o fígado, e finalmente para músculos em recuperação, pode auxiliar a reposição do glicogênio muscular, gasto em exercício extenuante. O lactato, em pessoas que se submetem a exercícios que levem à fadiga muscular é liberado das reservas de

glicogênio de músculos inativos, ou moderadamente exercitados, como por exemplo os músculos dos membros superiores de um corredor. O lactato liberado alcança o fígado e os rins, onde é convertido em glicose para ser mais uma vez liberada na circulação geral, voltando aos músculos, então ativos, e agora em recuperação, funcionando como precursor para a repleção do glicogênio muscular (Holden et al., 1995).

Seria razoável perguntar por que o lactato é um intermediário tão importante no metabolismo energético durante e após exercício. A resposta totalmente correta ainda é desconhecida, mas há aparentemente fortes razões fisiológicas:

- O lactato - contrastando com a glicose e outros compostos orgânicos combustíveis - é um substrato menor e mais prontamente disponibilizável, sendo transportado através da membrana celular de forma facilitada, pois seu transporte não exige a presença de co-fatores como a insulina.
- O lactato pode ser formado rapidamente no músculo em grandes quantidades e liberado na corrente circulatória.

Por outro lado, as células musculares, com grandes reservas de glicogênio não podem liberar na corrente sangüínea quantidades significativas desta reserva em forma de glicose defosforilada, devido à ausência da enzima glicogênio fosfatase.

Além disso, é importante ressaltar que o sistema lactato/ácido láctico é um sistema tampão constituído de um ácido fraco (ácido láctico) e sua base conjugada (lactato). Em pH fisiológico a constante de dissociação do ácido láctico (pK_a) favorece a formação da sua base conjugada, o lactato, liberando próton - íon H^+ . Juel (1996) afirma que o pH intramuscular é mais alcalino do que o seria se o transporte de H^+ pelo sarcolema fosse apenas passivo. De fato, foi descrito um carreador lactato/ H^+ em todos os tipos de células, e atribui-se a este co-transporte

(1:1) a função de regulação do pH intracelular no músculo em atividade (Juel, 1996). Esta regulação confere ao lactato uma importante função metabólica em condições de exercício. É importante ressaltar ainda que a capacidade de transporte deste carreador parece ser aumentada pelo treinamento para endurance (McDermontt, 1993). Além disso o lactato também parece ser efector alostérico negativo da mioglobina (Giardina et al., 1996), favorecendo a disponibilização do oxigênio no tecido muscular.

Limiar metabólico de lactato.

O consumo máximo de oxigênio (VO_2 max.), ou a potência aeróbia máxima, varia individualmente e corresponde ao ponto onde o metabolismo aeróbio chega ao seu limite. Ultrapassado este limiar metabólico aeróbio a energia extra provém somente do metabolismo anaeróbio, gerador de lactato. Este ponto de transição é comumente considerado por fisiologistas e treinadores como sendo o limiar anaeróbio ou aero/anaeróbio que, tal como a potência aeróbia máxima, também apresenta variação individual.

Assim, a melhora da potência aeróbia traduz uma adaptação do sistema oxidativo, com aumento da produção de ATP via fosforilação oxidativa. Isto é benéfico, do ponto de vista de armazenamento de reservas anaeróbias, possibilitando um aumento da carga de esforço. Assim, a determinação do VO_2 max., e do limiar de lactato são duas técnicas utilizadas como critérios de avaliação de desempenho. O condicionamento de endurance exprime, dentre outras características orgânicas, a capacidade aeróbia de um indivíduo.

Universalmente as diferentes metodologias de determinação de limiares fornecem parâmetros que podem ser utilizados para: selecionar atletas, diagnosticando sua capacidade de desempenho intrínseca ou hereditária, e prognosticar desempenhos; modular a intensidade de treinamento em função do objetivo a ser alcançado; monitorar os efeitos

provocados ou adaptações induzidas pelo treinamento.

Um problema envolvendo os limiares é o grande número de terminologias empregadas pelos pesquisadores para identificar fenômenos iguais ou semelhantes. Entretanto, eles podem ser divididos basicamente em duas categorias, para identificar o fenômeno definido por sua terminologia (Denadai, 1995):

Limiares que identificam o início do acúmulo do lactato no sangue (Lactate breaking point).

- Consideram concentrações variáveis de lactato para a determinação da intensidade de exercício..

O termo OPLA (onset of plasma lactate accumulation), proposto por Farrel et al., (1979) refere-se à intensidade de exercício anterior ao aumento exponencial do lactato no sangue. Este mesmo referencial é também chamado por outros autores de Limiar de Lactato (LT) ou lactate threshold (Ivy et al., 1980, Tanaka et al., 1984; Weltman et al., 1990). Esse mesmo termo LT pode ser determinado de outra maneira, segundo outros autores. Coyle et al., (1983) definiram o LT como a intensidade de exercício que determina um aumento de 1 mM no lactato sangüíneo acima dos valores de base. Segundo esses autores, as intensidades de exercício são cerca de 5 % maiores que as determinadas pelo teste OPLA, resultando, em função da depleção do glicogênio, num tempo de fadiga muito similar entre os indivíduos de cerca de 3 horas (Coggan & Coyle, 1991; Coyle, 1995).

Limiares que identificam a concentração máxima de lactato em fase estacionária (MSSLAC - Maximum stedy state lactate concentration).

- Utilizam principalmente concentrações fixas de lactato para a identificação da intensidade do exercício.

O grupo de cientistas alemães propõe o termo Limiar anaeróbio (Kindermann et al., 1979) ou Limiar aeróbio-anaeróbio (Mader et al., 1976), enquanto o grupo escandinavo propõe o termo OBLA (onset of blood lactate accumulation) (Heck et al., 1985) para identificar a intensidade de exercício correspondente a 4 mM de lactato no sangue. A justificativa para a escolha desta concentração fixa se dá em função da maioria dos indivíduos apresentarem, nessa intensidade de exercício, o máximo balanço entre a produção e remoção do lactato (Heck et al., 1985). No entanto, Stergmann et al. (1981) mostraram que, embora a concentração de lactato no MSSLAC seja aproximadamente 4 mM, ocorre grande variação individual, propondo o termo limiar anaeróbio individual (IAT) para uma metodologia que identifique a MSSLAC de maneira individualizada (Stergmann et al., 1981).

Recentemente, foi proposta uma nova metodologia para identificar a velocidade equivalente a MSSLAC. Neste protocolo, proposto para atletas humanos, dentre eles um grupo de maratonistas e um grupo de jogadores de basquete, os indivíduos realizavam um “ tiro ” de 200 metros em aproximadamente 30 segundos e em velocidade máxima. Após esta etapa denominada pré-teste, os atletas tinham seu lactato sangüíneo mensurado, após repouso de 8 minutos, antes de iniciarem uma série de “ tiros ” de 800 metros em velocidades sub-máximas e crescentes. Ao final de cada “ tiro ” o lactato era imediatamente medido (Tegtbur et al., 1993). Nesta fase, com a diminuição na intensidade do esforço, o lactato sangüíneo é removido e eliminado. Sua concentração diminui na corrente sangüínea até atingir um valor mínimo, aumentando novamente com a progressão da intensidade do esforço. A intersecção da curva de remoção do lactato previamente produzido no pré-teste com a curva de acúmulo induzido pelos “ tiros ” sucessivos em velocidades sub-máximas, corresponde à LMS (Lactate Minimum Speed), também denominada máxima fase estável de lactato, intensidade de exercício onde existe equilíbrio entre produção e remoção de lactato. Além da vantagem de

permitir uma avaliação anaeróbia e aeróbia em um só teste, verificou-se também que esta metodologia não sofre influência da disponibilidade de glicogênio muscular (Tegtborg et al., 1993).

No desporto eqüestre brasileiro, dosagens bioquímicas como a de lactato ainda não são utilizadas para o monitoramento do condicionamento físico. Comumente, dosagens bioquímicas são utilizadas somente em grandes centros hípicas para diagnosticar disfunções ou má performance (Cotta e Ferreira, 1995). Entretanto, a exata determinação do limiar aero/anaeróbio é extremamente importante em cavalos atletas, especialmente os enduristas que são submetidos involuntariamente a esforços extenuantes de até 160 Km, em velocidade livre - média de aproximadamente 15 Km/h em competições internacionais, possibilitando a ocorrência de exaustões fatais (Eldric yearbook 1989).

Os dois parâmetros mais utilizados internacionalmente em eqüinos são (Hodgson e Rose, 1994):

- O limiar aeróbio, definido como a intensidade de esforço correspondente à concentração de 2.5 mmol de lactato / L de sangue.
- O limiar anaeróbio, OBLA, definido como a intensidade de esforço correspondente à concentração de 4.0 mmol de lactato /L de sangue.

Estresse.

O organismo de um atleta durante uma competição, especialmente de resistência, é submetido a diferentes tipos de estresse. Estes provocam a deterioração de sua homeostase geral, diminuindo ao longo do tempo sua capacidade de prosseguir com o esforço. Estas agressões podem ter origens externas como os estresses mecânico e térmico. O estresse térmico também possui origem orgânica, pois a temperatura intramuscular pode elevar-se a níveis comprometedores, devido ao exercício (Saltin et al., 1968). Contudo, o estresse oxidativo tem origem exclusivamente orgânica.

Estresse oxidativo.

Embora a caracterização definitiva do mecanismo de fadiga muscular ainda esteja sob intensa investigação, uma teoria recente sugere que o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), produzidas principalmente como consequência do aumento na respiração celular, exerça um papel importante no desenvolvimento deste processo. A fibra muscular é o principal local de fadiga associada ao exercício físico. Assim, desde 1982, quando Davies e colaboradores sugeriram que o dano oxidativo intramuscular era a causa da fadiga, acumula-se um número relativamente grande de evidências experimentais consistentes que evidenciam uma relação tipo causa-efeito entre estresse oxidativo e fadiga muscular (Reiser et al., 1985 e Fitts, 1994).

Fontes produtoras de radicais livres no exercício.

O exercício físico, entre outros fatores, aumenta o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, abaixa a razão ATP/ADP, com consequente aumento na concentração de AMP e aumento na concentração de Ca^{2+} no citosol celular. Todas estas condições podem levar a um aumento na formação do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), tanto pelo vazamento de elétrons na cadeia respiratória quanto pelo aumento na atividade da enzima xantina oxidase. Esta enzima localiza-se na parede dos vasos sanguíneos da maioria dos tecidos, entre eles o músculo esquelético, e participa da via de degradação do AMP a ácido úrico (Holloszy, 1967; Dohm et al., 1973; Mahdavi et al., 1987; Rasanen et al., 1996). Além disso, o $\text{O}_2^{\cdot -}$ pode ser formado intracelularmente pela ação da enzima citocromo P450 oxidase (Essig & Nosek, 1997). O $\text{O}_2^{\cdot -}$ produzido na célula é muito instável e se dismuta espontaneamente a H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), ou ocorre a catálise enzimática via superóxido dismutase (SOD). Tanto o H_2O_2 como o $\text{O}_2^{\cdot -}$ estão correlacionados com a formação de espécies

radicais potentes, entre elas o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), capazes de atacar moléculas biológicas. Os íons de metais de transição, notadamente os íons de ferro, por estarem em maior concentração no organismo, tem sido correlacionados com a formação dessas espécies reativas (Farber et al., 1990 & Gutteridge, 1995). Nesse sentido, há estudos que indicam que o exercício físico também induz aumento na concentração de Fe^{2+} livre (Winder et al., 1974).

O músculo esquelético também produz óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), pela reação da enzima óxido nítrico sintase, tendo arginina como substrato (Reid, 1996). O $\cdot\text{NO}$ pode reagir com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e formar peroxinitrito (ONOO^-), um intermediário instável, que pode se decompor em um oxidante tão potente quanto o $\cdot\text{OH}$ (Mahdavi et al., 1987). Extracelularmente, a enzima NADPH oxidase, presente em neutrófilos e macrófagos é ativada durante a fagocitose e também aumenta a produção de EROS (Mahdavi et al., 1987).

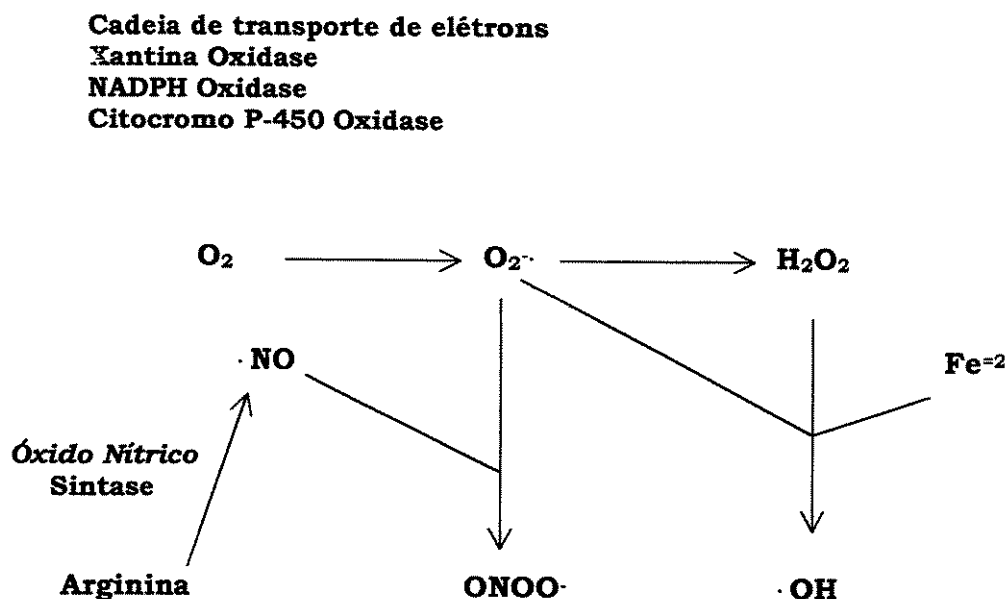


Figura 2: Vias de formação de EROs (Essig & Nosek, 1997). $\text{O}_2^{\cdot-}$ (radical ânion superóxido); $\cdot\text{OH}$ (Radical hidroxila); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio); $\cdot\text{NO}$ (óxido nítrico); ONOO^- (ânion peroxinitrito).

Os alvos mais importantes das EROS são: As membranas celulares e intracelulares, com o início e a propagação da peroxidação lipídica; as proteínas, que sofrem maior ataque proteolítico devido a sua carbonilação; as moléculas do DNA (nuclear e mitocondrial), com o aparecimento de quebras e/ou ligações cruzadas com proteínas, eventualmente irreversíveis, (Imlay e Linn, 1988; Farber et al., 1990).

Defesa antioxidante

Embora fisiologicamente todas as células aeróbias gerem, enzimaticamente ou não, espécies radicalares, as abundantes defesas antioxidantes dos organismos previnem o dano celular causado por EROS. O sistema de defesa antioxidante é constituído principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione redutase (GR). Todavia, moléculas seqüestradoras de espécies radicalares, tais como ascorbato, glutathione reduzida, cisteína e alfa-tocoferol, embora ofereçam proteção menos específica, também limitam o dano total das células (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Papel das espécies reativas de O₂ no organismo.

Uma série de condições, nas quais a velocidade de formação de espécies reativas está aumentada e/ou as defesas antioxidantes das células estão diminuídas. Neste caso, está estabelecido um *estresse oxidativo*, que pode resultar em dano ou mesmo morte celular. Há teorias que sugerem o envolvimento de radicais livres com processos de envelhecimento, câncer, lesões por radiação, danos celulares e tissulares pós-isquêmicos e também com o exercício físico (Souminen et al., 1977; Davies et al., 1982; Imlay e Linn, 1988; Farber et al., 1990; Alessio, 1993; Gutteridge, 1995).

Entretanto, recentemente, espécies oxidantes como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ e hidroperóxidos lipídicos (intermediários da cadeia de peroxidação lipídica) estão sendo relacionados com a indução de vários processos biológicos como crescimento celular, adesão celular, apoptose e ativação do vírus HIV (Gillespie et al., 1982; Mahdavi et al., 1987; Iuliano et al., 1994). Evidências experimentais sugerem que esta ação seja ao nível de transdução de sinal, através da interação com receptores. Isto levou à proposição de que as espécies reativas de oxigênio também poderiam exercer funções de segundo mensageiro celular (Iuliano et al., 1992; Iuliano et al., 1994). Além disso foi mostrado que a exposição de células de músculo esquelético a EROS afeta a velocidade de transporte de vários metabólitos através do sarcolema tais como, glicose (Balon e Nadler, 1994) e iônico, incluindo a troca Na^+/Ca^{2+} (Goldhaber, 1996), e potássio (Sen, 1995).

Treinamento X Estresse oxidativo.

O exercício físico tem uma forte relação com a produção de radicais livres. A demanda por oxigênio nesta situação está aumentada cerca de 10 a 20 vezes quando comparada ao repouso (Astrand e Rodahl, 1986). Entretanto, a ocorrência ou não de um estresse oxidativo para as células parece estar mais relacionada à intensidade de esforço empregada durante o treinamento. Aparentemente o treinamento físico de característica aeróbia induz um aumento na capacidade oxidativa do músculo esquelético com o aumento concomitante da resistência orgânica geral, além das diversas adaptações bioquímicas e fisiológicas descritas anteriormente (Davies et al., 1981). Por outro lado, todos os resultados obtidos com animais submetidos a exercício físico exaustivo, sugerem um aumento nos danos celulares (Alessio e Goldfarb, 1988; Alessio, 1993).

