

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

STEPHÂNIA KATURCHI MENDES MÉLO

AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES E
HEMATOLÓGICOS EM EQUINOS MARCHADORES SUPLEMENTADOS
E SUBMETIDOS AO TESTE DE SIMULAÇÃO DE MARCHA
MODIFICADA

Recife

2017

STEPHÂNIA KATURCHI MENDES MÉLO

AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES E
HEMATOLÓGICOS EM EQUINOS MARCHADORES SUPLEMENTADOS
E SUBMETIDOS AO TESTE DE SIMULAÇÃO DE MARCHA
MODIFICADA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Cordeiro Manso Filho.

Co-orientador: Profa. Helena Emília C. C. Cordeiro Manso.

Recife

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

M522a Melo, Stephania Katurchi Mendes

Avaliação dos biomarcadores antioxidantes e hematológicos em equinos marchadores suplementados e submetidos ao teste de simulação de marcha modificada / Stephania Katurchi Mendes Melo. – 2017.

70 f. : il.

Orientador: Helio Cordeiro Manso Filho.

Coorientadora: Helena Emília C. C. Cordeiro Manso.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências.

1. Cavalos 2. Exercícios físicos 3. Estresse oxidativo 4. Teste de simulação de marcha I. Manso Filho, Helio Cordeiro, orient.

II. Manso, Helena Emília C. C. Cordeiro, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Avaliação dos biomarcadores antioxidantes e hematológicos em equinos
marchadores suplementados e submetidos ao teste de simulação de marcha
modificada

Tese de doutorado elaborada por

STEPHÂNIA KATURCHI MENDES MÉLO

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Cordeiro Manso Filho
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dra. Lucia Ferreira Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dra. Telga Lucena Alves Craveiro de Almeida
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dedico a minha família (Niedson Júnior, Sophia
Katurchi Mélo e Stella Katurchi Mélo).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida mãe, pela educação e com sua doçura me proporciona tanto carinho e amor, a senhora certamente é meu maior exemplo de vitória.

Ao meu marido, Niedson Júnior e minhas filhas (Sophia e Stella), nos quais foram responsáveis por cada degrau avançado, durante todos esses anos vocês foram pra mim um grande estimulador de força, de coragem, perseverança e energia infinita para nunca desistir diante do primeiro obstáculo encontrado. Vocês são e sempre serão meu maior porto seguro aqui embaixo, meu herói e simplesmente aqueles que mais amo. Obrigada por estarem sempre comigo.

Ao orientador, amigo, conselheiro e professor, o Dr. Hélio Cordeiro Manso Filho, por nenhum momento sequer, se negou a dividir seu conhecimento, sempre se preocupando até com pequenos problemas pessoais pelos quais enfrentei durante esse trabalho. Obrigada por contribuir com tantos ensinamentos, tantas palavras de força, de ajuda. Carregarei tudo isso comigo juntamente com seu exemplo de profissionalismo. Espero um dia conseguir chegar ao seu nível.

A Prof^a. Helena Emília pela sua amizade e colaboração.

A Prof^a Lucia Maia pelo sua dedicação, paciência, atenção, sobretudo, pelo seu carinho. Obrigada por tudo, o que a senhora fez por mim, só uma mãe faz por uma filha.

Ao BIOPA laboratório, onde foram realizadas as análises bioquímicas e onde fui acolhida.

A toda equipe do Biopa, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Pierre pelo empréstimo do aparelho bioquímico onde foram realizadas as análises.

Aos eternos amigos mestrados Joyci d'Paula, Vanessa Anny, Camila Cardoso, Fernanda Barbosa, Telga Lucena, pelos momentos de entusiasmo partilhados em conjunto.

A minha amiga, companheira e confidente Denise, que esteve acompanhando toda a minha caminhada, sempre me apoiando e me incentivando.

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação da UFRPE, que honram através de muita determinação e esforço este importante curso.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A IRCA Nutrição Animal e a Merial Brasil, pelos indispensáveis insumos e investimento financeiro.

À todos vocês, minha eterna gratidão.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e viver com ousadia.
Pois o triunfo pertence a quem se atreve,
E a vida é muito bela para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Avaliação dos biomarcadores antioxidantes e hematológicos em equinos marchadores suplementados e submetidos ao teste de simulação de marcha modificada

O exercício físico é o estímulo estressante mais fisiológico que existe, pois submete o organismo à grandes alterações visando à manutenção da atividade muscular. O presente projeto mensurou os biomarcadores hematológicos, da digestão e do estresse oxidativo no sangue de equinos submetidos ao teste de simulação de marcha, e de equinos em manutenção e treinamento, tratados com suplemento com uma mistura de óleos rico em ômega 3 e 6. Foram utilizados dois diferentes experimentos, onde no experimento 1: foram utilizados doze animais da raça Mangalarga Marchador, e submetidos ao Teste de Simulação de Marcha (TSM) de baixa intensidade e media duração, 4 testes e 2 animais por dia, amostras de sangue foram coletadas nos seguintes tempos: Jejum (T1), imediatamente após o TSM (T2), após 15 minutos de recuperação (T3) e após 4 horas do TSM (T4), e avaliou-se: CGV, Hb, HT, CGB, LINFO, VCM, CHCM, PLAQ, CV, RDW-SD, GPx, SOD, PPT, URE, CREAT, AcUr, CK, ALT, AST. No experimento 2: Foram utilizados dois grupos diferentes de atividade, sendo um em manutenção (6 fêmeas adultas) e o outro em treinamento para provas de marcha (10 equinos adultos), os grupos receberam 100mL e 300mL, respectivamente, de suplementação de uma mistura de óleos, por via oral, durante 8 semanas. Amostras de sangue foram coletadas em três períodos distintos: pré-teste, após 4 e 8 semanas, no período matinal, com os animais em jejum alimentar de 12 horas e em repouso, e avaliou-se: CGV, Hb, HT, CGB, LINFO, RDW-SD, GPx, SOD, PPT, AcUr, CK. Então conclui-se que o TSM ocasiona alterações nos biomarcadores do estresse oxidativo, proteico e hematológicos de forma significativa, o que deve ser considerado nesse grupo de atleta que podem participar de competições com intervalo reduzido durante as provas de marcha. E que a suplementação com óleo polinsaturado e vitamina E, eleva os antioxidantes sanguíneos em animais em manutenção e em treinamento, com padrões diferentes, mas que contribui para o combate ao estresse oxidativo próprio de cada grupo analisado.

Palavras-chave: cavalos, exercício, estresse oxidativo, performance, marcha

ABSTRACT

Evaluation of biomarkers, antioxidants and hematological in horses submitted and submitted to modified gait simulation test

The physical exercise is the most physiological stressful stimulus that exists, because it submits the organism to the great changes aiming at the maintenance of the muscular activity. The present study measured hematological biomarkers, digestion and oxidative stress in the blood of horses submitted to gait simulation test, and horses in maintenance and training, treated with a mixture of oils rich in omega 3 and 6. In the experiment 1, twelve Mangalarga Marchador animals were used, and the animals were submitted to the low intensity and medium duration gait simulation test (MST), 4 tests and 2 animals per day, blood samples were collected (T2), after 15 minutes of recovery (T3) and after 4 hours of TSM (T4), and were evaluated: CGV, Hb, HT, CGB, LINFO, VCM, CHCM, PLAQ, CV, RDW-SD, GPx, SOD, PPT, URE, CREAT, ACUr, CK, ALT, AST. In experiment 2: Two different groups of activity were used, one in maintenance (6 adult females) and the other in training for gait tests (10 adult horses), the groups received 100mL and 300mL, respectively, of supplementation of a mixture of oral oils for 8 weeks. Blood samples were collected in three different periods: pre-test, after 4 and 8 weeks in the morning, with fasting animals at 12 hours and at rest, and evaluated: CGV, Hb, HT, CGB, LINFO, RDW-SD, GPx, SOD, PPT, AcUr, CK. We conclude that MST causes changes in biomarkers of oxidative, protein and hematological stress in a significant way, which should be considered in this group of athletes who can participate in competitions with reduced intervals during gait tests. And that the supplementation with polyunsaturated oil and vitamin E raises the blood antioxidants in animals in maintenance and training, with different standards, but contributes to the fight against the oxidative stress characteristic of each group analyzed.

Key-words: horses, exercise, oxidative stress, performance, gait

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1. Assurance level of the mix of oils used in both experimental groups during the experiment, according to the manufacturer	49
Table 2. Variation in the antioxidant and hematological biomarkers of horses under maintenance and supplemented with a mix of oils, rich in omega 3, omega 6 and vitamin E, for 8 weeks	50
Table 3. Variation in the antioxidant and hematological biomarkers of horses in marcha training supplemented with a mix of oils, rich in omega 3, omega 6 and vitamin E, for 8 weeks	51
Table 4. Result of the chemical-bromatological analysis of the concentrate provided for the animals under maintenance care (concentrate A) and in training (concentrate B) during the entire experiment and their respective assurance levels.....	52

ARTIGO 2

Table 1. Results for the protein and anti-oxidant metabolism biomarkers in four-beat gaited horses (n=12) before and after the marcha gait simulation test (MST)	67
Table 2. Results of the hematological biomarkers in four-beat gaited horses (n=12) before and after the gait simulation test.....	68

LISTA DAS ABREVIATURAS

CK – Creatine kinase

EROS - espécies reativas de oxigênio

HE – Hemácias

HT – Hematócrito (Hematocrit)