Nosso grupo de pesquisa vem obtendo resultados interessantes em ratos e em humanos, que mostram que protocolos de treinamento sub-

limiar contínuo induzem um grande aumento nos níveis sérico e intramuscular de enzimas antioxidantes enquanto o treinamento intermitente é muito mais eficiente em promover o aumento da capacidade oxidativa muscular (Zoppi et al., 1999). Nosso grupo também observou que o treinamento intermitente é menos eficiente em aumentar o sistema de defesa antioxidante, o que o torna potencialmente mais perigoso para as células musculares, pois provoca um nível maior de estresse oxidativo (Smolka et al., 1999)

Em eqüinos de competição este mecanismo ainda é pouco estudado. O Animal Health Trust em Newmarket, Inglaterra, pesquisa o envolvimento do NO no sistema respiratório e na termorregulação de eqüinos de corrida. Em um destes trabalhos concluiu-se que o estresse oxidativo pode ser um importante fator predisponente de afecções respiratórias (Mills, 1997). Este grupo de pesquisa também demonstrou um aumento de hidroperóxidos lipídicos, glutathiona oxidada (GSSG), xantina e ácido úrico, em eqüinos de corrida (Puro Sangue Inglês) submetidos a exercício intenso em ambiente quente e úmido (Mills, 1996). Rasanen e colaboradores (1996), utilizando cavalos de corrida de trote, demonstraram que o exercício intenso causa um aumento nas concentrações plasmáticas de ácido úrico, lactato e TRAP (Total peroxy Radical-trapping Antioxidative Parameter) e na atividade da enzima Xantina Oxidase (XO), sugerindo a existência de um limiar de ácido úrico.

Foi também demonstrada uma diminuição na capacidade do sistema de defesa enzimático após 2 meses de treinamento em intensidades progressivamente aumentadas. Neste trabalho houve concomitante suplementação de Selenium e Vitamina E (Avellini et al., 1995). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo, acompanhando o efeito de uma série de exercícios em cavalos de corrida com 3 meses de treinamento, mostrou que o aumento nos índices de peroxidação lipídica não foi acompanhado por uma diminuição significativa na concentração de Glutathiona reduzida, nem por um aumento nos níveis de lesão muscular, representado pela

enzima creatina quinase, sugerindo que o exercício aplicado não tinha sido eficiente em provocar um estresse oxidativo capaz de desencadear lesões mais graves (Chiaradia et al., 1998).

OBJETIVOS

Parte I

Limiar de lactato.

1. Padronizar o protocolo de Lactate Minimum Speed (Tegtbur et al., 1993), para a determinação de limiar metabólico individual aero/anaeróbio de lactato em eqüinos iniciantes em enduro eqüestre.
2. Acompanhar o efeito de um ano de treinamento de endurance sobre o limiar de 2 cavalos.
3. Acompanhar a variação na concentração sangüínea de glicose de eqüinos submetidos aos experimentos de determinação de limiar de lactato, e correlacioná-la com a lactatemia, vislumbrando a possibilidade de sua utilização como metodologia de determinação de limiar aero/anaeróbio (Simões et al., 1997).
4. Verificar o efeito do treinamento de endurance sobre a capacidade de remoção do lactato sangüíneo acumulado após exercício intenso, em eqüinos.

Parte II

Estresse Oxidativo.

1. Monitorar o nível de estresse oxidativo provocado por uma competição de enduro eqüestre de 210 km realizada em 3 dias, em 9 eqüinos árabes puros e mestiços, através das dosagens de dois marcadores do ataque oxidativo, e dois marcadores do sistema enzimático de defesa antioxidante em plasma.

Biomarcadores utilizados para a quantificação do nível de ataque oxidativo:

a) TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Quantificação espectrofluorimétrica da concentração plasmática de aldeídos de baixo peso molecular, resultantes do ataque de radicais livres às membranas celulares.

b) Proteína carbonilada. Quantificação espectrofotométrica da concentração plasmática de proteínas carboniladas pelo ataque radicalar.

Biomarcadores utilizados para a quantificação da atividade do sistema enzimático de defesa antioxidante:

a) Catalase (CAT). Quantificação espectrofotométrica de sua atividade enzimática em hemolisado de sangue eqüino.

b) Glutathione redutase (GR). Quantificação espectrofotométrica de sua atividade enzimática em hemolisado de sangue eqüino.

Biomarcador utilizado como índice de lesão muscular:

a) Creatina Quinase (CK). Quantificação reflectométrica de sua atividade enzimática em sangue total eqüino.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Parte I

Limiar de lactato.

Cinco cavalos adultos, iniciantes na disciplina de Enduro Equestre, sendo dois árabes puros, dois mestiços árabe, e um de outra raça, possuindo diferentes idades (Tabela 2), após terem sido submetidos a anamnese completa, incluindo histórico desportivo, foram submetidos aos experimentos para a padronização de determinação de limiar aero-anaeróbio de lactato através da modificação e conseqüente adaptação para eqüinos, do protocolo LMS (Tegtbur, 1993) originariamente descrito para humanos.

Tabela 2: Caracterização dos cavalos utilizados nos experimentos de determinação de limiar.

Cavalo	Raça	Uso/ esporte	Idade (anos)	Sexo *	Peso (Kg)	FC. Repouso (bpm)	Lactato repouso (mmol/L)	Glicose Repouso (mg/dL)
1	Árabe	Enduro	7	C	390	36	1.2	80
2	Q. M. #	Laço	10	C	445	38	1.6	86
3	Árabe	Enduro	6	G	400	35	1.3	83
4	A/árabe	Lazer	12	G	410	32	1.6	65
5	A/árabe	Salto	9	C	510	39	1.5	75

(*) G - garanhão C - castrado (#) Quarto de milha.

A padronização da determinação do limiar de lactato em eqüinos foi dividida em três experimentos distintos:

Experimento I - determinação do pico de lactatemia (PL) após exercício intenso.

Experimento II - determinação da máxima velocidade em mínima lactatemia (LMS).

Experimento III - confirmação do limiar obtido através do protocolo LMS (CL).

Utilizamos em todos os experimentos uma pista de grama plana e

reta, com 1.200 m de comprimento e balizada a cada 200 m.

Monitoramos a frequência cardíaca através de cardiofrequencímetro (Vanguard), visando sua utilização, em competições, como parâmetro de esforço correlacionado à lactatemia.

As análises bioquímicas foram feitas com amostras de sangue coletadas da veia jugular através de seringa e agulha descartáveis. A lactatemia foi dosada através de tiras reativas descartáveis em lactímetro portátil Accusport®-Böehringer Mannheim, (Evans et al., 1996; Hodgson, 1996; Willianson et al, 1996; Lindner, 1996; Fell et al, 1997).

Para a quantificação da glicemia, foi empregado glicosímetro portátil Accutrend alpha®-Böehringer Mannheim, e suas respectivas tiras reativas descartáveis.

Nas análises de lactatemia e glicemia feitas com os animais em repouso, as amostras de sangue foram coletadas antes da realização dos experimentos I, II e III, que sempre foram feitos em dias diferentes mas aproximadamente no mesmo horário. Cada cavalo forneceu, portanto, três amostra obtidas em três diferentes dias.

Experimento I

Determinação do pico de lactatemia (PL) após exercício intenso.

Para a sua execução, foi realizado um aquecimento (warm-up) de 10 min ao passo, 5 min ao trote e 1 min ao galope (canter). Após o aquecimento foi realizado um galope de 500 m em máxima velocidade, e com os animais parados, ao final do galope, a lactatemia foi dosada em intervalos de 2 min durante 20 min.

Experimento II

Determinação da máxima velocidade em mínima lactatemia (LMS).

Após a determinação do pico de lactatemia (experimento I) realizamos outro galope de 500 m e dosamos a concentração do lactato

sangüíneo no tempo de pico previamente determinado. Os cavalos permaneceram em repouso enquanto aguardavam o tempo de pico. Após este segundo galope denominado pré-teste (PT), e a subsequente dosagem da concentração de lactato, "tiros" de 1.000 m. denominados (Tn), foram executados seqüencialmente em velocidades sub-máximas e gradualmente aumentadas. Ao final de cada "tiro", a freqüência cardíaca foi anotada, a lactatemia e glicemia dosadas, e o tempo cronometrado para a determinação da velocidade. O intervalo entre cada "tiro" foi de 2 min, sendo que, (T1) e (T2) foram feitos ao trote e os demais ao galope. Realizamos tantos "tiros" quantos foram necessários, até evidenciarmos a re-elevação dos valores de lactatemia, após uma fase de decréscimo até valores próximos aos de repouso (Figura 3). A velocidade em (T1) foi de aproximadamente 12 km/h. Os tempos parciais a cada 200 m, foram utilizados para a manutenção de velocidade constante, que foi controlada pelo cavaleiro.

Experimento III

Confirmação do limiar obtido através do protocolo LMS (CL).

Em um terceiro experimento denominado Confirmação de Limiar (CL), submetemos estes mesmos animais a uma corrida de 10.000 m, nas mesmas condições de pista já descritas e na velocidade do limiar pré-determinada no experimento anterior. A cada 2.000 m, após a aferição do tempo de corrida e anotação da F.C., a corrida era interrompida momentaneamente para retirada de sangue para dosagem de lactato. A zona alvo do cardiofreqüencímetro foi ajustada na F.C. correspondente ao limiar. As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular através de seringa e agulha descartáveis, e imediatamente aplicadas nas tiras reativas.

Parte II

Estresse oxidativo.

Acompanhamos ao longo de três dias de competição, nove cavalos identificados na Tabela 3 como grupo II, na primeira prova brasileira de enduro eqüestre, realizada na forma de “Multi Days Event”. Esta prova contou com a participação de 29 concorrentes, dos quais apenas 15 concluíram todas as três etapas, que foram de aproximadamente 70 km, totalizando 210 km. A topografia do percurso variou de levemente acidentada a acidentada, o que configurou um considerável nível de dificuldade para os concorrentes.

Um dos cavalos participantes foi o mesmo utilizado nos experimentos de determinação de limiar (tabela 2 cavalo 3) e foi especialmente treinado pelo autor desta tese, visando o monitoramento de seu desempenho nesta competição. Este cavalo (tabela 3 cavalo 3) portou durante toda a prova um cardiofreqüencímetro com sua zona alvo ajustado na freqüência cardíaca de 130 bpm, correspondente à sua velocidade de lactato mínimo obtida nos experimentos de determinação de limiar (Resultados e Discussão, parte I), visando a manutenção constante de um trabalho aeróbio. Os outros oito animais utilizados neste experimento foram selecionados visando a constituição de dois grupos: um constituído de cavalos experientes e o outro constituído de cavalos iniciantes em provas de enduro eqüestre de longa distância.

Tabela 3 : Caracterização dos cavalos monitorados durante a competição de 210 km.

Cavalo	Raça	Idade (anos)	* Sexo	+ Km Veloc. livre	# Prêmios Veloc. livre	Tempo de treino (meses)	Repouso pré-prova (dias)	Peso do cavaleiro (Kg.)
1	A. árabe	11	C	250	1x1 ⁰ , 1x3 ⁰	48	10	75
2	A. árabe	15	E	380	2 x 3 ⁰	95	15	75
3	Árabe	6	G	245	1 x 3 ⁰	23	30	80
4	Árabe	6	C	130	ñ	12	7	80
5	Árabe	6	G	190	1 x 3 ⁰	24	7	95
6	A. árabe	8	C	0	ñ	7	3	75
7	½ árabe	10	C	60	ñ	8	5	85
8	A. árabe	9	C	90	ñ	12	5	75
9	Árabe	5	C	60	ñ	6	7	75

(*) Sexo: C - castrado E - égua G - garanhão

(+) Quilometragem percorrida em provas de velocidade livre.

(#) Prêmios conquistados em provas de velocidade livre. Exemplo: Um terceiro lugar (1 x 3⁰).

Processamento das amostras de sangue:

Amostras de sangue foram coletadas através de tubos de 4 ml com vácuo, sistema “vacutainer”, contendo EDTA, imediatamente antes da largada, e aproximadamente 30 minutos após o término de cada etapa diária. As amostras foram acondicionadas em gelo e imediatamente transportadas ao laboratório. As amostras foram então centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos para separação do plasma, que foi imediatamente congelado em biofreezer a -70⁰ C em alíquotas de 1 mL em tubos Eppendorf, para posterior análise. A “papa” de hemáceas foi ressuspensa em tampão fosfato 0.1 M com NaCl 1% pH 7,4, e re-centrifugada a 2.000 x g por 5 minutos, Este procedimento de lavagem das hemáceas foi repetido três vezes. Em seguida, estas foram lisadas adicionando-se água na

proporção de (1:1 v/v) e centrifugadas a 3.000 x g por 10 minutos por duas vezes, a fim de retirar as membranas remanescentes. Desprezamos o sedimento e o sobrenadante foi congelado a -70⁰ C em biofreezer, em tubo Eppendorfs de 1 ml, para posterior análise. Todas as amostras foram armazenadas em duplicata. A Determinação da concentração de hemoglobina foi realizada através do método de Drabkin (Beutler, 1975) onde a Hb em presença de reagente de Drabkin (Beutler, 1975) forma um composto, a cianometahemoglobina, que absorve em 540 nm e cujo coeficiente de extinção milimolar é 11,5 M-1cm-1.

Biomarcadores de ataque oxidativo.

A ocorrência de ataque por radicais livres foi analisada através de duas metodologias: dosagem de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela quantificação do acúmulo de proteínas carboniladas no plasma dos animais.

A) Quantificação de TBARS em plasma. .

Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído e outros aldeídos de baixo peso molecular) que ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) formam base de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 535 nm ou fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (Yagi, 1976). Neste método, 100 uL do plasma descongelado foi tratado com mais 50 uL de BHT 4% (w/v em etanol), 500 uL de SDS 0,3% (w/v), 2 mL de HCl 0,1 M e 300 uL de ácido fosfotungístico 10% (w/v). Após agitação vigorosa adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,7% (w/v) incubando-se a mostra em banho-maria a 90⁰ C por 45 minutos. Após rápido resfriamento das amostras em banho de gelo, o complexo formado com o ácido 2-tiubarbitúrico (TBARS) foi extraído com 3 mL de n-butanol. A leitura da fase orgânica foi feita em

espectrofluorímetro a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão. A concentração de TBARS foi calculada e expressa em nmol TBARS/mL de plasma usando-se uma curva padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP).

B) Quantificação de proteínas carboniladas em plasma.

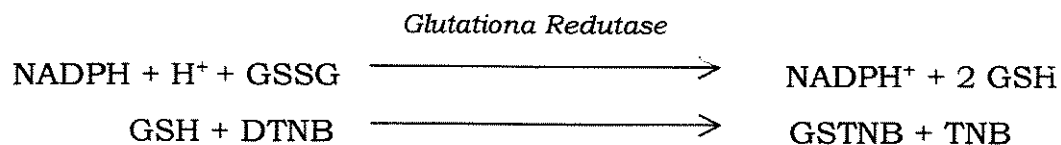
Este método foi o proposto por Levine et al. (1990). O composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) se complexa com grupamentos carbonilados das proteínas, formando bases de Schiff que absorvem a 380 nm. A amostra de plasma (100uL) foi diluída com 900 uL de H₂O deionizada tratada com ácido tricloroacético 20% para precipitação das proteínas, centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos na temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Os experimentos foram feitos em triplicata sendo 3 tubos para amostra, onde foi adicionado 1 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,01M em HCl 2M e 3 tubos para o branco onde adicionamos 1 mL HCl 2M. Em seguida incubamos a solução por 60 minutos a 37⁰ C com agitação a cada 15 minutos. Após a adição de 1mL de ácido tricloroacético 20% as alíquotas foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos na temperatura ambiente e o sobrenadante foi novamente descartado. Lavou-se o precipitado com 1 mL de solução etanol/acetato de etila (1:1) para remover o reagente em excesso. Após 10 minutos descartou-se o sobrenadante. Essas lavagens foram repetidas até se obter um sobrenadante claro que foi descartado. A seguir dissolveu-se o precipitado em 1 mL de solução de guanidina 6M preparada em tampão fosfato de potássio 20 mM cujo pH 2,3 foi ajustado com ácido tricloroacético. A solução de guanidina foi usada com o branco e determinou-se a absorvância da amostra a 380 nm, calculando a concentração das bases de Schiff usando-se o coeficiente de absorção de 22000 M⁻¹ cm⁻¹. O resultado foi dado em nmol/mL (Levine et alii, 1990).

Biomarcadores do sistema de defesa antioxidante.

A) Quantificação da atividade enzimática da Glutathione redutase (GR).

Optamos pela utilização do método descrito por Smith et al. (1988), por garantir uma maior variação nos valores de absorvância, diminuindo assim o erro experimental e evitando interferências, principalmente ocasionadas pela hemoglobina, nos ensaios conduzidos com hemáceas.

As amostras de sangue foram analisadas usando-se 1 uL de hemolisado adicionado a um meio de incubação contendo KH_2PO_4 0.2 M e EDTA 2 mM em pH 7.0. Foram adicionados ainda ao meio de reação 50uL de NADPH 2 mM, 250uL de DTNB 3mM e 50 uL de GSSG 20 mM, a fim de iniciar a reação. O princípio do método é baseado na redução do 5,5 ditiobis (2 ácido nitrobenzóico - DTNB) com formação de TNB e conseqüente aumento na absorvância a 412 nm:

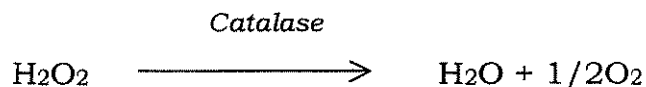


Para o cálculo da atividade da enzima no sangue foi utilizada a seguinte equação: $E = 100 \times A / [\text{Hb}]$, onde E é a atividade em unidades internacionais (UI)/grama de hemoglobina, A é o número de unidades de enzima da amostra e é calculada pela equação: $\Delta A / 13.600 \times V\text{H} / V\text{C}$, onde ΔA é a diferença da absorvância a 412nm em 1 minuto, $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é o valor do coeficiente de extinção molar do TNB a 412nm, $V\text{H}$ é o volume de hemolisado na cubeta, $V\text{C}$ é o volume total da preparação e $[\text{Hb}]$ é a concentração de hemoglobina do hemolisado em g/mL (Beutler, 1975). O resultado foi expresso em UI/g Hb.

B) Quantificação da atividade enzimática da Catalase (CAT).

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras de sangue (idem à glutathione redutase) a tampão fosfato 50 mM e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 mM, (Aebi,

1984). A queda nos valores de absorvância do H_2O_2 é seguida espectrofotometricamente a 240 nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase sangüínea foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A1/A2)$, onde a é o volume de hemolisado na cubeta e b é o volume total da cubeta, $A1$ o valor da absorvância em $t=0$ e $A2$ é o valor da absorvância no tempo final, que em nosso caso se dá aos 15 segundos após o início da reação (Aebi, 1984). O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se a mesma equação descrita para a glutathione redutase, utilizando o valor de coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240 nm de $43.600 \text{ .M}^{-1}\text{.cm}^{-1}$ (Andersen et al, 1997). O resultado foi expresso em k/gHb.

Biomarcador de lesão muscular.

Quantificação da atividade enzimática da Creatina Quinase (CK).

As dosagens destes parâmetros foram executadas com auxílio do aparelho REFLOTRON® - Böehringer Mannheim (Lopes-Pereira, 1997). A análise é feita com auxílio de tiras com uma região reativa onde se encontram os compostos reagentes que quando em contato com o sangue da amostra formam o composto a ser medido por reflectometria. Todas as informações específicas a respeito da dosagem executada estão contidas num código magnético na própria fita reativa, que é lido automaticamente pelo aparelho antes de iniciar a dosagem da amostra propriamente dita. As dosagens foram feitas utilizando-se sangue total (32 uL). A dosagem da concentração de hemoglobina total, se baseia no princípio da cianometahemoglobina, a atividade da CK é determinada indiretamente, através de reações acopladas, seguindo a decomposição do H_2O_2 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I

**Padronização da técnica de limiar
aero/aneróbio para eqüinos, através do
protocolo de determinação da velocidade em
lactatemia mínima (LMS).**

O princípio da técnica proposta por Tegtburg (1993) para humanos baseia-se em uma grande elevação inicial da lactatemia induzida por um exercício em alta intensidade (pré-teste). Após 8 minutos de descanso inicia-se uma série de exercícios em velocidades sub-máximas e crescentes, provocando a diminuição nas concentrações de lactato sanguíneo, principalmente devido a sua oxidação até atingir níveis mínimos. Estes, voltam a se elevar com o incremento do esforço. A velocidade de limiar é determinada na intensidade de esforço correspondente a esta concentração mínima de lactato.

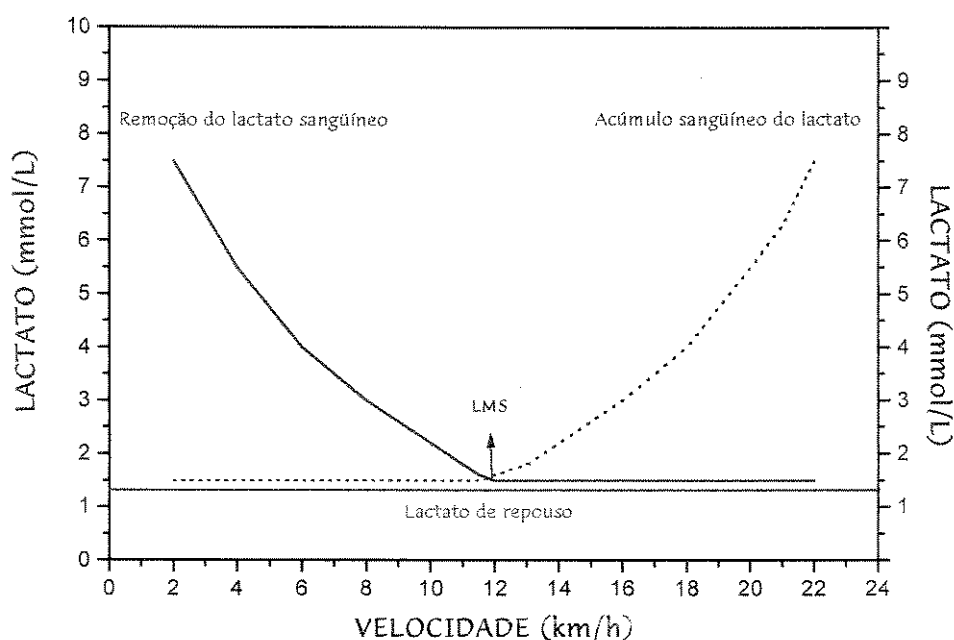


Figura 3. Gráfico representativo da determinação de limiar aero/anaeróbio em eqüinos, através do protocolo LMS modificado.

Os experimentos foram realizados utilizando-se os proprietários, que também são seus cavaleiros, visando a eliminação de variáveis extrínsecas relacionadas ao psiquismo e biodinâmica dos conjuntos (cavalo/cavaleiro), que poderiam provocar variações consideráveis nos resultados (Preuschoft et al., 1995). Desta forma estes parâmetros puderam ser obtidos sob reais condições de competição.

Os resultados desta padronização para eqüinos estão apresentados de maneira individualizada, pois esses animais eram iniciantes na disciplina de Enduro Eqüestre, com treinamentos e desempenhos diferentes uns dos outros. Além disso, o acompanhamento individualizado destes parâmetros é pressuposto para prescrição da intensidade de trabalho e avaliação do treinamento destes atletas.

Dois destes cavalos (1 e 3) foram re-avaliados 12 meses após treinamento para competições de enduro, constituído de uma sessão semanal de aproximadamente 5 horas em intensidade sub-limiar, de forma contínua.

EXPERIMENTO I

Determinação do Pico de Lactatemia após esforço intenso.

A primeira adaptação feita no protocolo original foi a utilização de um galope de 500 m, em velocidade máxima para induzir uma alta lactatemia (pré-teste), visando a determinação do exato momento em que a determinação de limiar deveria se iniciar após a realização do pré-teste.

A Tabela 4 mostra os tempos necessários para que ocorra acúmulo do lactato muscular na corrente circulatória nos cinco cavalos. Para os animais 1 e 3, esta primeira avaliação foi feita antes do início de treinamento.

Tabela 4. Picos de Lactatemia e tempos de pico dos cinco cavalos após galope de 500 m em velocidade máxima.

Cavalo Número	[lactato] no pico (mmol/L)	Tempo p/ formação do pico (min)
1	13,4	15
2	7,3	1
3	8,5	9
4	8,7	3
5	7,7	1

Podemos notar que os tempos necessários para o acúmulo máximo do lactato na corrente sangüínea são variáveis entre os animais. Os cavalos 1 e 3, que não tinham histórico prévio de treinamento tiveram um PL lento. Quando comparamos estes dados com os dos outros cavalos notamos que seus PL são mais rápidos. O cavalo 2 possuía um histórico prévio de prática desportiva em outra modalidade (laço de bezerro em dupla) e pertence a outro grupo racial (Quarto de Milha). Os cavalos 4 e 5 são da raça Anglo-árabe. O cavalo 4 não possuía histórico prévio de treinamento, mas foi o cavalo mais velho a ser examinado (12 anos). O cavalo 5 já havia praticado salto de obstáculos, mas estava há um longo tempo sem se exercitar, e apresentava-se magro. Além da raça, os dois possuíam em comum o fato de serem animais mais velhos, estando o cavalo 5 com aproximadamente 10 anos de idade. Desta forma, é importante individualizar também o tempo de descanso antes de iniciar a série de exercícios sub-máximos e crescentes.

Esses dados mostram que características individuais intrínsecas como, raça, idade, sexo, peso, e extrínsecas como: estado nutricional, histórico desportivo e variáveis relativas ao conjunto (cavalo/cavaleiro), devem ser consideradas na interpretação dos resultados (Proschoft, 1995).

A fim de verificar se o pico de lactatemia sangüínea poderia ser utilizado como parâmetro adaptativo de condicionamento físico, realizamos

este mesmo teste nos cavalos 1 e 3, após um ano de treinamento com protocolos do tipo contínuo, em velocidades sub-limiâres. Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Picos de Lactatemia e tempos de pico dos cavalos 1 e 3 após galope de 500 metros em velocidade máxima, após um ano de treinamento.

Cavalo	[lactato] no pico (mmol/L)	Tempo p/ formação do pico (min.)
1	12,3	2
3	12,4	1

Os resultados mostram que o intervalo de tempo para a formação do pico de lactato diminuiu muito, sendo quase que imediato, apresentando também valores mais altos de lactatemia quando comparado aos mesmos valores obtidos um ano antes. O aumento na velocidade de acúmulo do lactato sanguíneo, após um período de treinamento de resistência pode ser uma adaptação desejável induzida por este treinamento. Estes dados estão em concordância com dados da literatura para diferentes espécies animais e também em humanos (Donovan e Pagliassotti, 1990; Mc Dermontt e Bonen, 1993). Segundo a literatura, esta adaptação seria devido ou a um aumento da atividade dos transportadores de monocarboxilatos (TMC), que co-transportam lactato e prótons ou mesmo a um aumento do número destes transportadores presentes no sarcolema (Marieangela et al., 1998).

A determinação do exato momento onde ocorre a formação do pico de lactato, deve ser observada, para evitar que o mesmo ocorra durante o experimento de determinação de limiar, interferindo no teste.

EXPERIMENTO II

Determinação da velocidade em lactatemia mínima (LMS)

Após a determinação do pico de lactatemia (experimento I) realizamos a determinação da LMS conforme descrito em Materiais e Métodos.

Os resultados de velocidade, frequência cardíaca e lactato na LMS dos cinco cavalos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de velocidade de limiar e correspondentes frequências cardíacas e concentrações de lactato no limiar dos cinco cavalos.

Cavalo Número	Velocidade (Km/h)	Frequência Cardíaca (bpm)	[Lactato] (mmol/L)
1	20	120	1.7
2	25.5	129	1.5
3	23	125	1.5
4	21	129	1.4
5	18	120	1.6

Podemos observar que o cavalo 2, que possuía um histórico prévio de prática desportiva em outra modalidade, e pertence a outro grupo racial, apresentou uma LMS mais alta. A LMS do animal 5 foi a mais baixa encontrada, provavelmente devido ao fato de possuir um longo período de sedentarismo em seu histórico desportivo e apresentar-se magro. Os demais resultados são aproximados, configurando um grupo razoavelmente homogêneo de cavalos não treinados.

Uma nova determinação de LMS foi realizada nos cavalos 1 e 3 um ano após o início do treinamento para verificar o efeito deste sobre a potência aeróbia, com o conseqüente aumento na LMS. O treinamento adotado neste ano foi predominantemente aeróbio, constituído de longas sessões em velocidades sub-limiares, e competições oficiais esporádicas em velocidades livres cujo esforço variava de sub a supra-limiares. Os valores da velocidade de limiar (LMS), concentração de lactato mínimo e

freqüência cardíaca atingidas nas velocidades de limiar para os cavalos 1 e 3 estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de velocidade de limiar e correspondentes freqüências cardíacas e concentrações de lactato, no limiar dos cavalos 1 e 3, após um ano de treinamento.

Cavalo Número	Velocidade (km/h)	Freqüência Cardíaca (bpm)	Lactato (mmol/L)
1	23,9	140	4,5
3	30	130	1,5

Podemos observar que o treinamento empregado foi eficiente em aumentar a potência aeróbia dos cavalos, com um efeito mais significativo no cavalo 3, pois o cavalo 1 aumentou sua velocidade de limiar de 22 para 23,9 km/h e o cavalo 3 de 23 para 30 km/h.

Dosamos, concomitantemente, a glicemia ao longo da determinação da LMS. Este monitoramento foi realizado visando determinar se a glicemia poderia ser utilizada como parâmetro para determinação de limiar, conforme revisão da literatura para humanos (Simões et al., 1997), que mostrou ser possível predizer em atletas humanos, a velocidade de MSSLAC, através da dosagem de glicose, utilizando o protocolo IAT - Individual Aerobic Threshold (Stegmann, 1981), onde a menor concentração de glicose coincidiu com o limiar de lactato. Assim, os gráficos de determinação da LMS para os cinco cavalos (Figuras 4-8) mostram, em vermelho as concentrações de lactato e em azul, as concentrações de glicose dosadas neste experimento. As linhas pontilhadas correspondem aos valores de lactato e glicose em repouso, e os números entre parênteses correspondem aos valores de freqüência cardíaca.

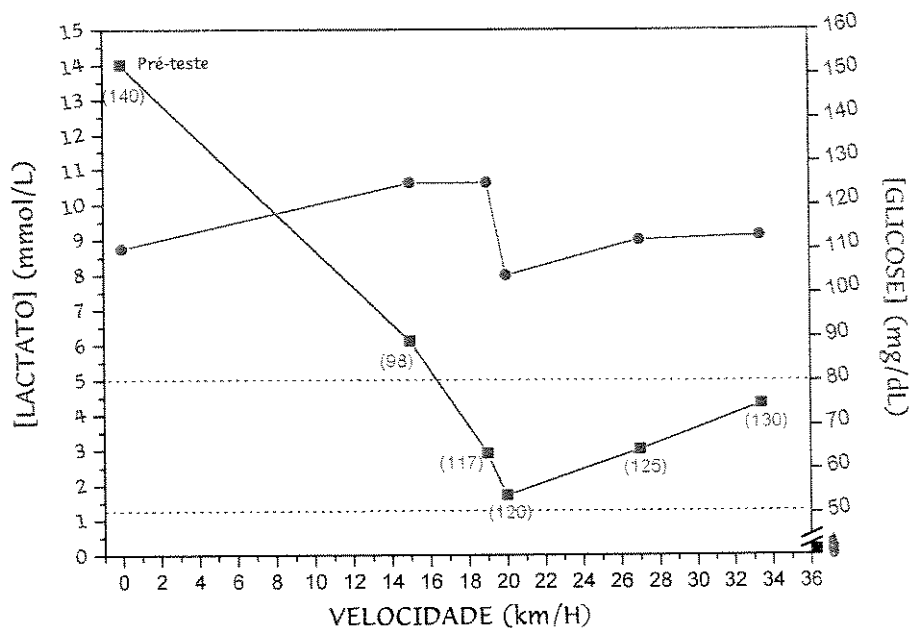


Figura 4: Gráfico das concentrações de lactato e glicose na determinação de limiar do cavalo 1, antes do treinamento.

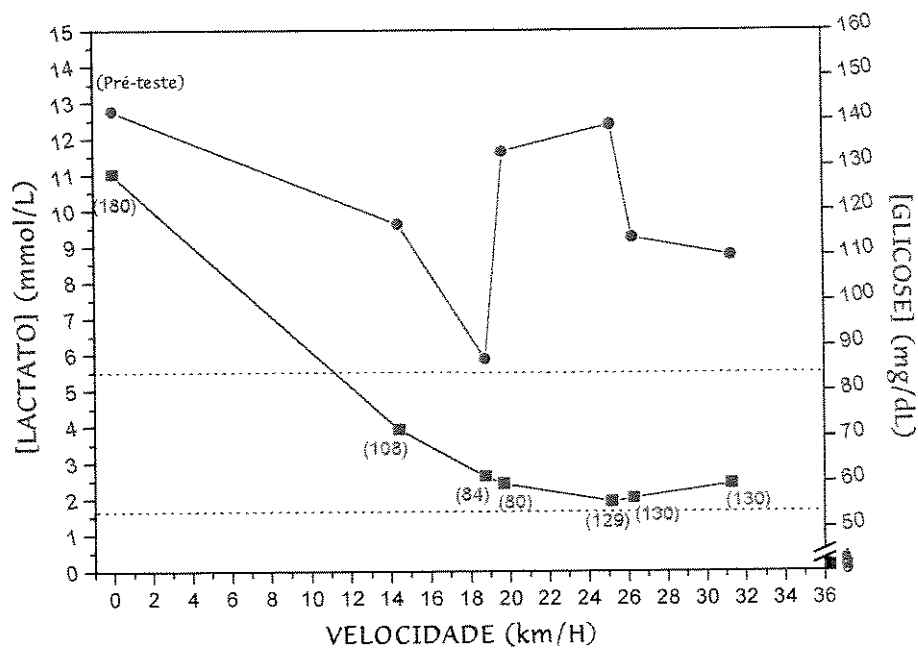


Figura 5: Gráfico das concentrações de lactato e glicose na determinação de limiar do cavalo 2.

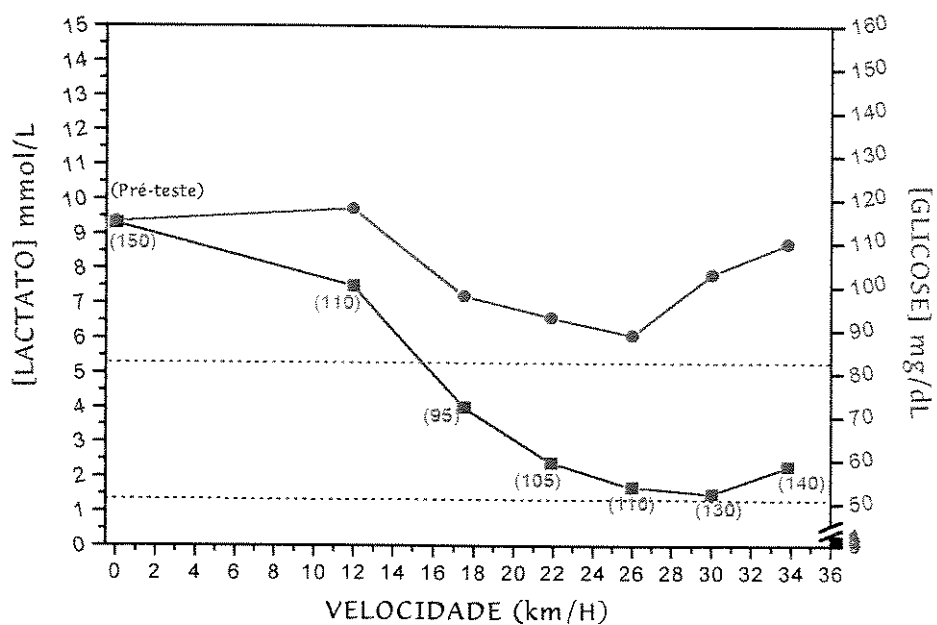


Figura 6: Gráfico das concentrações de lactato e glicose na determinação de limiar do cavalo 3. após o treinamento.