Hb – Hemoglobin

GPx – Glutathione Peroxidase

LEUCO – Leucócitos

LINFO – Linfócitos

MVC – Mean corpuscular volume

MCHC – Mean corpuscular hemoglobin concentration

MST – Marcha gait simulation test

PLAT – Platelets

PPT – Proteínas Plasmáticas Totais

SOD – Superoxide dismutase

TPP – Total plasma proteins

TSM – Teste de simulação de marcha

RBCc - Red blood cell count

RDW-SD – Red Blood Cell Distribution Width

RDW-CV – Coefficient of variation of the red blood cell distribution width

RL – Radicais livres

ROS – Reactive oxygen species

UrAc – Uric Acid

AcUr – ácido úrico

WBCc – White blood cell count

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO GERAL	13
3.1. Objetivo Específico	13
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4.1. Hematologia e fisiologia do exercício	14
4.1.1. Influência do exercício físico sobre os biomarcadores sanguíneos	15
4.2. Estresse oxidativo e o exercício	18
4.2.1. Influência do estresse oxidativo sobre os biomarcadores sanguíneos	19
4.3. Influência da utilização de suplementos em equinos atletas	22
4.4. Teste de simulação de marcha	23
5. REFERÊNCIAS	25
6. ARTIGOS CIENTÍFICO	34
6.2. Artigo 1 - Antioxidant and hematological biomarkers in different groups of horses supplemented with polyunsaturated oil and vitamin E	35
6.2. Artigo 2 - Marcha gait simulation test decrease antioxidative biomarkers in four-beat gaited horses	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

1. INTRODUÇÃO

A evolução da medicina esportiva em equinos no mundo vem aumentando consideravelmente nos últimos 20 anos, juntamente com o desenvolvimento tecnológico devido à implantação de laboratórios especializados, sendo possível desenvolver e estabelecer complexas interações entre os diferentes sistemas, possibilitando a obtenção do máximo desempenho atlético (FERRAZ, 2006).

O exercício físico é o estímulo mais fisiológico que existe, pois submete o organismo à grandes alterações visando à manutenção da atividade muscular (WILMORE e COSTILL, 2001; INOUE et al., 2005). No exercício de intensidade leve a moderada a maior parte da energia é provida através da oxidação dos ácidos graxos, as vias aeróbicas podem oxidar tanto os carboidratos quanto lipídeos, sendo os lipídeos utilizados em exercícios de médio e longa duração (MARLIN e NANKERVIS, 2002). A marcha pode ser caracterizada como um exercício de média intensidade e média duração, com animais deslocando-se a velocidades médias entre 12,0 e 15,0 km/h (3,33 e 4,17 m/s) (WANDERLEY et al., 2010).

Segundo Santos et al. (2001), certa quantidade de eletrólitos e fluídos são perdidos através da sudorese durante a atividade física, culminando em alterações transitórias na constituição plasmática. Portanto, a condição física do animal e a intensidade e duração do exercício ao qual é submetido, juntamente com as condições ambientais influenciam diretamente sobre os compostos sanguíneos.

A suplementação com nutracêuticos ricos em ácidos graxos é tema de diversos estudos e esta associada à elevação dos biomarcadores antioxidativos no sangue dos animais (OLIVEIRA et al., 2002). A suplementação com óleo rico em ômega 3 e 6 (polinsaturado e vitamina E) na dieta de equinos também pode ter efeitos benéficos em diversos sistemas orgânicos, como no sistema imunológico e na resistência física elevando o desempenho de animais atletas (PORTIEUR et al., 2006; KING et al., 2008). O uso generalizado de cavalos como atletas gerou muito interesse no papel da lesão oxidante durante o exercício em termos da fisiologia da fadiga muscular, fisiopatologia das miopatias, aumentando desempenho com antioxidantes, e as questões de bem-estar (KINNUNEN et al., 2005; MOFFARTS et al., 2005).

A hipótese do presente estudo é que ocorrerá adaptação metabólica dos equinos submetidos ao teste de simulação de marcha e a suplementação com óleo polinsaturado e

vitamina E altera os parâmetros hematológicos, digestivos e de estresse oxidativo em equinos em manutenção e exercitados.

2. JUSTIFICATIVA

Nenhum trabalho desenvolvido no Brasil descreve e avalia o condicionamento e possíveis adaptações metabólicas dos animais atleta submetidos a teste de simulação de marcha (TSM) e os efeitos da suplementação com uma mistura de óleos polinsaturado e vitamina E, sobre os parâmetros hematológicos, os biomarcadores da digestão e os biomarcadores do estresse oxidativo no exercício físico em equinos. Os dados gerados com a execução deste projeto certamente contribuirão para melhor entender o condicionamento físico e adaptação metabólica dos animais submetidos a TSM (teste de simulação de marcha) e a funcionabilidade dos suplementos rico em ômega 3 e 6 (de óleo polinsaturado e vitamina E) frente a performance funcional, atlético e recuperação pós exercício, além de contribuir para o bem estar dos equinos atletas.

3. OBJETIVO GERAL

Mensurar biomarcadores hematológicos, da digestão e do estresse oxidativo no sangue de equinos em manutenção e em treinamento, tratados com suplemento de óleo polinsaturado e vitamina E e de equinos submetidos ao teste de simulação de marcha.

3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar os efeitos da suplementação com óleo polinsaturado e vitamina E sobre biomarcadores hematológicos, de função digestiva e do estresse oxidativo, em animais das raças Puro-Sangue Árabe e Mangalarga Marchador.

Avaliar o condicionamento físico e adaptações metabólicas dos animais atletas durante o teste de simulação de marcha.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Hematologia e fisiologia do exercício

A importância da hematologia como meio semiológico é reconhecida mundialmente, não somente para o estudo dos valores de referência de animais saudáveis, como também para avaliar alterações fisiológicas determinadas por fatores de variabilidade tais como: raça, idade, sexo, influências ambientais e alterações decorrentes da utilização dos animais, e no caso do equino, principalmente para o esporte (DOMINGUES JÚNIOR et al., 2004).

O hemograma é um exame muito utilizado na clínica médica equina, sendo um indicador de alterações que podem não ser percebidas ao exame clínico, além de servir como procedimento para avaliar a saúde animal e auxiliar na obtenção de um diagnóstico. A avaliação dos elementos celulares do sangue, quantitativamente e qualitativamente, fornece informações indispensáveis ao controle evolutivo das doenças (FAILACE, 2006).

A fisiologia das hemácias dos equinos apresenta algumas particularidades específicas quando comparadas à de outras espécies de mamíferos com relação à resposta da eritropoiese. Nos equinos, as hemácias são liberadas na corrente sanguínea somente na sua forma madura, sendo que a presença de hemácias imaturas na circulação (reticulocitose) e a alteração na coloração das hemácias (policromasia) são condições extremamente raras em condições de homeostase e anemias moderadas, e o aumento do volume globular é uma alteração inconsistente nas anemias em equinos (FELDMAN et al., 2000). Atualmente, os contadores hematológicos calculam a distribuição do diâmetro dos eritrócitos, denominado RDW (Red Blood Cell Distribution Width) cujo resultado reflete de forma mais objetiva, o grau de heterogeneidade entre as hemácias de forma quantitativa, por ser considerado um coeficiente de variação da distribuição do volume das hemácias equivale a anisocitose observados nos esfregaços sanguíneos (BALARIN et al., 2006).

Outra particularidade dos equinos, é que seus eritrócitos possuem tendência para se agregarem, possivelmente devido à grande deformidade e essa propriedade leva à separação das células do plasma em poucos minutos. E também é comum a formação de células crenadas, além de outros mecanismos como a desidratação mediada por perdas de eletrólitos, onde a lesão oxidativa pode estar incriminada. Dessa forma, as amostras sanguíneas dessa

espécie devem ser bem homogêneas para a realização de exames laboratoriais (JAIN, 1993; BASKURT e MEISELMAN, 1999).

As variações no perfil hematológico são utilizados para avaliação de treinamento ou estados clínicos e a avaliação hematológica de equinos em repouso tem sido objeto de estudo visando estabelecer uma relação com treinamento ou capacidade atlética (ROSE et al., 1983).

Os valores de referência dos parâmetros hematológicos em cavalos é um assunto controverso e são aqueles observados em um indivíduo, ou grupo de indivíduos, num determinado estado de saúde. Vários fatores podem influenciar os valores sanguíneos normais, ou de referência, nas várias espécies. Diferenças nesses valores também podem ser determinadas por excitação, atividade muscular, tempo de colheita, temperatura ambiente, hidratação, altitude local, variação sazonal e diurna, além de práticas de contenção (LUMSDEN et al., 1980).

Pesquisadores têm realizado estudos que mostram os resultados das adaptações ao exercício, através de biomarcadores hematológicos e bioquímicos, nas diversas modalidades de marcha (PRATES et al., 2009; WANDERLEY et al., 2010; MANSO FILHO et al., 2012; MELO et al., 2013; MANSO FILHO et al., 2014; SILVA et al., 2014; MANSO FILHO et al., 2015; FERREIRA et al., 2015; NOLETO et al., 2016).

Análises laboratoriais tornaram-se fundamentais na avaliação do equino em competição, transformando-se em ferramentas decisivas para o acompanhamento do animal atleta (BALARIN et al., 2005).

4.1.1. Influência do exercício físico sobre os biomarcadores sanguíneos

Vários estudos apontam para progressos na avaliação dos componentes hematológicos e bioquímicos dos cavalos atletas marchadores relacionados com os exercícios físicos, principalmente na relação entre as alterações hematológicas e o estresse oxidativo (WANDERLEY et al., 2010).

O hemograma realizado após o exercício pode ajudar na interpretação do hemograma de repouso, uma vez que o exercício causa alterações no volume globular, principalmente devido à liberação de eritrócitos do baço na circulação, sendo o número de células liberadas relacionado com o aumento da atividade simpática que é proporcional a velocidade,

intensidade e duração do exercício, como também pela influência direta da população eritrocitária e as concentrações de catecolaminas (INOUE, 2005). Com o exercício físico, o cavalo atleta, pode sofrer alterações nos parâmetros hematimétricos, como decorrência de suas adaptações fisiológicas e, dentre estas, as elevações no hematócrito (HT) levando à hemoconcentração, tanto devido a contração do baço como a perda e movimentação dos líquidos corporais. Essas poderão ser revertidas por meio de intervenções terapêuticas, como a hidratação, ou decorrente de uma adaptação orgânica durante a recuperação, quando as catecolaminas, ao sinalizarem a contração esplênica, com liberação das hemácias (HE) para corrente sanguínea, provocam uma melhor perfusão tecidual para musculatura, aumentando a capacidade de transporte de oxigênio, há ainda um aumento concomitante das proteínas plasmáticas totais, o que reflete alterações do volume do plasma (ART e LEKEUX, 2005; WANDERLEY et al., 2010).