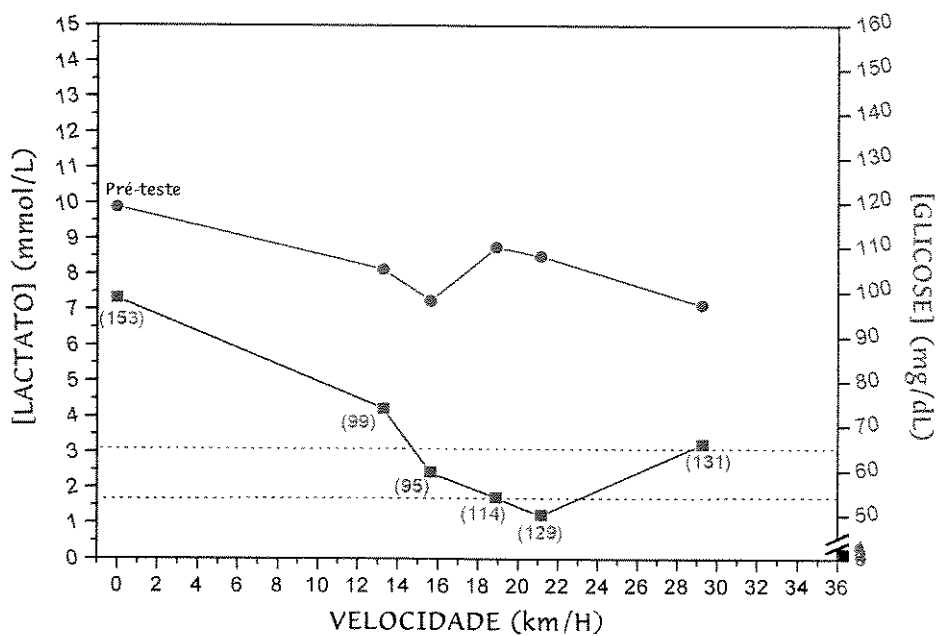


Figura 7: Gráfico das concentrações de lactato e glicose na determinação de limiar do cavalo 4.

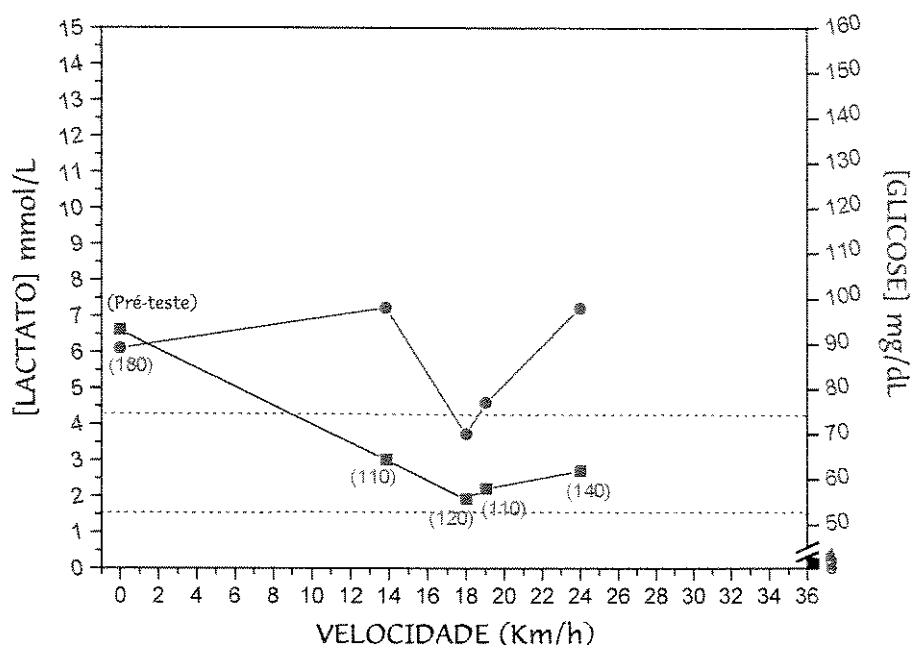


Figura 8: Gráfico das concentrações de lactato e glicose na determinação de limiar do cavalo 5.

Constatamos que as concentrações mínimas de glicose, precedem ou coincidem com as concentrações mínimas de lactato, alcançando valores próximos às concentrações de repouso nos cavalos 2, 3 e 5. Nos cavalos 1, 3 e 5 também pode ser observada uma tendência de aumento da glicemia logo após a realização do pré-teste, durante o período de descanso, sugerindo que parte do lactato acumulado nesta etapa do experimento pode ter sido utilizado pela via gliconeogênica para a síntese de glicose. Podemos ainda observar que a concentração de glicose, em todos animais analisados, apresenta uma tendência de também atingir um valor de concentração mínima similar à curva do lactato, com o incremento do exercício. Esta diminuição sugere que o lactato sangüíneo, nesta segunda fase do experimento, está sendo oxidado pelas células musculares, e não mais sendo utilizado como substrato da via gliconeogênica. Após a glicemia abaixar, atingindo níveis mais baixos que os verificados no pré-

teste, sua tendência é aumentar novamente acompanhando a curva do lactato. Este aumento na glicemia pode ser devido ou ao acúmulo de lactato provocado pela ultrapassagem do limiar metabólico aero/anaeróbio, que seria metabolizado via gliconeogênese (Ciclo de Cori), provocando um aumento concomitante da glicemia (Holden et al., 1995) ou aos efeitos do glucagon e da adrenalina, estimulando a quebra do glicogênio hepático, com disponibilização de glicose para a corrente sangüínea. Simões (1997) relata que as concentrações sangüíneas de lactato, catecolaminas e cortisol, em exercício progressivo, aumentam linear e exponencialmente após a ultrapassagem do limiar anaeróbio.

As taxas sangüíneas de lactato em eqüinos podem variar de 1,2 mmol/L (repouso), até 30,0 mmol/L (Hodgson e Rose, 1994). Esta variação é em função do esforço requerido e da capacidade orgânica de transporte do lactato. Quanto à glicemia, sua variação é regulada hormonalmente entre um patamar inferior e um superior, que em eqüinos varia de 70 à 130 mg/dL (Hodgson e Rose 1994). Portanto uma correlação entre lactatemia e glicemia em condições de exercício (Simões, 1997) possuiu limitada aplicabilidade.

Constatamos também pelas Figuras 4-8 que a determinação de limiar de lactato através desta metodologia, resultou na obtenção de valores de lactatemia em exercício similares às de repouso. Isto é, a intersecção das curvas de acúmulo e remoção de lactato ocorre próximo à linha de lactatemia de repouso (Figura 3). Assim, a intensidade de esforço, suficiente para elevar a lactatemia acima de seus valores de repouso, é a velocidade imediatamente superior à velocidade de lactato mínimo (LMS). A ultrapassagem desta linha de base é proporcionada pelo início da predominância da via glicolítica anaeróbia. Acreditamos que os resultados obtidos em humanos com o protocolo LMS original (Tegtbur, 1993), onde não ocorre uma lactatemia similar à de repouso nas determinações de limiar pode ser devido ao tipo de protocolo utilizado, ou seja, as distâncias e velocidades empregadas, e aos tempos de pausa entre as etapas do

experimento. O limiar será mais preciso, quanto mais próximo for o valor de lactato no limiar do valor de lactato em repouso. Observamos que a dificuldade em controlar rigidamente a velocidade é a responsável por eventuais imprecisões. Portanto, seria de grande valia o emprego desta metodologia sob condições de rígido controle da velocidade, proporcionado pela utilização de esteira rolante específica para cavalos.

A pluralidade de metodologias resulta da freqüente correlação entre mecanismos fisiológicos e bioquímicos, como por exemplo a freqüência cardíaca, utilizada no teste de Conconi (Conconi et al., 1982), e o limiar respiratório (VO_2 máxima), utilizado no protocolo Hecke (Hecke et al., 1985). Os dois parâmetros mais usados na medicina desportiva eqüina (VLA 2,5 e VLA 4,0 mmol/L), foram fixados correlacionando lactatemia com VO_2 máxima em humanos. Portanto, questionamos a utilização em eqüinos, de metodologias desenvolvidas para humanos, sem um estudo prévio de sua adequabilidade. Inúmeros trabalhos discorrem sobre a grande variabilidade de resultados obtidos com metodologias de determinação de limiar que utilizam concentrações fixas de lactato como parâmetro. Este fato levou Brooks (1985) a questionar a real existência de um limiar de lactato. Ressaltamos também a necessidade de se unificar, simplificar e individualizar as metodologias existentes. Metodologias que fixam previamente parâmetros não possuem adequada sensibilidade para detectar as variabilidades individuais intrínsecas determinadas pelo genótipo e fenótipo, e extrínsecas, determinadas pelo histórico atlético e interações cavalo/cavaleiro.

Indubitavelmente, o metabolismo energético dispõe de apenas duas vias para oxidar a glicose: a aeróbia e a anaeróbia. Em nossa opinião, o único limiar metabólico existente é o ponto onde o metabolismo anaeróbio passa a contribuir em maior porcentagem para produção de ATP, devido à uma ineficiência no transporte ou à saturação da capacidade de consumo de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons, resultando em um acúmulo de lactato superior ao de repouso. O monitoramento da

freqüência cardíaca possibilitou um razoável acompanhamento da intensidade de esforço correspondente à LMS, o que possibilita sua utilização rotineira como parâmetro de intensidade de esforço.

EXPERIMENTO III

Confirmação de limiar - Fase estável de lactato.

Neste terceiro experimento verificamos se a LMS determinada no experimento II estava correta. Os resultados individualizados para os cavalos 1, 2, 3, 4 e 5 estão mostrados nas Figuras 9-13. Nestas Figuras, as linhas pontilhadas em vermelho correspondem aos valores de lactato na LMS. Os números entre parênteses correspondem à freqüência cardíaca, e os números entre colchetes correspondem às velocidades empregadas em cada volta de 2.000 m. da corrida de 10.000 m.

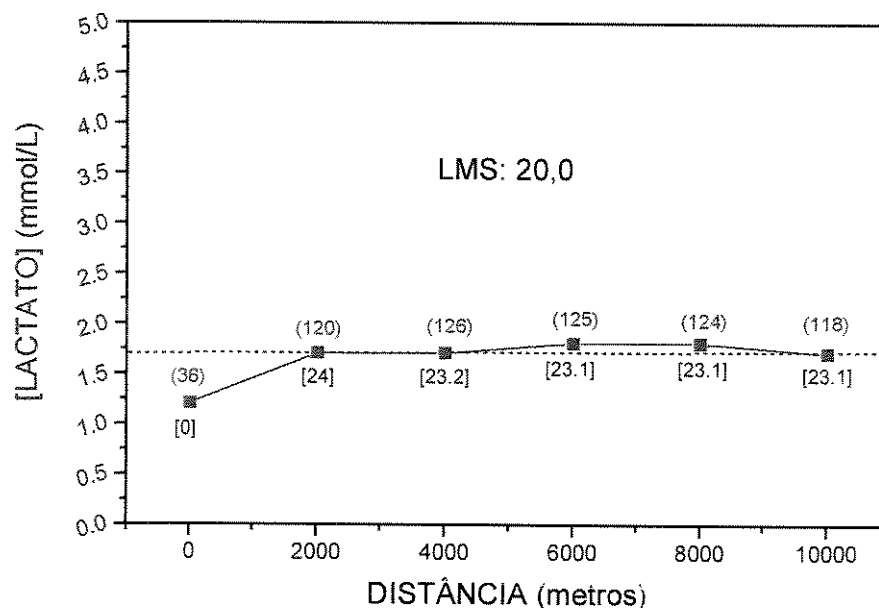


Figura 9: Gráfico das concentrações de lactato na confirmação de limiar do cavalo 1. Freq. cardíaca (). Velocidade [].

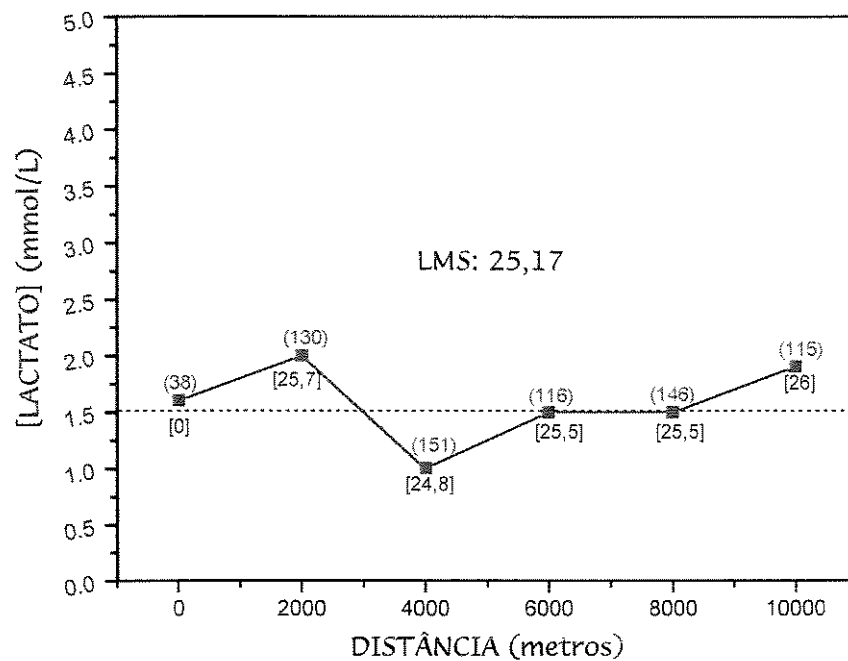


Figura 10: Gráfico das concentrações de lactato na confirmação de limiar do cavalo 2. Freq. cardíaca (). Velocidade [].

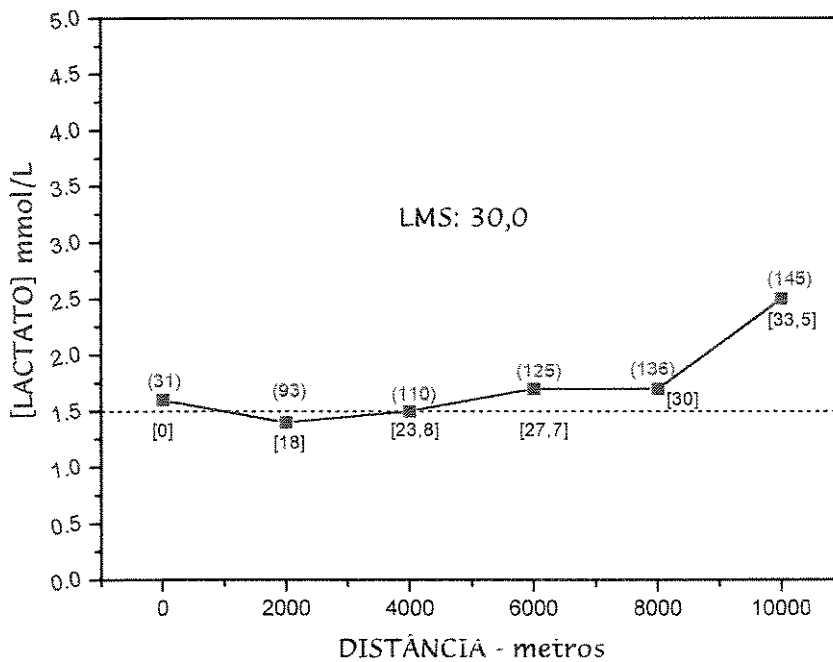


Figura 11: Gráfico das concentrações de lactato na confirmação de limiar do cavalo 3. Freq. cardíaca (). Velocidade [].

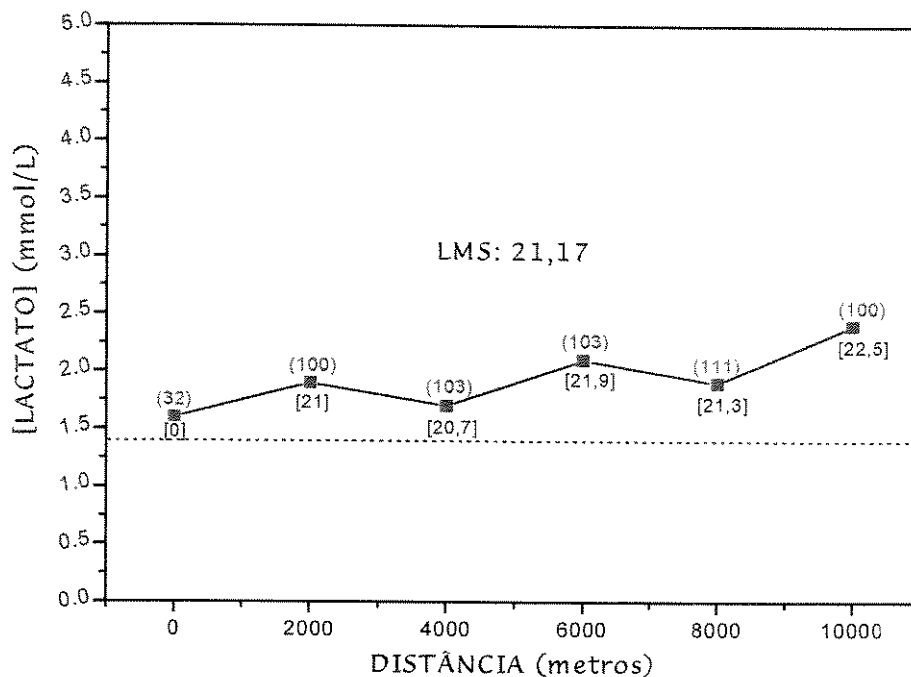


Figura 12: Gráfico das concentrações de lactato na confirmação de limiar do cavalo 4. Freq. cardíaca (). Velocidade [].

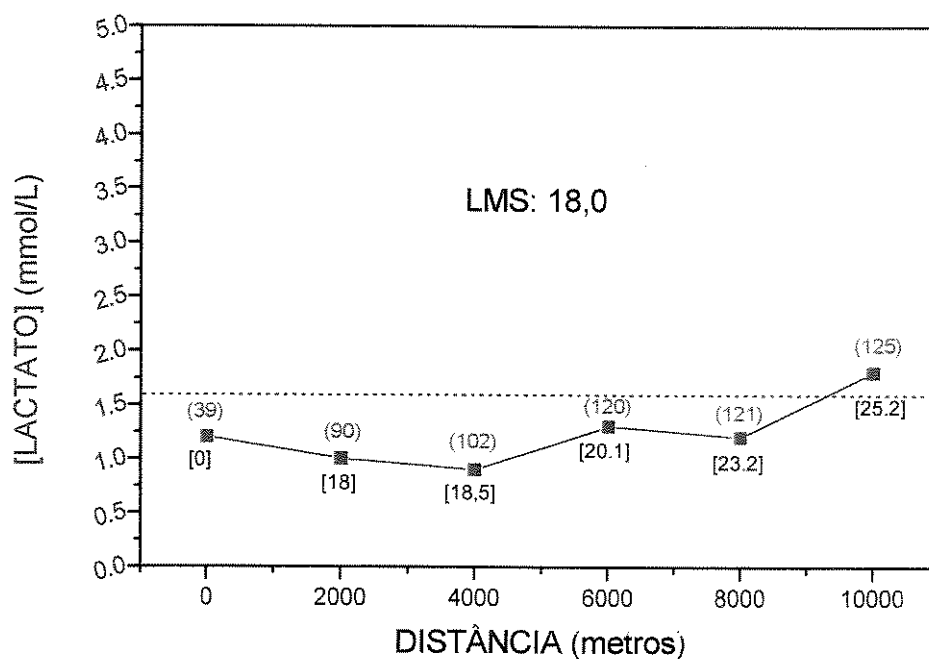


Figura 13: Gráfico das concentrações de lactato na confirmação de limiar do cavalo 5. Freq. cardíaca (). Velocidade [].

O objetivo deste experimento, no protocolo original foi ratificar a determinação da LMS, aferindo se durante uma corrida em velocidade de limiar constante a lactatemia permaneceria inalterada, baseando-se no conceito de fase estável de lactato (Tegtborg et al.,1993). Nos cavalos 1, 2, 3, e 4 ocorreu a ratificação da velocidade de LMS aferida no experimento I. As variações de velocidade ocorridas deveu-se à dificuldade de manutenção de velocidade constante nas condições de campo, nas quais os experimentos foram realizados.

No cavalo 5 ocorreu uma inevitável mudança do cavaleiro. A diferença de peso entre o cavaleiro usado na determinação de limiar (Figura 8), e o usado na sua confirmação (Figura 13), foi de 38 kg à menos. Esta troca resultou em uma LMS diferente na confirmação de limiar, de aproximadamente 5 km/h à mais. Isto é, com o cavaleiro mais pesado a LMS aferida foi de 18 Km/h. Ao utilizar-mos o cavaleiro mais leve, por uma razão compreensível e lógica, o animal deslocou-se a uma velocidade de aproximadamente 23 Km/h, sem acumular lactato. Portanto, a determinação da LMS em condições de campo, como parâmetro de condicionamento físico em cavalos de sela, deve ser realizada com o cavalo montado pelo seu próprio cavaleiro, pois diferenças de peso e nível de equitação podem proporcionar diferentes resultados (Proschoft, 1995). Uma outra alternativa, para evitar diferenças consideráveis, é utilizar sempre a mesma metodologia e condições experimentais, como por exemplo, uma esteira rolante para cavalos onde um controle das variáveis experimentais é mais rigoroso. O problema é que também é mais artificial.

A exemplo dos experimentos I e II, repetimos, após o período de treinamento dos cavalos 1 e 3 a confirmação de limiar (Figuras 14 e 15). Nestes dois experimentos optamos por realiza-los de forma diferenciada, utilizando uma corrida partindo de uma velocidade sub-limiar, com aumentos progressivos de velocidade até ultrapassar-mos a velocidade de limiar determinada no experimento II. Este procedimento é idêntico aos

protocolos contínuos de determinação de limiar tradicionalmente utilizados (Conconi et al., 1982). Partimos de uma velocidade inferior à pré-determinada pelo protocolo LMS, aumentado-a progressivamente em aproximadamente 3 km/h a cada volta do percurso de 2.000 m.

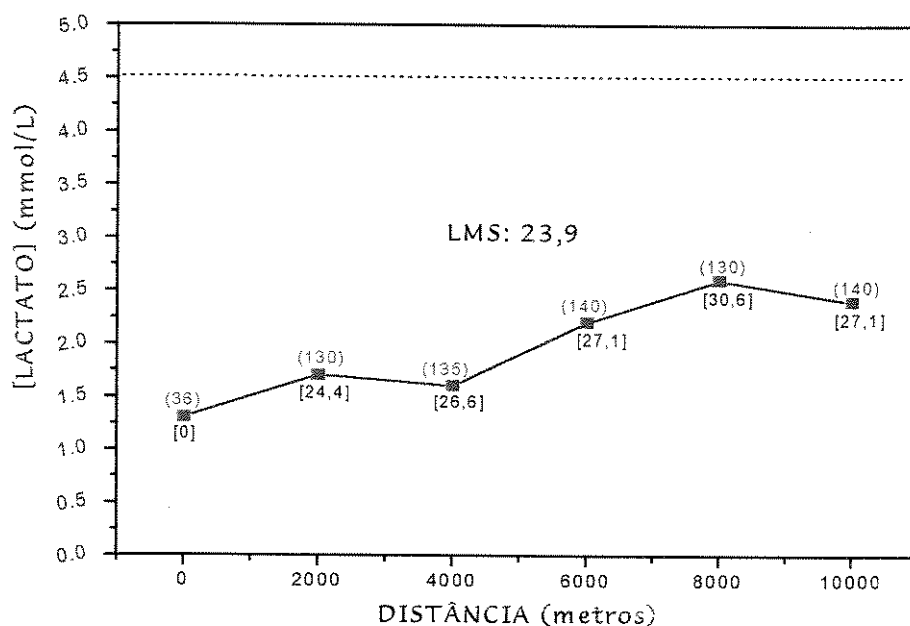


Figura 14: Gráfico das concentrações de lactato na confirmação de limiar do cavalo 1, após o treinamento. Freq. cardíaca (). Velocidade ().

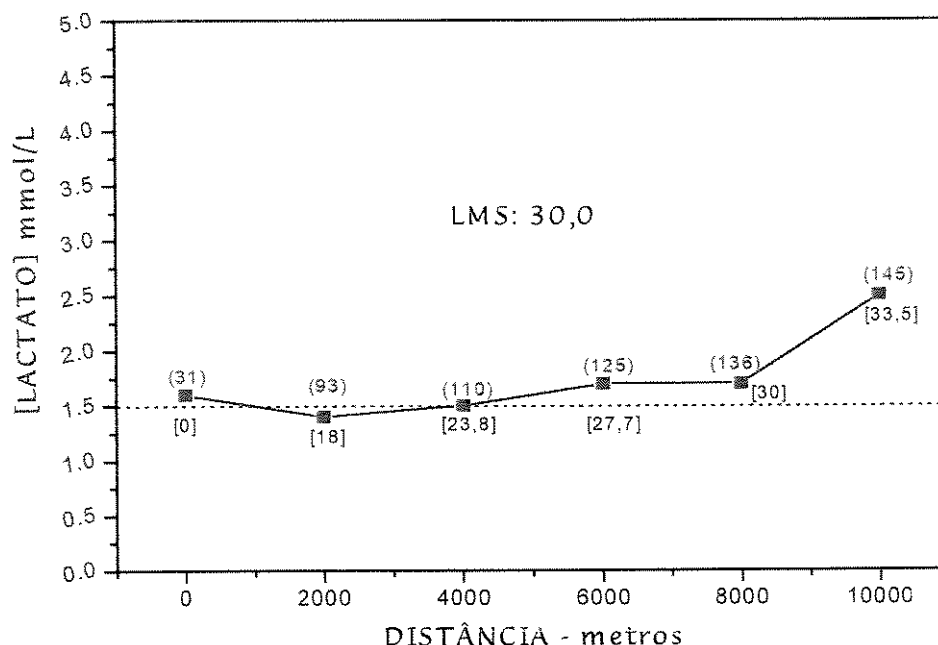


Figura 15: Gráfico das concentrações de lactato na confirmação de limiar do cavalo 3, após o treinamento. Freq. cardíaca (). Velocidade [].

Verificamos que esta adaptação no protocolo original do experimento de confirmação de limiar (experimento II), realmente prestou-se a uma ratificação da determinação de LMS (experimento II) do cavalo 1 (Figura 14). Ao realizarmos a corrida em etapas de 2.000 m em velocidades crescentes, submetemos o cavalo a um novo protocolo de determinação de limiar, conhecido como método progressivo, onde forçosamente ocorre a interseção da curva crescente de lactatemia, em função da velocidade, com a linha de base correspondente à lactatemia de repouso. Neste cavalo, no experimento II, após o treinamento, a velocidade em lactatemia mínima aferida foi de 23,9 km/h. Contudo, no experimento III podemos constatar que o cavalo correu à velocidade de 26,6 km/h com uma concentração sanguínea de lactato similar à de repouso. Evidentemente, ocorreu um erro na sua determinação de limiar. Este erro pode frequentemente ocorrer, devido à dificuldade de manutenção constante da velocidade pre-

estabelecida, e à ocorrência de grandes diferenças de velocidade entre os vários “tiros” (T_n) do protocolo LMS. Portanto, o incremento de velocidade entre estes “tiros” deve ser o menor possível, para evitar que a real velocidade de limiar esteja localizada no intervalo entre um “ tiro” e outro. Em condições de campo, nem sempre um pequeno incremento de velocidade é possível.

Parte II

Avaliação dos níveis de ataque oxidativo e de defesa antioxidante durante a competição de 210 km.

A literatura disponível em relação ao estresse oxidativo induzido pelo treinamento ou competições em equinos é escassa. Em nossa revisão encontramos apenas um trabalho onde a concentração plasmática de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi dosada em eqüinos (Chiaradia et al., 1998). Em outra publicação, Kooreman et al (1998) realizou dosagem de TBARS em homogenato de tecido intestinal, não possuindo portanto, qualquer relação com o exercício físico. Desta forma, monitoramos, ao longo dos três dias de uma competição de endurance de 210 Km o nível de estresse oxidativo a que nove cavalos foram submetidos, através do cruzamento dos dados fornecidos pela dosagens plasmáticas de marcadores de ataque oxidativo e atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante. Um destes cavalos (cavalo 3) foi especialmente treinado para este experimento, e conduzido de forma adequada para a manutenção constante de um exercício aeróbio. Os demais cavalos foram escolhidos de acordo com os seus históricos de desempenho, visando a constituição de dois grupos de cavalos, sendo um composto de cavalos “experientes”, e outro de cavalos “inexperientes”.

Os marcadores selecionados são rotineiramente utilizados em nosso laboratório para este mesmo tipo de comparação, em ratos e humanos, demonstrando adequada sensibilidade para o objetivo proposto (Zoppi, 1999 - tese de mestrado). Correlacionamos estes dados com o resultado final da competição, na intensão de qualificar e quantificar o nível de estresse a que os mesmos foram submetidos, ou mesmo encontrar indicadores bioquímicos que pudessem justificar o desempenho dos cavalos.

A Tabela 10 mostra a planilha de resultados parciais e finais da competição de 210 km dos 9 cavalos monitorados, incluindo velocidades médias por percurso e total, colocações parciais e finais, incluindo Best Condition. A classificação final evidencia que os cavalos 1 e 2, que possuíam maior idade, quilometragem percorrida, tempo de treinamento e melhores premiações, obtiveram melhores resultados. Este fato é coerente

com a estatística internacional (Eldric's yearbook 1989), que demonstra que a maioria dos ganhadores de provas de longa distância são cavalos mais velhos, possuindo entre 9 e 11 anos de idade. Estes cavalos também tiveram um maior período de repouso pré-competição, tal qual o cavalo 3, em comparação aos demais cavalos.

Tabela 8: Planilha de resultados parciais e finais da competição de 210 km dos 9 cavalos monitorados, incluindo velocidades médias por percurso e total, colocações parciais e finais, incluindo Best Condition.

CAVALO	1º DIA			2º DIA			3º DIA			FINAL		
	Etapa 1	Etapa 2		Etapa 3	Etapa 4		Etapa 5	Etapa 6	Etapa 7			
	34 km	31 km		30 km	35 km		30 km	27 km	23 km	Veloc.	Col.	Best
	Vel.	Vel.	col.	Vel.	Vel.	Col.	Vel.	Vel.	Vel.	média	Final	Condit.
1	13,1	13,5	1º	12,9	12,1	4º	14,6	14,2	12,2	13,2	1º	-
2	12,9	13,4	2º	12,4	12,0	5º	14,5	13,3	12,5	13,0	2º	-
3*	12,9	12,6	6º	11,4	11,8	7º	15,0	14,6	11,7	12,9	6º	2º
4	13,4	10,5	12º	12,6	12,5	3º	15,0	14,4	11,8	12,9	7º	1º
5	11,1	8,7	22º	9,3	9,9	15º	13,3	11,7	11,7	10,8	14º	-
6	12,2	11,4	10º	12,4	12,0	9º	-	-	-	-	-	-
7	11,3	11,5	16º	12,4	11,5	6º	-	-	-	-	-	-
8	13,3	12,5	8º	11,1	9,9	13º	-	-	-	-	-	-
9	10,5	7,0	23º	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* O Cavalo 3 foi utilizado nas duas partes do estudo, e também está identificado com o número 3 na parte I.

Barrey (1994), mostrou em experimentos de tipificação muscular, realizados através de biópsia, que a interconversão miofibrilar evolui paralelamente à idade. Isto é, cavalos mais velhos possuem maior porcentagem de fibras do tipo I, que cavalos mais novos. Esta característica morfo-funcional, maior quantidade de fibras tipo I, é desejável em atletas enduristas. Outra constatação balizada pelas

estatísticas internacionais é que raramente o ganhador da competição também recebe o prêmio especial de Best Condition .

Dois cavalos novos (3 e 4), apesar de estarem estreando em competições de longa distância, classificaram-se, respectivamente, em primeiro e segundo lugares no prêmio de Best Condition, e sexto e sétimo na classificação geral. Estes animais também possuíam histórico prévio de bom desempenho (Tabela 3) e, presumivelmente, adequada preparação, fato que não ocorreu com o cavalo 9, que sequer concluiu a prova. Em sua caracterização (Tabela 3), nota-se que trata-se de um cavalo muito jovem, que ainda não possuía adequada preparação, o que também pode ser observado no cavalo 6. Especificamente quanto ao cavalo 3, seu limiar de lactato e frequência cardíaca correspondente haviam sido previamente determinados na parte I deste capítulo (Figura 6), e a frequência cardíaca de limiar foi constantemente observada pelo seu cavaleiro.

As dosagens plasmáticas de TBARS e de proteínas carboniladas, representando, respectivamente, ataque oxidativo a lipídeos e proteínas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Dosagens plasmáticas de TBARS e Proteínas carboniladas nos 9 cavalos, monitorados ao longo dos três dias de competição.

CAVALO	TBARS (nmol/mL)				Proteína Carbonilada(umol/mL)			
	I Antes	II 1º dia	III 2º dia	IV 3º dia	I Antes	II 1º dia	III 2º dia	IV 3º dia
1	0	8,2	8,2	8,9	97	104	107	85
2	0,5	8,2	10	10,4	76	109	112	49
3	0	11,1	11,1	11,1	68	83	68	62
4	0,5	16,1	13,3	16,6	103	77	137	86
5	0,4	8,9	8,9	7,8	64	80	76	72
6	0	10,4	15,5	Desc.	89	82	47	Desc.
7	0	7,8	9,4	Desc.	65	97	50	Desc.
8	0	10,4	10,4	Desc.	69	100	80	Desc.
9	0	7,8	Desc.	-	68	107	Desc.	-

Desc.: Desclassificado.

Podemos observar nos níveis de TBARS um aumento inicial, seguido de uma estabilização de seus valores, especialmente nos cavalos que foram

bem sucedidos na competição (cavalos 1, 2, 3 e 4). As dosagens de concentração de proteínas carboniladas, também demonstraram, na maioria dos casos um aumento inicial, tal como os observados em TBARS, e uma tendência de queda no último dia (Tabela 9) para aqueles cavalos que terminaram a prova.

Concomitantemente, foram dosadas as atividades das enzimas catalase e glutathiona redutase, representando o sistema de defesa antioxidante ao longo dos três dias de prova. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Dosagens plasmáticas das atividades das enzimas Catalase e Glutathiona redutase dos 9 cavalos monitorados na competição de 210 km.