Carlson (1987) considera que o volume globular, a contagem total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina aumentam entre um e dois minutos após o início do exercício, no entanto essa resposta é diferente entre exercícios intensos, de curta duração e o enduro. Após o treinamento, também se observa aumento do HT, sendo mais visível em equinos que passaram por um significativo período sem treinamento (McGOWAN, 2008).

Aliada ao eritrograma, o leucograma de cavalos atletas em repouso recebeu ênfase na avaliação do condicionamento físico, especialmente a relação neutrófilos/linfócitos. Uma relação neutrófilo:linfócito de 1,5:1 (60% de neutrófilos para 40% de linfócitos) foi considerada ideal, sendo indicada a utilização da relação neutrófilo/linfócito do hemograma de repouso como marcador hematológico de excesso de treinamento, uma vez que alterações nessa relação são ligadas à liberação de cortisol devido ao estresse físico (HODGSON e ROSE, 1994). Embora o leucograma não seja utilizado para avaliação do condicionamento físico dos equinos, alterações no número de leucócitos podem indicar doenças subclínicas ou estresse, justificando seu monitoramento (McGOWAN, 2008).

As concentrações de leucócitos (LEUCO) e de linfócitos (LINF) são importantes e podem indicar leucocitose e linfopenia após esforço físico, ou serem representativos na avaliação da condição de normalidade dos animais atletas, por isso para obtenção de amostras que representem esses parâmetros, é importante que os animais estejam em repouso há algum tempo (CYWINSKA et al., 2010; WANDERLEY et al., 2015).

Em resposta associada ao exercício extenuante resulta na migração de leucócitos do compartimento marginal para o circulante. No leucograma, nota-se, aproximadamente, o

dobro da quantidade de leucócitos, devido ao aumento de neutrófilos e/ou linfócitos. Não ocorre desvio a esquerda, porque a neutrofilia é decorrente do aumento da população de células maduras na microcirculação devido à demarginação de neutrófilos ao endotélio, que alcançam o compartimento circulante (THRALL et al., 2007).

Korhonen et al. (2000) afirmaram que em cavalos treinados, a relação entre neutrófilos e linfócitos pode ser um indicador sensível de estresse de curta duração, sendo que uma baixa relação entre os valores dessas células sanguíneas pode ser indicativa de adaptação ao exercício.

As proteínas plasmáticas totais (PPT) apresentam uma função nutritiva, exercem pressão osmótica coloidal e auxiliam na manutenção do equilíbrio ácido-básico. Proteínas individuais atuam como enzimas, anticorpos, fatores de coagulação, hormônios e substâncias de transporte (DUNCAN et al., 1994). De acordo com Coffman (1979), a estimativa das proteínas plasmáticas totais é particularmente útil na detecção de infecção crônica, hemoconcentração e perda proteica, enquanto que o fibrinogênio é importante na coagulação e inflamação, sendo produzido pelo fígado.

Modificações nas concentrações das proteínas plasmáticas totais podem ocorrer em consequência do exercício físico (BAYLY e KLINE, 2006). Todavia, o aporte energético pelas proteínas plasmáticas totais durante o exercício físico é baixo, oscilando entre 5 a 10%, sendo utilizadas durante o exercício físico na reparação de tecidos lesados, e na durante a fase de recuperação na gliconeogênese (GORDON et al., 2007). Barton et al. (2003) examinaram a influência de corridas de diferentes distâncias nas proteínas plasmáticas totais de 83 equinos, verificando um aumento relacionado à maior distância percorrida. Jain (1993) alerta que as alterações nos níveis de proteínas plasmáticas totais devem ser examinadas à luz de achados clínicos e de laboratório, antes que qualquer diagnóstico ou prognóstico seja previsto.

Em cavalos de corrida, é comum que a concentração das proteínas plasmáticas totais aumente até 15%, no entanto, em equinos de enduro, é possível um aumento máximo alcançando 25%, devido às perdas de líquidos corporais no suor, efeito reversível uma vez que o animal seja hidratado ou ingira água (BAYLY e KLINE, 2006), porém não antes de 24 a 48 horas após exercício (TEIXEIRA NETO, 2006).

4.2. Estresse oxidativo e o exercício

Ultimamente têm-se dado muita atenção às lesões relacionadas com o metabolismo oxidativo, já que o processo de produção de radicais livres tem sido incriminado na fisiopatologia de diversas enfermidades dos equinos, principalmente dos cavalos atletas.

É sabido que o exercício físico regular e moderado traz diversos efeitos benéfico à saúde (WARBURTON et al., 2006). Por outro lado, pesquisadores também têm afirmado que à pratica de exercício intenso está ligado diretamente ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), podendo ser prejudicial (DEATON e MARLIN, 2003; URSO e CLARKSON, 2003). Alguns mecanismos que ocorrem durante exercício físico aeróbico imediato estão ligados à formação de moléculas oxidantes que poderão resultar em estresse oxidativo e dano oxidativo.

A produção e a utilização de energia são essenciais para o equino exercer todo seu potencial atlético (EATON, 1994). No exercício físico, durante o processo de respiração celular, indispensável para a obtenção de energia e manutenção da vida, são produzidos os radicais livres (RL) e entre outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; GUERRA et al., 2011).

A maioria dos radicais livres é altamente tóxica, e extremamente reativacapaz de reagir com diversas moléculas orgânicas como proteínas, lipídeos, além de ácidos nucleicos (JIMÉNEZ et al., 2005).

As lesões oxidativas podem ocorrer quando há excesso de produção de radicais livres e/ou quando os sistemas antioxidantes celulares se tornam ineficazes no controle e eliminação dessas substâncias (SILVEIRA, 2005). O estresse oxidativo é definido quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de RL e a defesa gerada pelos antioxidantes (URSO e CLARKSON, 2003; HALLIWEL, 2005).

Vale ressaltar que esses compostos são produzidos naturalmente, principalmente através do metabolismo oxidativo, e na maioria das vezes, são utilizados pelo organismo para a ativação do sistema imunológico quando há necessidade, na desintoxicação de certas drogas (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Também podem estar presentes na limpeza de tecidos mortos e neoplásicos, na atividade de combate a patógenos, na manutenção da integridade do sistema nervoso, e no melhoramento da função espermática, entre outros (WILLIAMS, 2004).

Fisiologicamente, o organismo pode defender-se da agressão mediada pelos radicais livres utilizando suas próprias reservas celulares antioxidantes. Estas podem ser pequenas moléculas que diminuem a reatividade do radical hidroxil (PERCÁRIO et al., 2001).

O aumento na produção de RL e EROS tem chamado muita atenção pelo seu efeito deletério, pois podem estar envolvidos diretamente na fisiopatologia de diversas doenças tanto em humanos como em equinos atletas, como estão presentes no processo natural de envelhecimento (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004), e, existem evidências de que as EROs possam estar envolvidas em mais de 50 doenças (ZWART et al., 1999).

A produção e a utilização de energia são essenciais para o equino exercer todo seu potencial atlético (EATON, 1994). A produção de EROS, em repouso, normalmente não representa problema no organismo, uma vez que o sistema de defesa antioxidante está a postos para neutralizar a sua produção (WILLIAMS, 2004). Porém, quaisquer condições que levem ao aumento da produção de radicais livres, ou à diminuição das defesas antioxidantes, podem gerar uma condição denominada estresse oxidativo, que é definido por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os sistemas de defesa antioxidantes (JIMÉNEZ et al., 2005).

Apesar dos tão conhecidos benefícios do exercício físico para a saúde (WARBURTON et al., 2006) e a produção de EROS como consequência do mesmo, tem sido pesquisado com frequência a utilização da suplementação com antioxidantes, afim de diminuir a produção dos EROS e consequentemente seus efeitos deletérios.

4.2.1. Influência do estresse oxidativo sobre os biomarcadores sanguíneos

Os eritrócitos são locais de grande suprimentos de oxigênio e abundantes para a geração e reação de radicais livres, sendo preenchidos por hemoglobina com atividade redox (IGLESIAS e CATALÁ, 2005). Sentürk et al. (2001) afirmaram que o aumento da temperatura corporal, a desidratação, a hemoconcentração e o trauma mecânico, aliados à maior produção de EROs são eventos relacionados com a hemólise durante o exercício.

Silva et al. (2007) reportaram que um programa de treinamento adequado, devidamente ajustado ao condicionamento físico do equino, não leva ao aumento acentuado da atividade das enzimas de função muscular.

Sentürk et al. (2005) consideraram os efeitos imediatos que o exercício físico intenso produzem sobre os biomarcadores hematológicos e propriedades físicas dos eritrócitos em humanos, incluindo o aumento da contagem total de eritrócitos, do volume globular, contagem total de células brancas, aumento da proporção de granulócitos (neutrófilos), além de alterações na composição plasmáticas, na viscosidade sanguínea, e nas propriedades dos eritrócitos, resultando na interferência da microcirculação sanguínea devido a perda de fluidez do sangue. Essas alterações hemodinâmicas correlacionadas com o exercício físico podem ser deletérias para a perfusão de alguns órgãos gerando assim lesões teciduais, sendo que esses eventos podem estar relacionados com a mortalidade durante o exercício. O exercício físico exaustivo foi capaz de induzir uma resposta semelhante à inflamatória como indicado pelo aumento da contagem de leucócitos e da porcentagem de granulócitos. (SILVEIRA, 2005).