CAVALO	Catalase K/gHb				Glutathiona redutase UI/gHb			
	I Antes	II 1º dia	III 2º dia	IV 3º dia	I Antes	II 1º dia	III 2º dia	IV 3º dia
1	0,5	0,4	0,7	0,7	30,7	30,8	293,5	161,2
2	0,3	0,7	0,8	0,7	48,4	11,8	148,1	120,3
3	0,4	0,4	0,6	0,9	96,9	27	113,8	458,5
4	0,3	0,5	0,8	0,4	22,5	85,4	178,8	187,1
5	0,4	1,4	0,6	0,8	24	20,2	129,8	363
6	0,4	0,4	0,2	Desc.	62,6	26,1	119,9	Desc.
7	0,7	0,6	0,4	Desc.	51	28,4	173,1	Desc.
8	0,4	0,3	0,5	Desc.	159,1	91	71,1	Desc.
9	0,7	0,5	Desc.	-	90,6	19,8	Desc.	-

Desc.: Desclassificado.

Nossos resultados mostram claramente que os animais com melhor histórico de bons resultados anteriores e maior tempo de treinamento (Tabela 3) apresentaram melhores resultados nas dosagens por nós efetuadas. A amplitude do ataque oxidativo, mostrado na Tabela 9, parece ter sido limitado pela atividade das enzimas da defesa antioxidante, mostrada na Tabela 10. Os resultados demonstram que os animais que terminaram a prova (cavalos 1, 2, 3, 4 e 5), tiveram seus níveis de atividade das enzimas CAT e GR, aumentadas em relação aos níveis verificados antes do início da competição, indicando um menor nível de

estresse oxidativo, configurado pela razão ataque oxidativo/defesa antioxidante.

Segundo Ji et al. (1990), uma formação aumentada de radicais livres seria um estímulo para o aumento na atividade das enzimas antioxidantes. Dados de nosso laboratório demonstram que o exercício aeróbio contínuo é mais eficiente em provocar este aumento do que o exercício intermitente (Zoppi et alii, 1999). Já foi demonstrado que a maior formação de radicais livres ocorre quando a mitocôndria encontra-se em estágio respiratório 4 (baixa concentração de ADP), situação similar a uma reperfusão pós isquemia, ou no caso de atletas, pós hipóxia. Esta condição ocorre em situação de exercício anaeróbio, especialmente quando da utilização de protocolo de treinamento do tipo intermitente. Contudo, uma maior eficiência em provocar aumento nas defesas antioxidantes enzimáticas, ocorre em exercício aeróbio (Ji, 1993).

Atribuímos a este efeito, os dados referentes aos animais 3 e 5. O cavalo 5 concluiu a prova em uma baixa velocidade média (tabela 8), e o cavalo 3 teve sua frequência cardíaca monitorada, respeitando portanto, seu limiar aero/anaeróbio. Quanto aos animais 1 e 2, que respectivamente concluíram a prova em primeiro e segundo lugares, nota-se um declínio na atividade das enzimas antioxidantes ao final do terceiro dia, o que pode demonstrar um maior grau de estresse a que estes animais foram submetidos, para que pudessem conquistar estas posições. Nota-se também que nenhum destes animais obteve qualquer colocação na premiação de Best Condition (tabela 8).

Satu e Husain (1996), demonstraram um aumento na afinidade pelos substratos das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase/redutase e catalase através da diminuição do valor da K_m , bem como um aumento na V_{max} destas enzimas em vários tecidos, dentre eles o tecido muscular, evidenciando aumento na expressão destas enzimas após treinamento de endurance. Por sua vez, Travacio e Llesuy (1996), sugerem que o excesso de radicais formados em

situação de exercício seja responsável pela inativação das enzimas do sistema antioxidante, pois já foi demonstrado que a catalase e a superóxido dismutase são inibidas principalmente por oxigênio singlete (Escobar e Lissi, 1996). Nos cavalos 7, 8 e 9 observamos que existe uma relação inversa entre o ataque oxidativo e as atividades das enzimas da defesa antioxidante. Estes cavalos não concluíram a prova.

Gohill et al., (1988), Sen et al., (1992) e Tessier et al., (1995), demonstraram que durante o exercício de longa duração há uma queda na razão glutathiona reduzida (GSH)/glutathiona oxidada (GSSG), que não é restrita somente às fibras musculares, mas também se dá no fígado e no sangue, sendo que em aproximadamente 96 horas após o término do esforço a concentração de GSH é maior em relação à concentração pré existente, sugerindo uma ativação da enzima glutathiona redutase. Este resultado está em concordância com os dados da Tabela 10.

Nos cavalos 3 e 5, e no cavalo 4, até o segundo dia, pode ser observado um grande aumento das atividades plasmáticas das enzimas antioxidantes, que pode ser um efeito super-compensatório do sucessivo estímulo de exercício aeróbio, resultando em um aumento na expressão das enzimas monitoradas. Este efeito de supercompensação, descrito por Kuipers (1997) como “overreaching”, é uma resposta positiva ao estímulo do exercício, que neste caso, foi intercalado por períodos de repouso que podem ter favorecido a manifestação desta resposta. Para todos os cavalos as fases de repouso foram os intervalos entre o primeiro e segundo, e entre segundo e terceiro dias de competição, que foi de aproximadamente 15 horas. Isto demonstra que a resposta do sistema enzimático de defesa antioxidante em eqüinos é rápida. Esta adaptação bioquímica resultou em níveis de atividade enzimática comparativamente superiores aos níveis pré-existentes e parece ser um efeito acumulativo. Nos cavalos que apresentaram um perfil diferente da resposta enzimática, consideramos que ocorreu um maior ataque ou uma insuficiente defesa, configurando um estresse oxidativo. Poderíamos considerar que nestes casos ocorreu

uma resposta negativa ao estímulo da competição.

Nos cavalos 2 e 3, especificamente quanto a atividade da GR, em algumas etapas da competição a resposta enzimática ao estímulo da competição, foi negativo, evidenciando uma queda na atividade. Ao final do primeiro dia o cavalo 1 demorou cerca de 10 minutos para ser apresentado ao vet-check, com frequência cardíaca inferior à 64 bpm. Seu cavaleiro também relatou que o mesmo apresentava-se cansado. Este relato, bem como outras considerações subjetivas de outros cavaleiros, coincidem com os dados por nós encontrados. A amazona e o veterinário da competição, também relataram que o cavalo 1, vencedor da prova, apresentava-se cansado ao final do terceiro dia. Este relato também coincide com os dados do cavalo 1. Fato idêntico ocorreu com o cavalo 2 (égua), que demonstrou uma queda de atividade nas duas enzimas. Evidenciamos em nossos dados que a resposta do sistema antioxidante em algumas situações não foi idêntica. Nos cavalos 6, 7 e 8, no segundo dia, as atividades de CAT e GR apresentaram respostas diferentes. Provavelmente um estudo comparativo, usando-se estes mesmo marcadores em amostras de sangue e músculo, possam fornecer dados interessantes quanto a adaptação do sistema de defesa enzimático nestes diferentes tecidos.

Zoppi, (1999 - tese de mestrado), sugere que o aumento na atividade das enzimas CAT e GR, induzido pelo exercício esteja ligado ao tempo de duração das sessões de treinamento, "...isto é, o tempo de exposição da célula como um todo a uma concentração aumentada de radicais livres dentro da mesma, e não somente à quantidade total de radicais livres formados durante o exercício".

Nota-se na Tabela 10 uma tendência de queda após o primeiro dia de competição nos cavalos 7, 8 e 9, ou ainda uma ausência de resposta, como nos cavalos 1 e 5, quanto à GR. Esta ausência de resposta também foi observado por Margaritis et al. (1996) em atletas humanos altamente treinados, através de análises realizadas após uma prova de triatlon. Duthie et al. (1990), após uma maratona, também não verificou alterações

nas enzimas antioxidantes das hemáceas de atletas.

Do ponto de vista do condicionamento físico, estímulos longos e sucessivos de intensidade sub-limiar parece ser uma boa estratégia de treinamento, visando a um aumento na defesa antioxidante em eqüinos.

Segundo Pyne (1996), o estresse oxidativo é um dos fatores desencadeadores de lesões musculares, principalmente devido à peroxidação dos lipídios da membrana celular. Nesse sentido, Alessio et al. (1988) reportaram uma proporcionalidade entre a concentração de malonaldeído muscular e a intensidade do esforço executado. Avellini et al. (1995) demonstraram em cavalos de corrida, esta mesma relação entre exercício e produção de MDA, com concomitante depleção de glutathione reduzida. Neste experimento a atividade da enzima creatina quinase (CK), como índice de lesão muscular também foi dosada, e não apresentou alterações significativas.

Nossos resultados da concentração sangüínea da creatina quinase como índice de ataque oxidativo à fibra muscular, estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Dosagens plasmáticas de Creatina quinase dos 9 cavalos avaliados na competição de 210 km.

CAVALO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CK (UI/L)	252	661	90	530	125	877	840	377	286
COLETA (dia)	3 ^o	3 ^o	3 ^o	3 ^o	3 ^o	2 ^o	2 ^o	2 ^o	1 ^o

Eles demonstram que dentre os os cavalos que terminaram em boas condições a prova, os cavalos 3 e 5, evidenciavam níveis de CK normais (100 a 300 U/L, Rodgson e Rose 1994). Destacamos o animal 3 que apresentou níveis abaixo da faixa de normalidade clínica para indivíduos sedentários, bem como abaixo de seus valores individuais anteriormente verificados pré e pós competição em avaliações realizadas em três diferentes ocasiões, onde foi encontrada uma média de 223 UI/L, não

ocorrendo grandes variações pós competição. Este resultado demonstra que a redução dos níveis séricos normais de CK parece ser uma adaptação induzida pelo treinamento, ou especificamente provocado pelo sucessivo estímulo da competição de três dias. A implicação clínica desta diminuição da atividade plasmática da CK não é conhecida, e em nossa revisão não encontramos qualquer referência tendo cavalos como objeto de estudo. Resultados semelhantes em outras espécies foram relatados por Pyne em sua revisão de 1996. Em contrapartida, os animais que foram desclassificados por apresentarem claudicação (cavalos 6 e 7), apresentaram níveis de CK aumentados. No cavalo 6, os valores de TBARS estavam bastante altos, o que podemos caracterizar como um diagnóstico de miopatia de esforço, cuja etiologia pode ser o estresse oxidativo. O cavalo 7 também apresentou uma atividade da CK alta, e foi desclassificado por apresentar claudicação. Esta claudicação deveu-se à uma miosite, diagnosticada por apalpação, no dorso do animal.

Segundo Volfinger et al. (1994), o pico de CK no sangue de humanos ocorre entre 24 e 48 horas. Aitken et al. (1974) afirma que o pico de CK em eqüinos ocorre entre 5 e 6 horas após o exercício e sua vida média é de 24 horas. Todas as dosagens que realizamos, foram feitas com o sangue retirado dos animais aproximadamente 30 minutos após o término da competição. Os valores de CK poderiam ter sido mais altos se nos fosse possível coletar sangue de todos os cavalos no intervalo de tempo correto. Contudo, não podemos esquecer que estamos observando, na maioria dos animais, o efeito acumulativo do estresse provocado por esta competição.

Nossos dados demonstraram que os biomarcadores por nós utilizados neste estudo, foram biomarcadores úteis para determinar o nível de estresse oxidativo provocado pelo esforço empregado em uma competição de resistência no formato "Mult days event". O cavalo 9 é um bom exemplo. Em outros, cavalos 3 e 5, serviram como indicadores do efeito de supercompensação, ou "overreaching" (Kuipers 1997), induzido pelos três dias sucessivos de competição, que neste caso podemos

denominar de exercício intermitente de longa duração. Os dados da Tabela 10 mostram que os cavalos 6, 7, 8, e 9 possuíam altos valores de atividade enzimática, embora comparativamente menores em relação aos que terminaram a prova. Outro aspecto que consideramos importante é a necessidade de estabelecermos parâmetros de normalidade quanto a atividade destas enzimas em cavalos, e também conhecermos individualmente suas atividades para que possamos compará-las ao longo do tempo.

A falta de parâmetros que indiquem o nível de estresse a que o aparelho locomotor está submetido, e a máxima carga de estímulo suportável por este aparelho em um determinado período do treinamento, provoca em qualquer tipo de atleta, um grande número de variados tipos de lesões, provocadas pela ausência de um precoce diagnóstico laboratorial de lesões menores, que podem levar à inatividade temporária ou definitiva. O conhecido argumento que relaciona esporte e saúde, é uma verdade relativa, pois a intensa prática desportiva é fator predisponente de inúmeras lesões, especialmente osteo-articulares. Entendemos que o monitoramento do estresse oxidativo em eqüinos de competição é extremamente importante no diagnóstico precoce das causas de um mau desempenho.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no experimento I da primeira parte desta dissertação mostram que o PL é uma característica individual importante, que pode servir como parâmetro de condicionamento físico e deve ser previamente determinado para uma maior confiabilidade dos dados obtidos pelo protocolo LMS modificado para eqüinos.

A coerência teórica da metodologia empregada no protocolo LMS modificado para cavalos, que por nós é denominado de protocolo de determinação do limiar metabólico individual aero/anaeróbio de lactato, proporciona a fisiologistas, veterinários e treinadores, uma metodologia confiável e aplicável em condições de campo que possibilita a aferição científica do potencial atlético aeróbio de um indivíduo. A determinação periódica da LMS pode ser utilizada tanto para a determinação da capacidade aeróbia quanto para a modulação da intensidade de esforço no treinamento físico aeróbio e anaeróbio, e também acompanhar a evolução de seu condicionamento ao longo do tempo. A velocidade determinada através deste protocolo corresponde ao ponto onde as concentrações de lactato coincidem ou aproximam-se bastante aos valores de repouso, constituindo-se em um parâmetro individual fisiologicamente fixado. Consideramos este achado um importante parâmetro fisiológico que viabiliza a indispensável individualização de procedimentos utilizados para estudos comparativos entre indivíduos pertencentes a diferentes raças e mesmo diferentes indivíduos de uma mesma raça.

Os marcadores escolhidos para monitorar o estresse oxidativo imposto ao organismo eqüino pela competição de enduro eqüestre referente a parte II desta dissertação, nos proporcionaram um bom diagnóstico do nível deste estresse.

O monitoramento periódico, em repouso, do sistema antioxidante de cavalos submetidos a treinamento pode ser um confiável marcador da adaptação deste sistema frente ao ataque oxidativo imposto pela prática desportiva, e pode fornecer informações quanto a capacidade de suportar o estresse de competição. A dosagem pré-competição destes marcadores,

pode fornecer ao cavaleiro, importantes informações quanto a capacidade orgânica que o cavalo possui ou adquiriu ao longo do treinamento para suportar o estresse de competição. Contudo este estresse, que é proporcional à intensidade de esforço a que o cavalo é submetido, deverá sempre que possível, nos casos de esforço de endurance, respeitar o limiar metabólico aero-anaeróbio.

A utilização do monitoramento do estresse oxidativo, através dos biomarcadores de ataque oxidativo e principalmente da defesa antioxidante nos proporciona a visualização de um **limiar de estresse**, que pode auxiliar no diagnóstico e prognóstico de desempenho. Isto nos permite propor uma nova metodologia que pode ser utilizada no ajuste da intensidade do treinamento, aplicável a qualquer disciplina eqüestre, sem o risco de danos tissulares consideráveis. Esta metodologia também poderá ser útil no acompanhamento do repouso pós competição, evitando um reinício prematuro do treinamento, e uma conseqüente sobrecarga indesejável de trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
- Ahlborg G., Wahren J. e Felig P. (1986). Splanchnic and peripheral glucose and lactate metabolism during and after prolonged arm exercise. *Journal of Clinical Investigation*. 77: 690-699.
- Aitken, M.M.; Anderson, M.G.; Mackenzie, G.; Sanford J. (1974). Correlations between physiological and biochemical parameters used to assess fitness in the horse. *Journal of South African Veterinary Association*. 45(4): 361-79.
- Alessio, H.M., Goldfarb, A.H. e Cutler, R.G. (1988). MDA content increases in fast and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *American Journal of Physiology*. 255: C874-C877.
- Alessio, H. M.; Goldfarb, A. H. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *Journal of Applied Physiology*. 64: 1333-1336.
- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induce oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 25: 218-224.
- Allen D.G., Lännergren J. And Westerblad H. (1995). Muscle cell function during prolonged activity: Cellular mechanisms of fatigue. *Experimental Physiology*. 80: 497-527.
- Andersen, H.R.; Nielsen, J.B.; Nielsen F. and Grandjean, P. (1997). Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 43: 562-568.
- Avellini, L., Silvestrelli M. And Gaiti A. (1995). Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. *Veterinary Research Communications*. 19: 179-184.
- Astrand P.O. e Rodahl K., (1986). Textbook of work physiology. New York: McGraw Hill.
- Balon, T.W. and Nadler, J.L. (1994). Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *Journal of Applied Physiology*. 77:2519-2521.
- Barrey. E. (1994). Propriétés contractiles des fibres musculaires et

- performance physique chez le cheval. *INRA Production Animale*. 7(1): 41-53.
- Beutler, E. (1975). Red Cell Metabolism In: *A manual of biochemical methods*, 2a ed., Grune & Stratton publishers, London.
- Boobis L.H., Willins C., Wooton S.A. (1982). Human Muscle metabolism during brief maximal exercise. *Journal of Physiology of London*. 338: 21-22. (Abstract).
- Booth, F.W. and Thomason, D.B. (1991), Molecular and cellular adaptation of muscle exercise: perspectives of various models. *Physiology Review*. 71: 541-585.
- Brooks G.A., Farey T.D. (1984). *Exercise physiology: Human Bioenergetics and Its Applications*. N.Y., Macmillan, pp. 189-215, 701-712.
- Brooks G.A., Stanley W.C., Gertz E.W., Wisneski J.A., Morris D.L., Neese R.A. (1985). Systemic lactate kinetics during graded exercise in man. *American Journal of Physiology*. 249 (end. Metab. 12): E595-E602.
- Brooks G.A., Stanley W.C., Gertz E.W., Wisneski J.A., Neese R.A., Morris D.L., (1986). Lactate extraction during net lactate release in legs of humans during exercise. *Journal of Applied Physiology*. (60)4: 1116-1120.
- Brooks, G. A. (1995). Acido Láctico no sangue: O Vilão dos Esportes Torna-se Bom. *Sports Science Exchange* (2). Gatorate Sports Science Institute.
- Chiaradia E., Avellini L., Rueca F., Spaterna A., Porciello F., Antonioni M.T., Gaiti A. (1998). Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative Biochemistry Physiology*. Part B 119: 833-836
- Conconi F., Ferrari M., Ziglio, P.G., Droghetti P. And Codeca L. (1982). Determination of the anaerobic threshold by a noninvasive field test in runners. *Journal of Applied Physiology*. 52/4: 869-873.
- Connett R.J., Gaueski T.E.J., Honig G.R. (1984). Lactate accumulation in fully aerobic, working dog gracilis muscle. *American Journal of Physiology*. 246: H120-128.

- Coggan, A.R. e Coyle, E.F. (1991). Carbohydrate ingestion during prolonged exercise. Effects on metabolism and performance. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 19: 1-40.
- Coyle E.F., Hagberg J.M., Hurley B.F., Martin III, Ehsani A.A., Holloszy J.O. (1983). Carbohydrate feeding during prolonged strenuous exercise can delay fatigue. *Journal of Applied Physiology*. 55: 230-235.
- Coyle, E. F. (1995). Integration of the physiological factors determining endurance performance ability. *Exercise and Sports Sciences Reviews* 23: 25-63.
- Cotta T., Ferreira M.I.C. (1995). Lactatemia, frequência cardíaca e hematócrito de cavalos durante as provas de concurso completo de equitação. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*. 47(3), 315-327.
- Davies, K.J.A, Packer, L. and Brooks, G.A. (1981). Biochemical Adaptation of Mitochondria, Muscle, and Whole-Animal Respiration to Endurance Training. *Archive of Biochemistry and Biophysic.* 209: (02) 539-554.
- Davies K.J.A., Quintanilha A.T., Brooks G.A. and Packer L. (1982). Free radicals and Tissue Damage produced by exercise. *Biochemistry and Biophysic Research Communication*. 107: 1198-1205.
- Dekkers J.C., Van Doornen L.J.P. and Kemper H.C.G. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports medicine*. 21: 213-238.
- Denadai B.S. (1995). Limiar anaeróbico: Considerações Fisiológicas e Metodológicas. *Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde*. 1(2), 74-88.
- Dohm, G.L., Huston, R.L., Askew, E. W. and Fleshood, H. L. (1973). Effects of exercises, training and diet on muscle citric acid cycle enzyme activity. *Canadian Journal of Biochemistry*. 51: 849-855.
- Donovan, C.M. and Pagliassotti M.J. (1990). Enhanced efficiency of lactate removal after endurance training. *Journal of Applied Physiology*. 68(3). 1053- 1058.

- Duthie G.G., Robertson J.D., Maughan R.J. and Morrice P.C. (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Archive of Biochemistry and Biophysic.* 282: 78-83.
- Edwards R.H.T. (1981). Human muscle function and fatigue. In *Human Muscle Fatigue: Physiological Mechanisms*. Ciba Foundation Symposium 82, pp. 1-18, London.
- Eldric's yearbook (1989). Statistics of European Championship.
- Essig D.A and Nosek T.M. (1997). Muscle Fadigue and Induction of Stress Proteon Genes: A dual Function of Reactive Oxygen Species. *Canadian Journal of Applied Physiology.* 22(5): 409-428.
- Evans D.L., Rainger J.E., Hodgson D.R., Eaton M.D. and Rose R.J.(1996). The effects of intensity and duration of training on blood lactate concentrations during and after exercise. *Equine Veterinary Journal* 28(5): 398-402.
- Evans D.L., Golland L.C. (1996). Accuracy of accusport for measurment of lactate concentrations in equine blood plasma. *Equine Veterinary Journal* 28(5): 398-402
- Farber, J.L., Kyle, M. and Coleman, JB. (1990). Biology of disease - Mecanisms of cell injury by activated oxygen species. *Laboratory Investigation.* 62:670-679.
- Farrel, P.A. et al. (1979). Plasma lactate accumulation and distance running performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 11: 338-44.
- Fell J.W., Rayfield J.M., Gulbin, J.P. Gaffney P.T. (1998). Evaluation of the Accusport Lactate Analyser. *International Journal of Sports Medicine* 19, 199-204.
- Ferrante, P.L. (1995). Lactate measurement and interpretation: Blood vs. Plasma. *Equine Veterinary Journal*, Suppl. 18, 478-479.
- Fink W.J., Costill D.L., Pollock M.L. (1977). Submaximal and maximal working capacity of elite distance runners. Part II. Muscle fiber composition and enzyme activities. *Annals of New York Academieof*

- Science*. 301: 323-327.
- Fitts, R.H. (1994). Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiology Review*. 74(1): 49-94.
- Gaesser G.A., Brooks G.A., (1980). Glycogen repletion following continuous and intermittent exercise to exhaustion. *Journal of Applied Physiology*. 49:722-728.
- Giardina, B., Ascenzi P., Clementi, M.E., De Sanctis G., Rizzi M., Coletta, M. (1996). Functional Modulation by Lactate of Myoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 16999-17001.
- Gillespie, A.C., Fox, E.L. and Merola, A.J. (1982). Enzyme adaptations in rat skeletal after two intensities of treadmill training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 14 (6): 461-466.
- Gleeson T. (1996). Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annals of Review Physiology*. 58, 565-581.
- Goldhaber, J. (1996). Free radicals enhance $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in ventricular myocytes. *American Journal of Physiology*. 271: H838-H833.
- Gondim F., Zoppi C.C., Pereira-da-Silva L., Macedo D.V. (1998). Determination of the aerobic/anaerobic threshold in equines using the lactate minimum speed (LMS) protocol. *CESMAS 98 Proceeding* : 238 - 241. (Abstract).
- Gohil K., Viguie C., Stanley W.C., Brooks G.A. and Packer L. (1988). Blood glutathione oxidantion during human exercise. *Journal of Applied Physiology*. 64:115- 119.
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymology*. 186:1-85.
- Heck, H., A. Mader, G. Hess, S. Mücke, R. Müller, and W. Hollmann. (1985). Justification of the 4 mmol/L lactate threshold. *International*

- Journal of Sports Medicine*. 6: 117-130.
- Hess, M.L. e Manson N.H. (1984). Molecular oxygen: Friend and foe. The role of oxygen free radical system in the calcium paradox and ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 16: 969-985.
- Hodgson, D.R. (1996). Blood lactate: Does Accusport equal accuracy? *Equine Veterinary Journal*. 28(5): 337-338.
- Hodgson D.R. and Rose R.J. *The Athletic Horse*, (1994). Saunders. Sidney
- Holden H.S. Macrae., Noakes T.D., Dennis S.C. (1995). Effects of endurance training on lactate removal by oxidation and gluconeogenesis during exercise. *European Journal of Physiology*. 430: 964-970.
- Holloszy, J.O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. *Journal of Biology and Chemistry*. 242: 2278-2282.
- Holloszy, J.O., Booth, F.W. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annals of Review Physiology*. 34: 273-29.
- Hultman E., & Sjöholm H. (1983). Energy metabolism and contraction force of human skeletal muscle in situ during electrical stimulation. *Journal of Physiology of London*. 345: 525-532.
- Imlay, J.A. and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302.
- Iuliano, L.; Violi, F.; Pedersen, J. Z.; Praticò, G. R.; Balsano, F. (1992). Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 299: 220-224.
- Iuliano, L.; Pedersen, J. Z.; Praticò, D.; Rotilio, G.; Violi, F. (1994). Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *European Journal of Biochemistry*. 221: 695-704.
- Ivy, J.L. et al. (1980). Muscle respiratory capacity and fiber type as determinants of the lactate threshold. *Journal of Applied Physiology*. 48:523-527.
- Jacobs I., Tesch P., Bar-Or O., Karlsson J., Dotan R. (1983). Lactate in

- human skeletal muscle after 10 and 30 s of supramaximal exercise. *Journal of Applied Physiology*. 55: 365-367.
- Ji, L.L., Dillon, D. and Wu, E. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *American Journal of Physiology* 258: R919-R923.
- Ji L.L. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 25 (2): 225-231.
- Jones N. L., MacCartney N., Graham T., Spriet L.L. Kowalchuk J.M., Heigenhauser G.J.F., Sutton J.R. (1985). Muscle performance and metabolism in maximal isokinetic cycling at slow and fast speeds. *Journal of Applied Physiology*. 59: 132-136.
- Juel C. (1996). Lactate/proton co-transport in skeletal muscle: regulation and importance for pH homeostasis. *Acta Physiologica Scandinavica*. 156, 369-374.
- Kindermann, W. et al. (1979). The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *European Journal of applied Physiology* 42: 25-34.
- Kooreman K., Babbs C., Fessler J. (1998). Effect of ischemia and reperfusion on oxidative process in the large colon and jejunum of horses. *American Journal of Veterinary Research*. 59(3), 340-346.
- Kuipers, H. (1997). Training and overtraining: an introduction. *Medicine & Science in sports & Exercise*. 30 (7), 1137-1139.
- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology*. 186: 464-478.
- Lindner A. (1996). Measurement of plasma lactate concentration with Accusport. *Equine Veterinary Journal* 28(5): 403-405
- Lopes-Pereira C.M. Harun M. Schidtova D. Timane I. Mabasso M. Otto F. And Bogin E. (1996). Use of the dry chemistry "Reflotron" blood analyzer under outdoor-field conditions in veterinary medicine. *European Journal of Clinical Chemistry And Clinical Biochemistry*. 34(3):

231-235.

- Mader, A. et al. (1976). Zur beurteilung der sportartspezifischen ausdauerleistungsfähigkeit. *Sportarzt Sportmed* 27: 80-88.
- Mahdavi, V., Izumo, S. and Nadal-Ginard, B. (1987). Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circulatory Research*. 60: 804-814.
- Margaria R., Cerreteli P., Mangili E., (1964). Balance and kinetics of anaerobic energy release during strenuous exercise in man. *Journal of Applied Physiology*. 19: 623-628.
- Margaria R., Oliva D., Di Prampero P.E., Cerreteli P. (1969). Energy utilization in intermittent exercise of supramaximal intensity. *Journal of Applied Physiology*. 26: 752-756.
- Margaritis I., Tessier F., Richard M.J. and Marconnet P. (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *International Journal of Sports Medicine*. 18(3): 186-190.
- Marieangela C. W., Vicky N.J., Catherine Heddle, Price N.T., Pilegaard H., Carsten J., Arend Bonen, Ian Montgomery, Hutter O.F., and Halestrap A.P. (1998). Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the Monocarboxylate Transporter Isoform MCT3. *The Journal of Biological Chemistry* 273(26): 15920-15926.
- Marlin D.J., Scott, C.M., Smith, N.C. (1997). Nitric Oxide and thermoregulation during exercise in the horse. *Journal of Applied Physiology* 82(4), 1035-1039.
- Marzooco A. E Torres B.B. (1999). Bioquímica Básica. Guanabara Koogan, 2ª ed.
- McDermott J.C. and Bonen A. (1993). Endurance training increases skeletal muscle lactate transport. *Acta Physiologica Scandinavica*. 147, 323-327.
- Mc Garry J.D., Newgard C.B., Hirsch L.J., Foster D.W. (1983). Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or indirect pathway. *Journal of Biological*

Chemistry. 258: 8046-8052.

- Mills P.C., Smith N.C., Casas I., Harris P., Harris R.C., Marlin D.J. (1996). Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 74(1-2): 60-66.
- Mills, P.C., Higgins, A.J. (1997). Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: Implications for the exercising horse. *Veterinary Journal* 153(2), 125-148.
- Mitchel P., (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148
- Nevill M.E., Boobis L.H., Brooks S., Williams C. (1989). Effect on training on muscle metabolism during treadmill sprinting. *Journal of Applied Physiology*. 67:2376-2382.
- Preuschoft H., Falaturi P., Lesch C. (1995). The influence of riders on their horses. *Tierärztliche Umschau*. 50/8: 511-521.
- Pyne, D.B. (1994). Exercise-induced Muscle Damage and Inflammation: A review. *The Australian Journal of Science and Medicine in Sport* 26(3/4), 49-58.
- Rasanen L.A., Wiitanen P.A.S., Lilius E.M., Hyyppä S., Poso A.R. (1996). Accumulation of uric acid in plasma after repeated bouts of exercise in the horse. *Comparative Biochemistry Physiology B*. 114(2): 139-144.
- Reid M.B. (1996). Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News of Physiology Science* 11:114-119.
- Reiser, P.J., Moss, R.L., Giulian, G.G. and Greaser, M.L. (1985). Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *Journal Biological Chemistry*. 260: 9077-9080.
- Ryan, J.A. and Hightower L.E. (1996). Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. Stress-inducible Cellular Responses.

- Saltin B., Gagge A.P., Stolwijk J.A.J. (1968). Muscle temperature during submaximal exercise in man. *Journal of Applied Physiology*. 25: 679-788.
- Sen C.K., Marin E., Kretzschmar M., and Hänninen O. (1992). Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization. *Journal of Applied Physiology*. 73: 1265-1272.
- Sen, C.K. (1995). Oxidants and Antioxidants in exercise. *Journal of Applied Physiology*. 79: 675-686.
- Simões, H.G. (1997). Determination of Maximal Lactate Steady State Velocity: Coincidence with Lower Blood Glucose. *Medicine and science in sports and exercise* 28(5): 405, supplement.
- Sjödin B., Wesling H. E Apple S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine* 10: 236-254.
- Smith, I.K., Vierheller T.L. and Thorne C.A. (1988). Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates Using 5,5(-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid). *Analytical Biochemistry* 175, 408-413.
- Smolka M.B. (1999). Exercício físico e expressão da proteína de estresse HSP72 em músculos de ratos submetidos a diferentes tipos de treinamento. *Tese de mestrado*, IB/UNICAMP
- Spriet L.L. (1995). Anaerobic metabolism during high-intensity exercise IN: Hargreaves M., ed. *Exercise Metabolism I* ed. Human Kinetics: 1-40.
- Souminen, H., Heikkinen, E., Liesen, H., Michel, D. and Hollman, W. (1977). Effect of eight weeks' physical training on muscle and connective tissue of the m. vastus lateralis in 69-year-old men and women. *Journal of Gerontology*. 32: 33-37.
- Stegmann, H. et al. (1981). Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *International Journal of Sports Medicine* 2: 160-165.
- Tanaka, K. et al. (1984). A longitudinal assessment of anaerobic threshold and distance running performance. *Medicine and science in sports and*

exercise. 16; 278-282.

- Tegtbur U., Busse M.W. e Braumann K.M. (1993). Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 25/5: 620-627
- Tessier F., Margaritis I., Richard M.J., Moynot C. And Marconnet P. (1995). Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 27: 390-396.
- Travacio M. & Llesuy S. (1996). Antioxidant enzymes and their modifications under oxidative stress conditions. *Journal of Brazilian Association / Advanced Science*. 48(1/2): 9-13.
- Viru A. (1984). The mechanism of training effects: A hypothesis. *International Journal of Sports Medicine*. 5: 219-227.
- Volfiger L., Lassourd V., Michaux J.M., Braun J.P. and Tourtain P.L. (1994). Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. *American Journal of Physiology*. 266(35): R434-R441.
- Yagi, K. (1976). A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemistry Medicine*. 15: 212-216.
- Weineck J. (1989). Manual do treinamento esportivo. São Paulo: ed. Manole, 2ª ed.
- Weltman, A. (1990). The Blood Lactate Response to Exercise. *Current Issues in Exercise Science* (Monograph number 4).
- Weltman, A. et al. (1990). Reliability and validity of continuous incremental treadmill protocol for the determination of lactate threshold, fixed blood concentration, and VO_2 max. *International journal of sports medicine* 11: 26-32.
- Willianson C.C. et al. (1996). Horse plasma lactate determinations: comparison of wet and dry chemistry methods and the effect of storage. *Equine Veterinary Journal* 28(5): 406-408

- Winder, W. N., Baldwin, K. M. and Holloszy, J. O. (1974). Enzymes involved in ketone utilization in different types of muscles: adaptations to exercise. *European Journal of Biochemistry*. 47: 461-467.
- Zoppi C.C. (1999). Adaptações induzidas pelo treinamento físico no metabolismo oxidativo e sistema de defesa antioxidante em músculo e sangue de ratos, e sua correlação com os níveis de lesão muscular. *Tese de mestrado*, IB/UNICAMP.

ANEXO I

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Foto do troféu de Campeão Paulista na modalidade velocidade livre longa distância, conquistado pelo cavalo número 3 (*Witr Van Palas*), em sua primeira competição de longa distância em um percurso de 125 km, em outubro de 1998, em Pedreira / SP. Este cavalo pertence ao autor desta tese, e foi por ele treinado durante seu mestrado.

ANEXO II

Resumo do trabalho apresentado na Conference on Equine Sports Medicine and Science, em Córdoba, Espanha. Este trabalho foi resultado da primeira parte de experimentos desta tese.