A enzima Superóxido dismutase (SOD) dentro da célula realiza a “dismutação” do radical livre superóxido em um processo que produzirá no fim H_2O_2 e água, sendo responsável pela biotransformação de um radical (altamente reativo) numa espécie reativa de oxigênio com poder de reatividade. Por sua vez, a glutathione peroxidase (GPx) cataliza a oxidação da glutathione reduzida + H_2O_2 , formando glutathione oxidada e duas moléculas de água (DEATON E MARLIN, 2003) e protege a hemácia de danos oxidativos, neutralizando hidroperóxidos (JANIAK et al., 2010).

O SOD trata-se de uma enzima essencial para a sobrevivência dos eritrócitos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001) e a GPx é uma enzima que em conjunto com outras substâncias antioxidantes participa na transformação das espécies reativas de oxigênio, desempenhando papel vital na defesa antioxidante (fase hidrossolúvel) celular em todos os órgãos e tecidos (PREGO et al., 1997). Em cavalos de corrida e em animais de pentatlo foi demonstrado que ocorrem modificações nos biomarcadores de combate ao estresse oxidativo (BALOGH et al., 2001; MOFFARTS et al., 2005). Entretanto outros estudos demonstraram que os exercícios não interferem significativamente sobre as variações nos biomarcadores do estresse oxidativo (HARGREAVES et al., 2002).

O ácido úrico é um produto da oxidação das xantinas, no metabolismo das purinas, e trata-se de um importante antioxidante não enzimático, sendo encontrado no plasma em maior concentração quando comparado com as vitaminas antioxidantes (vitamina C e vitamina E) (VASCONCELOS et al., 2007). Em estudos com diferentes disciplinas equestres observa-se o aumento de AcUr durante o exercício físico, retornando aos valores após um período de repouso (EVANS et al., 2002; PEREIRA et al., 2012; CASTEJÓN, et al. 2006). Esse aumento

durante o exercício é resultante da degradação do ATP durante o exercício e também devido a reação primária de defesa antioxidante contra a produção de espécies reativas do oxigênio no momento de maior intensidade do exercício (CASTEJÓN et al., 2006).

A ureia (URE) é produzida no fígado a partir de dois íons amônio liberados durante o catabolismo dos aminoácidos (FERNANDES e LARSSON, 2000). A uréia sintetizada no fígado é liberada no sangue e a depuração pelos rins representa a principal via de excreção (SANTOS, 2006). No exercício prolongado ocorre o aumento do catabolismo proteico para satisfazer as demandas de energia, aumentando a concentração de ureia nos equinos, já nos exercícios realizados em curtos percursos e de intensidade moderada a intensa os níveis de ureia não costumam aumentar devido ao menor fluxo sanguíneo renal e catabolismo proteico (SANTOS, 2006), pode ocorrer também o aumento devido a desidratação após a realização de exercícios físicos (RIBEIRO et al., 2004).

A creatinina (CREAT) é produzida por ciclização não enzimática irreversível e desidratação da creatina (SCHOTT, 1993). A concentração da creatinina varia de acordo com a síntese de creatina e com a quantidade de tecido muscular do animal (STOCKHAM, 1995) e é catabolizada lenta e constantemente numa taxa que é diretamente proporcional à massa muscular do indivíduo (KERR, 2003). A creatinina é excretada principalmente pela via renal, e através das vias secundárias que são através do suor e do trato gastrointestinal, de forma que altos níveis sanguíneos indicam uma deficiência na função renal e também no caso de hipotensão, desidratação e dano muscular (SCHOTT, 1993; CARDOSO, 2008).

A Creatinaquinase (CK) é a enzima mais sensível para indicação de lesão muscular (KANEKO et al., 1997). No cavalo, a CK é encontrada predominantemente no músculo esquelético, no miocárdio e no cérebro. Como não há uma troca significativa dessa enzima entre o fluido cerebrospinal e o sangue, os aumentos significativos na atividade plasmática total da CK se devem à lesão muscular esquelética ou cardíaca (HARRIS e MAYHEW, 1998). Sendo assim, a magnitude do aumento da CK sérica é considerada como um marcador quantitativo da lesão muscular, reversível ou irreversível, causada pelo exercício, uma vez que o aumento nos níveis séricos da CK é diretamente proporcional à lesão muscular.

O aumento fisiológico da atividade da CK após o exercício físico com o envolvimento da mudança na permeabilidade da membrana, possivelmente ocorre em razão da hipóxia, (além de outros fatores), a hipóxia pode ocorrer durante exercícios leves em animais mal condicionados, sendo então esperada elevação mais significativa na atividade dessa enzima em relação a um animal bem condicionado fisicamente. Apesar de ser uma afirmativa

controversa, é possível que a magnitude do aumento da atividade das enzimas musculares diminua com o treinamento (HARRIS e MAYHEW, 1998).

4.3. Influência da utilização de suplementos em equinos atletas

Um organismo se encontra sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Sendo assim, atualmente a suplementação com antioxidantes é utilizada frequentemente porque sabe-se que: “se as espécies reativas de oxigênio causam dano oxidativo e tem um papel negativo em muitas enfermidades, podemos combater os oxidantes usando os antioxidantes, produzindo assim saúde” (HALLIWELL, 2013).

Os antioxidantes são substâncias que ajudam a reduzir os efeitos do estresse e da falta de oxigênio, formando complexos que atenuam as reações produtoras de radicais livres. A capacidade de defesa do sistema antioxidante depende de uma dieta adequada em micronutrientes (vitaminas, minerais, aminoácidos) e a produção endógena de antioxidantes como o glutathione (CÓRDOVA e NAVAS, 2000).

O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e a Glutathione Peroxidase (GPx) (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; NOTIN et al., 2010). O sistema de defesa não-enzimático inclui compostos sintetizados pelo próprio organismo como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, além de substâncias oriundas da dieta regular ou suplementação alimentar, tais como ácido ascórbico (Vitamina C), beta-caroteno (precursor da Vitamina A), grupos fenóis de plantas (flavanóides) e o alfa-tocoferol (Vitamina E) (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A defesa antioxidante de um modo geral está dividida em enzimática ou não enzimática (KIRSHVINK et al., 2008; SILVA e GONÇALVES, 2010), e age principalmente de quatro formas diferentes: 1) Inativação/detoxificação de oxidantes (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007), 2) Prevenção da formação de EROs (KIRSHVINK et al., 2008; VALKO et al., 2007), 3) redução do efeito deletério/formação de moléculas menos reativas (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007; SEN et al., 2010) e 4) Reparação do dano oxidativo (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007).

Devido às recentes descobertas sobre o estresse oxidativo, o dano oxidativo e todos os problemas associados, têm sido pesquisado a suplementação com antioxidantes e recomendada frequentemente, pois existe uma difundida crença de que se pode beneficiar a saúde com o uso dos antioxidantes (HALLIWELL, 2012).

A suplementação com óleo rico em ômega 3 e 6 na dieta de equinos também pode ter efeitos benéficos em diversos sistemas orgânicos, como no sistema imunológico e na resistência física elevando o desempenho de animais atletas (PORTIEUR et al., 2006; KING et al., 2008).

A Vitamina E (α -tocoferol) é o principal antioxidante do sistema não-enzimático. O envolvimento desta substância na prevenção das lesões relacionadas ao metabolismo oxidativo vem sendo estudado. A vitamina E reduz os efeitos da lipoperoxidação sobre as estruturas celulares, capturando os radicais livres e diminuindo os peróxidos lipídicos que são tóxicos e destroem os eritrócitos, neutrófilos e macrófagos. O exercício está associado ao estresse oxidativo e nestes casos pode-se observar o aumento no consumo de vitamina E (SILVEIRA, 2005). A vitamina E tem papel importante na prevenção da hemólise por manter a estabilidade das membranas (MEYDANI, 1995). A deficiência da vitamina E está associada ao aumento da fragilidade das membranas lisossomais e à diminuição da fosforilação oxidativa no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (SEN, 2001).

4.4. Teste de simulação de marcha

Os andamentos são importantes ferramentas nos programas de melhoramento genético dos equinos (MANSO FILHO et al., 2014). O andamento marchado ocorre quando, em qualquer fase da locomoção em média velocidade, o animal tem sempre um ou mais membros em contato com o solo. Por sua vez, a marcha ocorre durante o deslocamento, também em média velocidade, quando o cavalo está sempre com três membros em contato com o solo, evidenciando seus momentos de tríplice apoio, seja em marcha picada ou batida (ANDRADE, 1993).

A marcha é um andamento natural, marchado, simétrico, a quatro tempos, com apoio alternado dos bípedes diagonais e laterais, sempre intercalados por momentos de tríplice apoio. É um andamento com reações suaves e com pouco deslocamento do centro de

gravidade, com velocidade média de 12 km/hora e comprimento de passada de aproximadamente 2,0 metros (PRADO, 2008).

A marcha picada é um andamento marchado que possui dissociação no deslocamento dos bípedes laterais. É um andamento suave, com um menor atrito lateral em relação a andadura. O bípede lateral é dominante, sendo a marcha picada de boa qualidade aquela que apresenta bom equilíbrio entre os tempos de apoios diagonais e laterais (ANDRADE, 1993; PRADO, 2008).

A marcha batida é um andamento com o avanço dos bípedes diagonais em um descompasso ou dissociação bem caracterizado. A faixa é um tanto variável, com alguns animais com a marcha mais próxima da marcha picada, e outros com marcha mais próxima do trote. É caracterizada pelo maior predomínio no apoio, elevação e avanço dos bípedes diagonais movendo-se em dissociação. Ocorre o deslocamento do centro de gravidade no sentido vertical (ANDRADE, 1993; PRADO, 2008).

A marcha de centro verdadeira ou intermediária é um andamento intermediário entre a marcha picada e a batida. Não existe uma predominância de tempo nos apoios, elevações e avanços dos membros laterais ou diagonais. Os tempos de apoios diagonais são iguais, ou bem próximos, dos tempos de apoios laterais, com maior frequência e definição dos apoios tripedais (ANDRADE 1993; PROCÓPIO, 2013).

A marcha trotada é o andamento com deslocamento simultâneo ou quase simultâneo dos bípedes diagonais, gerando um mecanismo peculiar de sustentação e locomoção, no qual há possibilidade de ocorrer apoios monopodais, quadrupedais ou de suspensão mínima entre as trocas de apoios duplos diagonais (ANDRADE, 1993; PRADO, 2008), podendo haver, raramente, o tríplice apoio tão presente na marcha picada e batida.

O teste de simulação de marcha consiste em deslocar o animal em uma pista cercada e com característica de pista oficial para avaliação de marcha, ao passo por 10 minutos para o aquecimento do animal e em seguida colocar os animais para deslocar-se à marcha (fase da marcha), batida ou picada, durante 30 minutos, sendo 15 minutos no sentido horário e 15 minutos no sentido anti-horário (WANDERLEY et al., 2010).

5.0. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. Modalidades de marcha: estudos de andamentos em vídeo tapes. In: Congresso Brasileiro do Cavalo Campolina, Belo Horizonte. **Anais Belo Horizonte** [s.n.] 1993.
- ART, T.; LEKEUX, P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. **Livestock Production Science**, v.92, p.101-111, 2005.
- BALARIN, M. R. S.; LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C. B.; e FONTEQUE, J. H. Avaliação da glicemia e da atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamyltransferase e lactato desidrogenase em eqüinos puro sangue inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Semin. Ciênc. Agrar**. v.26, n.2, p.211-218, 2005.
- BALARIN, M. R. S., LOPES, R. S., KOHAYAGAWA, A., LAPOSY, C. B., FONTEQUE, J. H. Valores de amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) em equinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.5, p.637-641, 2006.
- BALOGH, N.; GAÁL, T.; RIBICZWYNÉ, P. Sz.; PETRI, Á. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. **Veterinary Clinical Pathology**, v.30, n.4, p.214-218, 2001.
- BARTON, M. H.; WILLIAMSON, L.; JACKS, S.; NORTON, N. Body weight, hematologic findings, and serum and plasma biochemical findings of horses competing in a 48-, 83-, or 159-km endurance ride under similar terrain and weather conditions. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.6, p.746-753, 2003.
- BASKURT, O. K.; MEISELMAN, H. J. Susceptibility of equine erythrocytes to oxidant-induced rheologic alterations, **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.10, p.1301-1306, 1999.
- BAYLY, W.; KLINE, K. A. **Hematología y bioquímica**. In: BOFFI, F. M. Fisiología del ejercicio en equinos. Buenos Aires: Inter-médica. cap.10, p.145-151, 2006.
- CARDOSO, C. A. **Comparação de kits comerciais na dosagem de constituintes bioquímicos do sangue em equinos hípidos**. 2008. 123p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2008.

- CARLSON, G. P. Hematology and body fluids in the equine athlete: a review. In: GILLESPIE J. R.; ROBINSON N. E. (eds.) **Equine Exercise Physiology 2**. Davis: ICEEP Publications, p. 393-425, 1987.
- CASTEJÓN, F.; TRIGO, P.; MUÑOZ, A.; RIBER, C. Uric acid responses to endurance racing and relationships with performance, plasma biochemistry and metabolic alterations. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.70-73, 2006.
- COFFMAN, J. R. Clinical chemistry and pathophysiology of horses: the plasma proteins. **Equine practice**, vol.74, n.4, p.1168-1170, 1979.
- CÓRDOVA, A.; NAVAS, F. J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. Departamento de Fisiologia e Bioquímica. E.U. Fisioterapia da Universidade de Soria – Espanha. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, p. 208, 2000.
- CYWINSKA, A.; GORECKA, P.; SZARSKA, E.; WITKOWSKI, G.; DZIEKAN, P.; SCHOLLENBERGER, A. Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. **Equine Veterinary Journal**. Cambridgeshire. Suppl., 42: 23-27, 2010.
- DEATON, C. M.; MARLIN, D. J. Exercise-associated oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.2, n.3, p.278-291, 2003.
- DOMINGUES JÚNIOR, M.; TOLEDO, P. S.; MANGONE, M.; MICHIMA, L. E. S.; FERNANDES, W. R. Avaliação das alterações hematológicas em cavalos da raça PSI submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **A Hora Veterinária**, v.24, p.41-44, 2004.
- DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 3 ed. Ames: Iowa State University press, 1994. 300 p.
- EATON, M. D. Energetics and performance. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. **The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine**. Philadelphia: Saunders. 1994. p.49- 62.
- EVANS, D. L.; PRIDDLE, T. L.; DAVIE, A. J. Plasma lactate and uric acid responses to racing in pacing Standardbreds and relationships with performance. **Equine Vet. J.**, v.34, suppl., p.131-134, 2002.

- FAILACE, R. **Hemograma**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 298p.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.
- FERNANDES, W. R.; LARSSON, M. H. M. A. Alterações nas concentrações séricas de glicose, sódio, potássio, uréia e creatinina em equinos submetidos a prova de enduro de 30km com velocidade controlada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.3, p. 393-398, 2000.
- FERRAZ, G. C. **Respostas endócrinas, metabólicas, cardíacas e hematológicas de equinos submetidos ao exercício intenso e à administração de cafeína, aminofilina e clenbuterol**. 2006. 111f. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- FERREIRA, L. M. C.; MELO, S. K. M., DINIZ, A. I. A.; VAZ, S. G.; ABREU, J. M. G.; MANSO, H. E. C. C. C.; MANSO FILHO, H. C. Aerobic exercise produces changes in plasma IL-6 but not IL-1b in four-beat gaited horses. **Comparative Exercise Physiology**. Cambridge. v. 11, n. 3, p. 159-165, 2015.
- GORDON, M. E.; McKEEVER, K. H.; BETROS, C. L.; MANSO FILHO, H. C. Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horse. **Veterinary Journal**, London, v.173, n.3, p.532-540, 2007.
- GUERRA, R. A. T.; KANAGAWA, A. L.; Dos SANTOS, C. F.; SILVA, F. S.; SOUZA, F. B.; CAVALCANTI, G. A.; LUBENOW, J. A.; SILVA, M. B.; NEVES, M. A.; MENEZES, R. **Ciências Biológicas – Caderno Virtual 2**, Ed. Universitária UFPB, 65p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 2001. 936p.
- HALLIWELL, B. How to characterize an antioxidant: an update. **Biochem Soc Symp**, v.61, p.73–101, 2005.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v.70, n.5, p.257-265, 2012.
- HARGREAVES, B. J.; KRONFELD, D. S.; WALDRON, J. N.; LOPES, M. A.; GAY, L. S.; SAKER, K. E.; COOPER, W. L.; SKLAN, D. J.; HARRIS, P. A. Antioxidant Status of Horses during Two 80-km Endurance Races. **J. Nutr.** v.132, p.1781S-1783S, 2002.

- HARRIS, P. A.; MAYHEW, I. G. Musculoskeletal disease. In: REED, S.M.; BAYLY, W. M. (eds.) **Equine Internal Medicine**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p. 371-426.
- HODGSON, D. R.; ROSE R. J. **Hematology and Biochemistry**. In: HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. (eds.) *The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 63-78. 1994.
- INOUE, Y.; MATSUI, A.; ASAI, Y.; AOKI, F.; MATSUI, T.; YANO, H. Effect of exercise on iron metabolism in horses. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v.107, n.1, p.33-42, 2005.
- JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
- JANIAK, M; SUSKA, M; DUDZINSKA, W; SKOTNICKA, E. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, n.2, p.137-145, 2010.
- JIMÉNEZ, M. H.; CERRILLA, M. E. O.; PERALTA, M. C.; HARO, J. G. H., DÍAZCRUZ, A.; PERRUSQUÍA, R. G. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animals domésticos. **Interciencia**, v.30, n.12, p.728-734, 2005.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.
- KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária – Bioquímica clínica e hematologia**. Editora Roca, São Paulo – SP. 2003. 436p.
- KING, S. S.; ABUGHAZALEH, A. A.; WEBEL, S. K.; JONES, K. L. Circulating fatty acid profile in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. **Journal of Animal Science**, v.86, n.5, p.1114-1123, 2008.
- KINNUNEN, S.; HYPPÄ, S.; LEHMUSKERO, A.; OKSALA, N.; MÄENPÄÄ, P.; HÄNNINEN, O.; ATALAY, M. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. **European Journal of Applied Physiology**, v.95, p.550-556, 2005.
- KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, P.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **Veterinary Journal**, v.177, n.2, p.178-191, 2008.