CESMAS

Conference on Equine Sports Medicine and Science

Arno Lindner (editor)



Wageningen Pers

5. Determination of the aerobic/anaerobic threshold in equines using the lactate minimum speed (LMS) protocol

Gondim F, Zoppi CC, Pereira-da-Silva L and Macedo DV

Lab de Bioenergética, Depto Bioquímica, IB/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Take home message

The modified LMS protocol proposed in this paper can easily be used under field conditions by horse trainers and veterinarians. The results obtained allow a scientific evaluation of the athletic potential of an individual horse and constitute an easy way to measure the evolution of its performance with time.

Introduction

The aerobic/anaerobic threshold in athletes can be used to modulate the effort level and to monitor the level of aerobic/anaerobic fitness resulting from the training programme. In order to be useful to trainers the protocols for the determination of this threshold have to satisfy some opposing conditions. The methodology and the measurements used must be simple, easy to use, inexpensive and at the same time be able to generate reliable information about the dominant energy metabolism during physical exercise at different levels of intensity. The exact determination of this aerobic/anaerobic threshold is extremely important for athletic horses. This is especially the case for endurance horses, which may be submitted to extenuating efforts of up to 160 kilometres, with average speeds that can reach 15 km/h in international competition, sometimes leading to exhaustion levels or fatal consequences.

The Heck protocol (Heck et al. 1985) has been used with horses for some time already. This protocol determines the onset of blood lactate accumulation - OBLA - based on a lactate level of 4.0 mmol/l, generally taken to be the aerobic/anaerobic threshold. On the other hand the reference level for lactate in LMS is the concentration at rest. We have opted to adapt and standardize the lactate minimum speed (LMS) protocol proposed for humans by Tegtbur (1993). We consider this methodology more precise and easy to use in the field. We gave high priority to individual treatment both in the methodology and interpretation of results when adapting this originally human protocol to horses.

Material and methods

Five male horses in early training for endurance competition were ridden by their owners on a 1,200 m long, level field track (grass surface), marked every 200 metres. We used the owners, which were also the habitual riders of these horses, to eliminate those extrinsic variables related to the psychology and the biodynamics of horse/rider pairs, which can cause considerable variation in the results (Preuschofft 1995). In this manner these parameters can be applied to real competition conditions.

The first modification made in the original human protocol was the utilization of a 500 m maximal speed gallop to induce a very high lactate level which then allowed a determination of the kinetics of accumulation and removal of lactate. Obviously this run was preceded by a warm up session, which consisted of a 10 minute walk, followed by a 5 minute trot and a 1 minute canter. After the warm up and the gallop at maximal speed the lactate level was determined with disposable reactant strips using a portable lactate meter (Accusport®, Boehringer Mannheim). The blood samples were collected from the jugular vein with a needle and syringe, and immediately applied to the reactant strips. This was done at regular intervals for approximately 20 minutes with the horse at rest, allowing the determination of a lactate peak (LP). The results are shown in Table 1.

Table 1. Characteristics of the horses

Horse	Breed	Age (years)	Sex *	Weight (kg)	Peak lactate concentration (mmol/L)	Time of lactate peak (minutes)
1	Arab	7	G	390	8.5	9
2	Arab	6	S	400	13.4	15
3	1/2 QH	10	G	445	7.3	1
4	A Arab	12	S	410	8.7	3
5	A Arab	9	G	510	7.7	1

* S: stallion / G: gelding

Another 500 m full gallop run was then made and the lactate level was measured at the LP instant previously determined for that horse. This was then called the pre-test (PT) lactate level. This was followed by a series of timed 1,000 m runs at regularly increasing speeds, with a 2 min interval between each run. At the end of each timed run, heart rate and lactate level were measured. The first run was done at approximately 12 km/h trot with the rider maintaining a constant speed, helped by the 200 m track markers. The second run was made at the fastest possible trot and the following ones at a fast canter and finally a gallop. The runs went on at increasing speeds until the lactate level was clearly rising again after an initial decrease from the PT level to around resting levels. Heart rate was monitored with a Vanguard heart rate meter. This allowed us to determine the LMS for these horses. The results are shown in Table 2.

Table 2. Levels of LMS, lactate and heart rate in limiar and in rest.

Horse	Speed(km/h)	HR(bpm)	Rest HR(bpm)	Lactate(mmol/L)	Rest lactate(mmol/L)
1	21	120	36	1.7	1.2
2	23	125	35	1.5	1.3
3	25.5	130	38	1.5	1.6
4	21	129	32	1.4	1.6
5	18	120	39	1.9	1.5

Discussion

The aerobic/anaerobic threshold for sport horses can be obtained with an adaptation of the LMS protocol of Tegtbur originally proposed for human athletes. The lactate peak (LP) and the instant at which it occurs are important individual characteristics of each horse and should always be determined in advance for higher reliability of the data obtained with the LMS protocol.

Horses 1, 2 and 4 showed similar LMS but the kinetics of the LP's were different. Horses 1 and 2 had similar kinetics but the LP values were different. Horse 3 has a previous history of training for team roping and belongs to another breed. This probably accounts for its higher LMS and faster LP. Horses 4 and 5 also showed a fast LP, but horse 5 has a lower LMS, probably due to some very long sedentary periods in its training history. We can see then that individual characteristics of both nature intrinsic (breed, age, sex, weight), and extrinsic (state of health, training and competing history) and also those variables related to the horse/rider pair have to be taken into consideration when interpreting the results.

Lactate production, accumulation and removal are important metabolic data which are relevant in the interpretation of the results obtained from the measurement of the LP concentration and its time of occurrence. Further biochemical studies of the intracellular adaptations related to training history, age and genetic heritage are needed to help shed light on the results being currently obtained.

It is usual today to consider as the aerobic and anaerobic threshold that level of effort which leads to a lactate concentration of 2,5 and 4,0 mmol/L, respectively. The concept was proposed by Heck et al. (1985), and it is based on the fact that both lactate levels and heart rates stop are linearly dependent on the effort level at this point (Conconi et al. 1982). We consider the results obtained this way as a physiological aerobic threshold. The aerobic/anaerobic threshold obtained with the modified LMS protocol proposed in this paper is based on the level of effort needed to raise the lactate level above its resting value. This occurs when the anaerobic glycolytic path starts to predominate in the production of energy for the exercise. We consider the results obtained this way as a biochemical aerobic threshold.

The modified LMS protocol proposed in this paper can easily be used under field conditions by horse trainers and veterinarians. Only a track without ups and downs, a stop watch and a portable lactate meter are needed. The results obtained allow a scientific evaluation of the athletic potential of an individual horse and constitute an easy way to measure the evolution of its performance with time.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP and CNPq for their generous financial support. The contribution of Professor J. Busnardo-Neto with the English translation and final revision is gratefully acknowledged here. The authors are also indebted to the owners and staff of Fazenda Rio das Pedras, a historic thoroughbred breeding farm in Campinas, for the use of part of their installations.

References

- Heck S et al. (1985). International Journal of Sports Medicine. 6, 117-130
Tegtbur U (1993). Medicine Science and Sports Exercise. 25/5, 620-627
Preuschofft H (1995). Tierärztliche Umschau. 50/8, 511-521
Conconi F et al. (1982). Journal of Applied Physiology. 52/4, 869-873

ANEXO III

Resumo aceito para apresentação oral na Conference on Equine Sports and Exercises (CESMAS 2000), que será realizado em maio em Messina/Taormina na Itália. Neste trabalho apresentamos os dados obtidos na segunda parte desta tese.

OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN HORSES

Gondim F., Silveira L. R., Pereira-da-Silva L., Macedo D.V.

Lab. de Bioquímica do Exercício, Depto. Bioquímica, IB/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil
gondim@obelix.unicamp.br

Introduction

The disruption of intracellular homeostasis in response to physical exercise leads to metabolic and physiologic conditioning. Indeed, this seems to be the main stimulus responsible for a series of events finishing with a new cellular homeostasis (1). Under this new condition, many enzymes show activity levels higher than those previous to exercise, in a compensatory way (2). Intense exercise without the corresponding rest period can lead to an overtraining condition. This will later result in poor performance and a variety of tissue damage is likely to occur, causing a decrease in the level of or even the complete interruption of the physical activity (2). The success of adaptation is related to the ability of the muscle fibers to tolerate the applied stimulus.

There is a strong correlation between physical exercise and the production of reactive oxygen species (ROS) (3). The main targets of these species are; the cellular membranes, which undergo lipid peroxidation, the proteins exposed to proteolytic attack after carbonylation or oxidation; and both nuclear and mitochondrial DNA that suffer disruption or crosslinking (4).

Although all aerobic cells generate ROS and consequently free radicals. The natural antioxidant defenses usually prevent the cellular damage caused by these highly reactive species. When the generation of these species is increased, and/or the activity of the antioxidant systems is decreased, an oxidative stress is established, resulting in cellular damage or even cellular death.

Since 1982 when Davies et al (3) showed that intramuscular oxidative damage is a consequence of ROS generation, several papers began to describe a cause-effect relationship between oxidative stress and fatigue and/or muscle damage (5).

In this paper we to follow the oxidative stress level of 9 horses during a 210 km endurance competition lasting three days. The chosen parameters were two biomarkers of oxidative attack and two of the antioxidant defense systems.

Materials and Methods

Nine horses were followed during an endurance competition developed in three stages of 70 km each.

Table I - Horse characterization

Horse	Breed	Age years	Sex (*)	Overall distances raced km	Winning history	Competitive lifetime months	Rest before ride days	Rider weight kg.
Horse 1	A. Arab	11	G	250	1x1 th , 1x3 th	48	10	75
Horse 2	A. Arab	15	M	380	2 x 3 th	95	15	75
Horse 3	Arab	6	S	245	1 x 3 th	23	30	80
Horse 4	Arab	6	G	130	-	12	7	80
Horse 5	Arab	6	S	190	1 x 3 th	24	7	95
Horse 6	A. Arab	8	G	0	-	7	3	75
Horse 7	½ Arab	10	G	60	-	8	5	85
Horse 8	A. Arab	9	G	90	-	12	5	75
Horse 9	Arab	5	G	60	-	6	7	75

* (S) Stallion

(G) Gelding

(M) Mare

Blood samples (4 ml) were collected just before the start of the competition and at the end of each daily stage, being immediately placed in ice. The samples were centrifuged for plasma isolation and the pellet was resuspended and submitted to hemolysis. All samples were then kept frozen at -70⁰ C before the analysis.

The level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (6) and carbonylated proteins (7) were determined in the plasma fraction. The activities of the enzymes glutathione reductase (8) and catalase (9) were measured in the hemolysate.

Statistical analysis were made by ANOVA (one-way) and Tukey HSD test.

Results and Discussion

Table II summarizes the results of the endurance race, showing that the animals that obtained the better places were those with previous good performance and a longer period of training (Table I).

Table II - Results of multi day race. The speeds shown an the average speeds in km/h and the horses marked as out had been eliminated on the previous day.

<i>Horses</i>	Day 1		Day 2		Day 3	<i>Final results</i>		
	65 km		65 km		80 km			
	Speed	Clas.	Speed	Clas.	Speed	<i>Speed</i>	<i>Classification</i>	<i>Best condition</i>
<i>Horse 1</i>	13,3	1 th	12,5	4 th	13,7	13,2	1 th	-
<i>Horse 2</i>	13,1	2 th	12,2	5 th	13,4	13,0	2 th	-
<i>Horse 3</i>	12,7	6 th	11,6	7 th	13,8	12,9	6 th	2 th
<i>Horse 4</i>	11,9	12 th	12,5	3 th	13,7	12,9	7 th	1 th
<i>Horse 5</i>	9,6	22 th	9,6	15 th	12,2	10,8	14 th	-
<i>Horse 6</i>	11,8	10 th	12,2	9 th	out	-	-	-
<i>Horse 7</i>	11,4	16 th	11,9	6 th	out	-	-	-
<i>Horse 8</i>	12,9	8 th	10,5	13 th	out	-	-	-
<i>Horse 9</i>	8,7	23 th	out	-	-	-	-	-

The oxidative stress level induced by the competition was measured through the analysis of the biomarkers shown in Table III and the activities of the enzymes shown in Table IV.

The plasma levels of TBARS showed an initial increase followed by stabilization ($p < 0,05$), better observed in the successful horses (1, 2, 3 and 4). The same pattern was observed for carbonylated protein levels, with a slight decrease at the last day.

Table III - Determination of the level of oxidative biomarkers.

Horses	<i>TBARS (nmol/mL) *</i>				<i>Carbonylated proteins (umol/mL)</i>			
	Before	Day 1	Day 2	Day 3	Before	Day 1	Day 2	Day 3
Horse 1	0	8,2	8,2	8,9	97	104	107	85
Horse 2	0,49	8,2	10,0	10,4	76	109	112	49
Horse 3	0	11,1	11,1	11,1	68	83	68	62
Horse 4	0,49	16,1	13,3	16,6	103	77	137	86
Horse 5	0,42	8,9	8,9	7,8	64	80	76	72
Horse 6	0	10,4	15,5	out	89	82	47	out
Horse 7	0	7,8	9,4	out	65	97	50	out
Horse 8	0	10,4	10,4	out	69	100	80	Out
Horse 9	0	7,8	out	-	68	107	out	-
	*	* +	* +	* +				

(*) Analysis of Variance, $p < 0,05$. (+) $p < 0,05$ relative Before group.

Table IV - Determination of enzymatic activities

Horses	<i>Catalase (k/gHb)</i>				<i>Glutathione reductase (UI/gHb) *</i>			
	Before	Day 1	Day 2	Day 3	Before	Day 1	Day 2	Day 3
Horse 1	0,55	0,44	0,71	0,74	30,7	30,8	293,5	161,2
Horse 2	0,27	0,67	0,79	0,69	48,4	11,8	148,1	120,3
Horse 3	0,36	0,41	0,65	0,93	96,9	27,0	113,8	458,5
Horse 4	0,26	0,55	0,84	0,45	22,5	85,4	178,8	187,1
Horse 5	0,38	1,40	0,62	0,77	24,0	20,2	129,8	363,0
Horse 6	0,45	0,45	0,22	out	62,6	26,1	119,9	Out
Horse 7	0,68	0,56	0,40	out	51,0	28,4	173,2	Out
Horse 8	0,43	0,27	0,51	out	159,1	91,0	71,1	Out
Horse 9	0,68	0,51	out	-	90,6	19,8	out	-
					*	* ++	*	*+

(*) Analysis of Variance, $p < 0,05$. (+) $p < 0,05$ relative Before group. (++) $p < 0,05$ relative Day 2 and Day 3 groups.

The results shown in Table IV, support the hypothesis that the antioxidant capacity is the limitation for the response to stress, as those animals that finished the competition (horses 1, 2, 3, 4 and 5) showed a compensatory adaptation (3), probably induced by the aerobic exercise stimulus on the antioxidant enzymes, mainly glutathione reductase ($p < 0,05$). The rest period between stages lasted 15 hours approximately. There is a tendency towards a decrease in the enzymatic activities for horses 7, 8 and 9 and an absence of response for horses 1, 5 and 6 after the first day of competition. However, an increase on the activity of these enzymes can be observed from the second day on.

Horses 1 and 2, respectively first and second classified on this race, presented a decreased on the antioxidant activities in the last day, either in comparison to their own levels on the second day or compared to the results of the other horses that finished the competition. These results could point to a higher stress imposed on these two horses to win the endurance race. This hypothesis is supported by the results shown by horses 3 and 4, which placed respectively 6th and 7th, but won first and second places for best condition.

Conclusions

The level of oxidative stress imposed on horses during an endurance race can be estimated by these four chosen biomarkers.

The comparison between the activity of the antioxidant system at rest and during or after the competition can be used to estimate the ability to overcome the competition stress.

All these parameters when analyzed together can provide useful indicator - stress threshold - which permits adjustments of intensity levels during training. This is extremely important to prevent tissue damage due to overtraining (2). This method can also be useful during the post-competition rest period, to follow the recovery and to avoid a premature return to heavy training.

Financial Support

Fapesp (97/03889-4) and CNPq.

References

- (1) Viru A. (1984). The mechanism of training effects: An hypothesis. *International Journal Sports Medicine* 5: 219-227.
- (2) Kuipers H. (1997). Training and overtraining: NA introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 30(7): 1137-1139.
- (3) Davies K. J., Quintanilha A. T., Brooks G. A. and Packer L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical Biophysical Research Communication* 107: 1198-1205.
- (4) Imlay J. A. and Linn S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302.
- (5) Fitts R. H., (1994). Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiological Review* 74(1): 49-94.
- (6) Yagi K. (1976). A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine* 15: 212-216.
- (7) Levine R. L., Garland D. and Oliver C. N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology*. 186: 464-478.
- (8) Smith I. K., Vierheller T. L. and Thorne C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5(-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry* 175: 408-413.
- (9) Aebi, H. (1984). Catalase. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.

ANEXO IV

Apresentações em congressos nacionais.

Gondim F., Zoppi C.C., Pereira-da-Silva L. e Macedo D.V.

"Determinação de limiar aero/anaerobio em eqüinos através do protocolo LMS". XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, de 27 a 30 de agosto de 1997.

Atividades didático-pedagógicas.

Monitor da disciplina Bioquímica básica para Educação física do curso de Educação Física da UNICAMP (BB 110-B), nos anos 1996 e 1997.

Palestras.

"Adaptações bioquímicas induzidas pelo condicionamento físico". Palestra proferida aos alunos de graduação em Biologia na UNICAMP, a convite do coordenador da disciplina de Bioquímica básica BB 280, em 27 de setembro de 1997.

"Tipificação muscular através de biópsia". Palestra proferida aos alunos de graduação do curso de Educação física da UNICAMP, a convite do coordenador da disciplina de Bioquímica básica BB 110-A, 17 de agosto de 1998.

"Ataque oxidativo e sistema de defesa antioxidante em eqüinos de enduro". Palestra proferida ao alunos do curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista (UNIP), em 27 de agosto de 1999, durante a V Semana acadêmica.