- KORHONEN, P. A. S.; LILIUS E. M.; HYYPPÄ, S.; RÄSÄNEN L. A.; PÖSÖ, A. R. Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in Standardbred trotters. **Journal of Veterinary Medical Association**, v.47, p.565-573, 2000.
- LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidant and antioxidant in disease: oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, 173, p.502-511, 2007.
- LUMSDEN, J.H.; ROWE, R.; MULLEN, K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.44, p.32-42, 1980.
- MANSO FILHO, H. C.; MANSO, H. E. C. C. C.; McKEEVER, K. H.; DUARTE, S. R. R.; ABREU, J. M. G. Heart rate responses of two breeds of four-gaited horses to a standardized field gaited test. **Comparative Exercise Physiology**. Cambridge, v. 8, n.1, p.41-46, 2012.
- MANSO FILHO, H. C. et al. Presença do alelo DMRT3 mutante nos cavalos das raças Campolina e Mangalarga Marchador. In: Anais da XV Conferência Anual da ABRAVEQ, 2014, Campos do Jordão. XV Conferência Anual da Abreveq. P.102, 2014.
- MANSO FILHO, H. C.; COTHRAN, E. G.; JURAS, R.; GOMES FILHO, M.; SILVA, N. B.; SILVA, G. B.; FERREIRA, L. M.; ABREU, J. M. G.; MANSO, H. E. C. C. C. Alelo DMRT3 mutante em equinos de marcha batida e picada das raças Campolina e Mangalarga Marchador. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. Recife-PE, v.18, n.1 p.6-11, 2015.
- MARLIN, D.; NANKERVIS, K. Indicators of performance. In: MARLIN, D.; NANKERVIS, K. **Equine exercise physiology**. Great Britain: Blackwell, 2002. p.245-260.
- MEYDANI, M. Vitamina E. **Lancet**, London, n.345, p.170-175, 1995.
- McGOWAN, C. **Clinical Pathology in the Racing Horse: The Role of Clinical Pathology in Assessing Fitness and Performance in the Racehorse**. Vet. Clin. N. Am: Equine Pract., v.24, p.405-421, 2008.
- MELO, S. K. M.; LIRA, L. B.; ALMEIDA, T. L. A. C.; REGO, E. W.; MANSO, H. E. C. C. C.; MANSO FILHO, H. C. Índices hematimétricos e bioquímica sanguínea no cavalo de cavalgada em condições tropicais. **Ciência Animal Brasileira**. Goiania. v.14, n.2, p. 208-215, 2013.

- MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; LEKEUX, P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained Thoroughbred horses. **Veterinary Journal**, v.169, n.1, p.65-74, 2005.
- NOLETO, P. G.; SANTOS, J. B. F.; ROCHA, F. M.; FASANO, P. E.; GUIMARAES, E. C.; MUNDIM, A. V. Effect of a 130-km endurance ride on the serum biochemical profile of Mangalarga Marchador horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.39, p.7-11, 2016.
- NOTIN, C.; VALLON, L.; DESBORDES, F.; LELEU, C. Oral supplementation with superóxido dismutase in Standardbreds trotters in training: a double-blind placebo-controlled study. **Equine Vet. J.**, 42 (suppl.38), p.375-381, 2010.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.
- PEREIRA, A. T.; Kuntz, A. R.; COSTA, M. M.; Pozzobon, R. Alterações hematológicas e bioquímicas em Cavalos Crioulos de rodeio - dados preliminares. In: IV SIEPE - Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012, Bagé-RS. **Anais do IV SIEPE**, 2012.
- PRADO, R. S. A. Raízes Mangalarga. São Paulo: Empresa das Artes, 259p, 2008.
- PRATES, R. C.; REZENDE, H. H. C.; LANA, A. M. Q.; BORGES, I.; MOSS, P. C. B.; MOURA, R. S.; REZENDE, A. S. C. Heart rate of Mangalarga Marchador mares under march test and supplemented with chrome. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa. v.38, n.5, p.916-922, 2009.
- PREGO, E. C.; BALBOA, J. P.; MIRANDA, E. C. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutation peroxidasa. **Revista cubana Invest Biomed**, v.16, n.1, p.10-15, 1997.
- PORTIEUR, K.; MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N. et al. The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. **Equine Veterinary Journal**, Suppl, v.38, n.36, p.279-284, 2006.
- RIBEIRO, C. R.; MARTINS E. A. N.; RIBAS J. A. S.; GERMINARO, A. Avaliação de constituintes séricos em equinos e muares submetidos à prova de resistência de 76km,

- no Pantanal do Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1081-1086, 2004.
- ROSE R. J.; ALLEN J. R.; HODGSON D. R.; STEWART J. H. e CHAN W. Responses to submaximal treadmill exercise and training in the horse: changes in haematology, arterial blood gas and acid base measurements, plasma biochemical values and heart rate. **Vet. Rec.** 113(26/27):612-618, 1983.
- SANTOS, S. A.; SILVA, R. A. M. S.; AZEVEDO, J. R. M.; MELLO, M. A. R.; SOARES, A. C.; SIBUYA, C. Y.; ANARUMA, C. A. Serum electrolyte and total protein alterations in Pantaneiro horse during long distance exercise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.53, n.3, 2001.
- SANTOS, V. P. **Variações hemato-bioquímicas em equinos de salto submetidos a diferentes protocolos de exercício físico**. 2006. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.
- SEN, C.K. Antioxidants in exercise nutrition. **Sports Med.**, Auckland, v.31, n.13, p.891-908, 2001.
- SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; SRIDHAR, C.; REDDY, Y. S. R.; D. Biplab. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. **The International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.3, Issue 1, Jul./Aug. 2010.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v.10, n.4, p. 303-313, jul./ago., 2004.
- SCHOTT, H. C.; HINCHCLIFF, K. W. Fluids, electrolytes and bicarbonate. **The Veterinary Clinics of North American. Equine practice**, v.9, n.3, p.577-604, 1993.
- SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.4, p.994-1002, abr, 2010.
- SILVA, F. S.; MELO, S. K. M.; MANSO, H. E. C. C. C.; ABREU, J. M. G.; MANSO FILHO, H. C. Heart and blood biomarkers in Brazilian gaited horses during standardized field gaited test. **Comparative Exercise Physiology**. Cambridge, v.10, n.2, p.105-111. 2014

- SILVEIRA, V. F. **Malondialdeído, vitamina E, cortisol, hemograma e enzimas musculares em equinos da raça Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade.** 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- STOCKHAM, S. L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v.11, n.3, p.391-414, 1995.
- TEIXEIRA NETO, A. R. **Variáveis fisiológicas e estresse oxidativo de equinos durante campeonato de enduro** 2006. 112f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- THRALL M. A.; BAKER D. C.; CAMPBELL T. W.; DENICOLA D.; FETTMAN M. J.; LASSEN E. D.; REBAR A. e WEISER G. 2007. **Interpretação da resposta leucocitária nas doenças**, p.127-140. In: Ibid. (Eds), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Roca, São Paulo.
- URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, n.1-2. p41-54, 2003.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 39, p.44-84, 2007.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFOTO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, Out. 2007.
- WANDERLEY, E. K.; MANSO FILHO, H. C.; MANSO, H. E. C. C. C.; SANTIAGO, T.A.; McKEEVER, K.H. Metabolic changes in four-beat gaited horses after field marcha simulation. **Equine Veterinary Journal**, 2010. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00288.x
- WANDERLEY, E. K.; BEM, B. S. C.; MELO, S. K. M.; GONZALEZ, J. C.; MANSO, H. E. C. C. C.; MANSO FILHO, H. C. Hematological and Biochemical Changes in Mangalarga Marchador Horses After a Four-Beat Gait Challenge in Three Different Distances. **Journal of Equine Veterinary Science (Print)**, p. 259-263, 2015.

- WARBURTON, D. E.; NICOL, C. W.; BREDIN, S. S. Health benefits of physical activity: the evidence. **Can. Med. Assoc. J.** v.174, p801-809, 2006.
- WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. Metabolismo e sistema energéticos básicos. In: _____. **Fisiologia do esporte e do exercício**. São Paulo: Editora Manole Ltda., 2001. cap.4, p. 116-154.
- WILLIAMS, C. A. Antioxidant supplementation and oxidative stress in the exercising horse. **Proceedings of the 2nd Mid-Atlantic Nutrition Conference**, p.195-205, 2004.
- ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. M.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, **Free Radical Biology**, 1999.

6. ARTIGOS CIENTÍFICOS

**6.1. ANTIOXIDANT AND HEMATOLOGICAL BIOMARKERS IN DIFFERENT
GROUPS OF HORSES SUPPLEMENTED WITH POLYUNSATURATED OIL AND
VITAMIN E**

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl.) 2016 Oct;100(5):852-9. doi: 10.1111/jpn.12456.

Epub 2016 Apr 14.

ANTIOXIDANT AND HEMATOLOGICAL BIOMARKERS IN DIFFERENT GROUPS OF HORSES SUPPLEMENTED WITH POLYUNSATURATED OIL AND VITAMIN E

*Stephânia Katurchi Mendes Mélo, Ana Isabela Alves Diniz, Valdelira Lima de Lira, Sandra Karoline de Oliveira Muniz, Girliane Regina da Silva, Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso, Hélio Cordeiro Manso Filho**

Equine Research Center & Laboratory of Applied Molecular Biology for Animal Production, Department of Animal Sciences, Rural Federal University of Pernambuco, Recife-PE

**corresponding author: hmanso@dz.ufrpe.br. Street Dom Manoel de Medeiros, SN, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco – PE. CEP: 52171-900. Tel: +55 (81) 3320.6103.*

Abstract

Oxidative stress has been correlated with pathologies that impair the performance of athlete horses. The aim of the present study was to assess the effects of supplementation with a mixture of polyunsaturated oil and vitamin E on the antioxidant and hematological biomarkers of horses. Horses under maintenance care (n=6) and horses in training (n=10) received 100mL and 300mL of the oil mixture, respectively. Supplementation was provided for a period of eight weeks, together with isocaloric inclusion. Blood samples were collected at three time periods (pre-test, after four weeks and after eight weeks) to analyze the following: the red blood cell count (RBCc); hemoglobin (Hb); hematocrit (HT); leukocytes; lymphocytes; platelets; the mean corpuscular volume (MCV); the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); the standard deviation of the red blood cell distribution width (RDW-SD); the coefficient of variation of the red blood cell distribution width (RDW-CV); Glutathione peroxidase (GPx); superoxide dismutase (SOD); uric acid (UrAc); total plasma proteins (TPP) and creatine kinase (CK). After the eight weeks of supplementation, animals under maintenance care exhibited significant increases in SOD, UrAc, the white blood cell count (WBCc), the RDW-SD and the RDW-CV (P<0.05). The animals in training exhibited increases in GPx, SOD and UrAc (P<0.05). In conclusion, supplementation with polyunsaturated oil and vitamin E increases blood antioxidants among animals under maintenance and in training, with different trends, while contributing to the fight against oxidative stress in each group analyzed.

Keywords: horse; exercise; oxidative stress; hematology

Introduction

There is widespread interest in understanding the use and effects of foods that are rich in antioxidants on horses under different management conditions. Oxidative stress is defined as the imbalance between oxidants and antioxidants, in favor of oxidants. This imbalance has been correlated with several factors, including the amount of training and competing athlete horses are involved in nowadays (main stressor), a lack of minerals and inflammatory processes (Jiménez et al., 2005).

The antioxidant system is composed of different enzymatic and non-enzymatic systems. Several publications have demonstrated that supplementation with antioxidant-rich foods (or creators of these compounds) helps increase blood antioxidant biomarkers. Enzymatic antioxidants include enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. The non-enzymatic system is formed by uric acid, ceruloplasmin and substances in the regular diet, such as omega 3, omega 6 and vitamin E (Schneider and Oliveira, 2004; Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). However, the presence of these compounds in foods and supplements does not guarantee that they will increase in the blood and tissues. Thus, it is important that studies assess how supplementation affects this balance in horses under different management conditions.

Supplementation with different concentrations of oils containing vitamin E, omega 3 and omega 6 has been addressed in several studies, which reported increases in the quantity of antioxidant biomarkers in the blood (Oliveira et al., 2002). Other studies have shown that the addition of oil rich in omega 3 and omega 6 to the diet of horses benefited several organic systems, including the immune system and physical resistance, both of which are important in the performance of athlete animals (King et al., 2008).

One of the models used to study the effects of antioxidant supplementation on the nourishment of horses involves the assessment of its influence on the constituents of the blood and biomarkers of oxidative stress among horses in distinct training and breeding systems (Silveira, 2005; Vázquez et al., 2006). However, it is important to understand the positive and negative effects of each new supplement that is developed, in order to ensure the most efficient and economic use possible. Therefore, the aim of the present study was to assess the effects of supplementation with a mixture of polyunsaturated oil, rich in omega 3, omega 6 and vitamin E, on the antioxidant and hematological biomarkers of horses in training and under maintenance care.

Material and Methods

Animals and management: Sixteen horses from two different activity groups were used. One of the groups contained animals under maintenance care (n=6; females, Arabians, ~380kg, ~14 years) and the other contained athlete animals (n=10; both genders, Mangalarga-Marchador, ~365kg, ~7 years). All of the procedures followed the animal use in experiments guidelines of the UFRPE (026/2013).

The group under maintenance care received Tifton 85 hay (~12.0Kg/day/animal, *Cynodon dactylon*) and concentrate (3.0Kg/day/animal, *Nutricol Alimentos LTDA*), which provided 50% of the energy indicated for animals under maintenance care (NRC, 2007) in individual boxes. The animals were put out to pasture during the day and only had access to the boxes for supplementation.

The other groups of horses trained three times a week for 60 minutes (~60% at four-beat marcha gait @ ~3.5 m/s) and spent the other days in dry-lots. These athlete animals were kept in individual boxes and fed with Elephant grass *in natura* (~15kg/day/animal; *Pennisetum purpureum*) and concentrate (6.0Kg/day/animal, *DuRancho Nutrição Animal*) three times a day, which provided 60% of the energy required by animals performing aerobic marcha training (NRC, 2007). All of the animals had free access to water and mineralized salt for horses.

Experimental Design: The horses under maintenance care and in marcha training received 100mL and 300mL, respectively, of a mixture of polyunsaturated oils plus vitamin E (Mega Energy, IntegralMix®; Table 1). They were supplemented by adding the product to the morning meal of concentrates for a period of eight weeks. The substitution of the energetic fraction of the concentrate was isoenergetic.

Blood Collection and Biomarker Analysis: Blood samples were taken from the jugular vein in both groups using pre-cooled vacuum tubes with sodium heparin and without anticoagulant. The samples were collected at three time periods: pre-test; after four weeks and after eight weeks of supplementation. All blood samples were collected during the morning, after the animals had rested for 24 hours and fasted for 12 hours. The samples were processed in a maximum of three hours after the collection. This processing was performed by technicians who had not been involved in the experimental development.

Heparinized samples were used to determine the red blood cell count (RBCc), hemoglobin (Hb), hematocrit (HT), white blood cell count (WBCc), lymphocytes (LYMPH)

and platelets (PLAT). In addition, the mean corpuscular volume (MCV), the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), the standard deviation of the red blood cell distribution width (RDW-SD) and the coefficient of variation of the red blood cell distribution width (RDW-CV) were calculated using a semi-automatic hematological analyzer (Sysmex pocH-100iVTM, Roche®). Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) were determined using commercial kits (Randox® - Ransel) and a semi-automatic biochemical analyzer (Doles D-250, Doles®). Total plasma proteins (TPP) were assessed using a manual refractometer. Serum samples were used to determine uric acid (UrAc) and creatine kinase (CK) using commercial kits (Doles®) and a semi-automatic analyzer (Doles D-250, Doles®).

Statistical Analysis: The results were submitted to ANOVA, with repeated measurements and one factor, and Tukey's test. In both cases, the P value was established at 5% and SigmaPlot® 13.0 software (SigmaPlot 13.0, Systat Software, Inc., USA) was used in the analysis. Results were expressed as mean +/- standard deviation.

Results and Discussion

The results confirmed that supplementation with a mixture of oils was capable of increasing the concentration of the biomarkers GPx, SOD and UrAc in both groups, although this increase occurred differently in each group. Animals under maintenance care exhibited elevated levels of SOD (~34%), when compared with the values observed in the pre-test assessment ($P < 0.05$). However, no modifications were found for GPx ($P > 0.05$) after eight weeks. There was also a significant increase in UrAc (~10%) after four weeks in this group, although these values returned to pre-test levels after eight weeks of supplementation. The WBCc was higher in the eighth week than in the fourth week ($P < 0.05$). However, the pre-test values and the values from the eighth week were similar ($P > 0.05$). The RDW-SD was higher after eight weeks of supplementation ($P < 0.05$), whereas the RDW-CV was higher in the fourth week than in the eighth week ($P < 0.05$). No significant differences were found for the other biomarkers analyzed (RBCc, Hb, HT, TPP, LYMPH, PLAT, MCV, MCHC and CK) in the maintenance group ($P > 0.05$) (Table 2).

Among the animals in training, SOD increased significantly (~35%) after eight weeks of supplementation. For GPx and UrAc, this increase had already been noted in the fourth week, remaining high until the eighth week, when compared with the pre-test values

($P < 0.05$). The increases in GPx and UrAc were 11% and 17%, respectively, at the end of the experimental period. The other parameters analyzed (RBCc, Hb, HT, TPP, WBCc, LYMPH, PLAT, MCV, MCHC, RDW-SD, RDW-CV and CK) did not exhibit modified concentrations due to the supplementation in the training group ($P > 0.05$) (Table 3).

It is important to note that no adverse reactions to the product occurred throughout the supplementation period and the animals in both groups consumed all of the concentrate with added oil. Table 4 displays the chemical-bromatological analysis performed on the concentrate given to the animals in both groups (maintenance and training).

The antioxidant capacity of horses can be estimated in several ways. Different methods can be used to quantify and detect the indication of chosen oxidation and the type of radicals generated to face the challenge. In the present study, it was shown that supplementation with a mixture of polyunsaturated oil, rich in omega 3, omega 6 and vitamin E, for a period of eight weeks increased the concentration of SOD in the blood of horses under maintenance care and the concentrations of GPx, SOD and UrAc among the horses in training. It was also notable that the concentration of SOD was higher among animals under maintenance care (approximately 25% higher than animals in training) after eight weeks, suggesting that exercise promotes a great imbalance in the free radical combat system, even among animals supplemented with antioxidant-rich products, as previously reported in studies of athlete horses (Moffarts et al., 2004; Weigel, 2014).

Antioxidants help combat oxidative stress and are important biomarkers for the health of animals, whether they are under maintenance care or performing physical exercise. SOD within the cells produces the “dismutation” of the free radical superoxide in a process that produces H_2O_2 and water. This process is responsible for the biotransformation of a highly reactive radical into an oxygen-reactive species with reactive power. In turn, GPx catalyzes the oxidation of reduced glutathione + H_2O_2 , forming oxidized glutathione and two molecules of water (Deaton and Marlin, 2003) and protecting red blood cells from oxidative damage by neutralizing hydroperoxides (Janiak et al., 2010). Based on these data, the supplementation performed in the present study could be significant in maintaining the health of animals under different conditions, including those under maintenance care, which are regularly subjected to stressful conditions related to the changing of the seasons and health challenges.

Several studies have shown that physical conditioning, with or without antioxidant supplementation, increases antioxidant defenses. Kirschvink et al. (2008) reported that

antioxidant supplements can be significant for athlete horses, although the nutritional program should be adequate, given that a deficiency or excess of nutrients may compromise the antioxidant capacity of the animal. Increased antioxidant activity of GPx, SOD and UrAc has been confirmed in the blood of animals in training (Moffarts et al., 2004). Avellini et al. (1999) recorded a significant increase in the GPx of horses after 70 days of training and supplementation (20ug/kg/day of selenium; 40mg/kg/day of vitamin E). However, increases of several antioxidants can occur within 24 hours of performing exercises, leading to conflicting results between experiments (Kirschvink et al., 2008) and discrepant results among researchers.

Weigel (2014) demonstrated that horses supplemented with oil-based diets (minerals, soy, linseed, fish and rice) did not exhibit differences in the concentrations of GPx and SOD in different treatment protocols (GPx: 231.63-346.33 UI/g; SOD: 1697.39-2125.54 U/g). In a study of Arabian horses submitted to exercise and supplementation (vitamin E), no differences were found between the control and supplemented groups in the pre-test (~1080.0UI/gHb) and post-test (~1280 UI/gHb) assessments of the control animals or in the pre-test (~1140 UI/gHb) and post-test (1300 UI/gHb) assessments of the supplemented animals (Machado, 2006). Note that in both studies, the SOD and GPx values were lower than those found in the present study. This is contrary to the research of Ono et al. (1989) (SOD ~2500 to 3600 UI/gHb), who reported similar concentrations in the maintenance group in the eighth week. The values recorded for the training group in the pre-test assessment were similar to those reported by Moffarts et al. (2005) (SOD ~1380 UI/gHb). Other studies of horses also found no positive effects on the SOD concentration related to exercise (Ono et al., 1990; Balogh et al., 2001) or supplementation with vitamin E (Ono et al., 1990).

Although it is known that physiological concentrations of reactive oxygen species are necessary for cellular function and exercise adaptation (Teixeira et al., 2009), the excessive production of these molecules has been proven to be dangerous for the tissues involved (Radak et al., 2008). During conditioning programs, micro-lesions are responsible for the adaptation of different tissues to physical exercise. When antioxidant production is elevated to the point that impedes regular micro-lesions, the capacity of the tissues to adapt can, theoretically, be reduced in athlete animals. Urso and Clarkson (2003) stated that a moderate increase in the production of free radicals, caused by exercise, is fundamental to muscle adaptation and conditioning, since the free radicals can function as indicators of this adaptation. Thus, the effects of supplements that are rich in antioxidant compounds must be

understood in order to be used scientifically (and inexpensively), without impairing the adaptations required during physical conditioning.

Uric acid (UrAc) is a product of the oxidation of xanthines in a purine metabolism. UrAc is an important non-enzymatic antioxidant and is found in plasma, in greater concentrations than vitamins C and E (Vasconcelos et al., 2007). In most tissues, UrAc takes the form of urate anion and has been shown to be effective in biological systems, protecting DNA and lipids (Larson, 1997). The maximum concentration of UrAc occurred after four and eight weeks of supplementation in the training group. No modifications were recorded between the pre-test assessment and the eighth week in the maintenance group. It is also noteworthy that the value recorded for uric acid was similar in both groups in the eight week. In the present study, the values found in both groups were lower than the normality values described by Kaneko et al. (2008) and Alves (2008).

UrAc should be regularly analyzed in athlete animals. In earlier studies involving different categories of exercise, UrAc increased during physical exercise and returned to its initial values after the recovery period (Castejón et al., 2006; Pereira et al., 2013). This increase during exercise causes the degradation of ATP and metabolites created by the degradation of purine-derived nucleotides (Castejón et al., 2006). This also occurs as a result of the primary reaction of antioxidant defense against the production of oxygen reactive species at the most intense moment of the exercise. As an antioxidant, UrAc should be assessed more adequately in athlete animals in order to adapt supplementation programs so that this biomarker produces beneficial adaptations.

However, it must be stressed that the volume of plasma modifies during exercise, with increases in hematocrit and TPP, indicating a certain degree of dehydration, which contributes to the increase of UrAc during exercise. Flaminio and Rush (1998) reported that TPP is the safest indicator of the level of dehydration. However, there was no variation in the TPP of animals under different types of management in the present study. The results were within the range of values that are considered normal for adult horses (Kaneko et al., 2008), indicating that the animals were adequately nourished to maintain the plasmatic levels of TPP in both groups, which must have had a slight effect on the concentration of UrAc.

The effects of supplementation with omega 3, omega 6 and vitamin E on hematological biomarkers remain unclear among athlete horses and those under maintenance care. In the present study, there were no variations in the RBCc, Hb, HT, LYMPH, MCV, PLAT and TPP in the two groups after eight weeks of supplementation ($P>0.05$). In a study

conducted by Godoi et al., (2009) with levels of 8.5% and 19.5% oil inclusion, an increase in the RBCc was recorded, suggesting an improvement in the hematological indices of horses that consumed the hyperlipidemic diet, These results are contrary to those recorded in the present study, in which the mean values of the RBCc, HT and Hb were normal for horses, according to the literature (Kaneko et al., 2008; Perry, 2009).

The assessment of the anisocytosis indices of red blood cells is important in the characterization of anemia in animals. This assessment is based on the MCV and the RDW, although the importance of the RDW has grown in recent years with the use of automatic equipment. In the present study, the MCV values in both groups did not modify significantly throughout the experimental phases. Interestingly, a significant alteration was recorded in the RDW-SD of the maintenance groups after eight weeks (~8.5%), whereas there was no change in the training group. It should be noted that the RDW-SD values in both groups were higher than those reported in the literature for riding horses in similar conditions (~34fL) (Melo et al., 2012). The present study did not take into account gender differences. The maintenance group only contained female animals whereas the exercise group contained males and females. However, no differences have been recorded between males and female riding horses in relation to the RDW-CV (~19%) (Melo et al., 2012). Similar results were reported by Balarin et al. (2001) among racehorses (RDW ~26%). Finally, it is important to note that the RDW indicates the mean size of red blood cells (Zhu et al., 2010), which, when combined with the MCV, can provide a satisfactory indicator of the anisocytosis indices.

It is worth noting that discrepant values for the RDW-SD and RDW-CV could be associated with the methods used by different laboratories and their equipment. These values need to be more adequately assessed in the different stages of a horses life. However, the increase in antioxidant compounds in the animals blood favors the greater protection of the cellular membranes of red blood cells, increasing their life span and allowing for possible increases in the RDW. It has also been suggested that supplementation with oils favors the production of new red blood cells by the bone marrow (Nascimento and Ferreira, 2003), which leads to the appearance of red blood cells of varying sizes. In the present study, despite the variations in the RDW-CV and RDW-SD of the animals under maintenance care, no variations were recorded for the MCV or MCHC in both groups, thereby demonstrating that the anisocytosis indices may have simply adapted to the new management system, without affecting the health of the animals.

The effects of supplementation with oil on the white blood cells of horses remain unclear. In a study of Mangalarga Marchador foals, supplemented with oil-rich concentrate (~20%), a reduction in the quantity of leukocytes was recorded (~14%), but none of the other hematological biomarkers were affected (Melo et al., 2012). Godoi et al. (2010) demonstrated that the incorporation of soy oil (10%) did not affect the quantity of leukocytes or neutrophils, although it significantly increased the quantity of lymphocytes. In the present study, there was an increase in the quantity of leukocytes in the maintenance group, but not in the training group. Despite these results, all values remained within the limits considered normal for the species studied throughout the experiment (Kaneko et al., 2008; Perry, 2009).

Creatine kinase (CK) is widely used to diagnose cardiac and muscular problems. Modifications in concentrations can be correlated with the level of physical training and muscular diseases (Piccione et al., 2007). The values recorded in both groups of the present study are similar to those described by Rose and Hodgson (1994) (100 – 300 U/L), although they were slightly higher among the animals under maintenance care. Cardinet (1997) stated that CK can vary in horses depending on factors such as physical activity, gender and age. However, an adequate training program does not lead to an accentuated increase in the concentration of muscle function enzymes (Da Cás et al., 2001). The training group performed exercises that are typical for running animals (Bem et al., 2013). Animals submitted to intense training patterns, with little recovery time, may exhibit elevated CK in the blood. In the present study, the blood samples were collected at least 24 hours after exercises and as such, elevated levels of CK were not expected in the experimental animals. The monitoring of this biomarker in different groups of horses could serve as a further indicator of the animals health condition.

Conclusion

Supplementation with a mixture of polyunsaturated oils and vitamin E increased the concentration of blood biomarkers in animals under maintenance and in training, thereby reducing the effects of oxidative stress. This helps combat reactive species of oxygen and protects animals (under maintenance care or in training) from the dangers of oxidative stress. This supplementation did not significantly affect the hematological biomarkers, although it did elevate one of the biomarkers of anisocytosis of red blood cells.

Financial Support: SKMM, AIS and GRS received grants from CAPES; Haras Cascatinha (Camaragibe-PE) and IntegralMix Animal Nutrition (Fortaleza-CE) provided financial and logistical support during a reassessment of the project.

References

- Alves, LMD; 2008: *Influência da idade e do sexo sobre o perfil bioquímico sérico de jumento da raça brasileira*. 38p. Tese (Mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica - UFU.
- Avellini, L; Chiaradia, E; Gaiti, A; 1999: Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 123(2), 147-154(8).
- Balogh, N; Gaál, T; Ribiczeyné, PS; Petri, Á; 2001: Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of Pentathlon horses before and after exercise. *Vet. Clin. Pathol., Santa Bárbara*, 30(4), 214-218.
- Bem, BSC; Melo, AFL; Wanderley, EK; Manso, HECCC; Manso Filho, HC; Abreu, JMG; 2013: Características do condicionamento físico aplicado ao cavalo Mangalarga Marchador em Pernambuco. *Revista Brasileira de Medicina Equina* 8, 16-20.
- Castejón, F; Trigo, P; Muñoz, A; Riber, C; 2006: Uric acid responses to endurance racing and relationships with performance, plasma biochemistry and metabolic alterations. *Equine Veterinary Journal* 36, 70-73.
- Balarin, MRS; Fonteque, JH; Souza, C; Saito, ME; Kohayagawa, A; Lopes, RS; 2011: Valores da amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW – Red Cell Distribution Width) em equinos da raça puro sangue inglês (PSI) de ambos os sexos de 12 a 24 meses de idade. *Semina: Ciência Agraria* 22(2), 135-137.
- Cardinet, GH; 1997: Skeletal muscle function. In: Kaneko, JJ; Harvey, JW; Bruss, ML. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 5th ed. London: Academic Press, 407-440.
- Da Cás, EL; Brass, KE; Greig, CR; Deprá, NM; Silva, CAM; 2001: Concentrações de creatino quinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica em potros do nascimento até os seis meses de idade. *Ciência Rural* 31, 1003-1006.

- Deaton CM; Marlin DJ; 2003: Exercise-associated oxidative stress. *Clin. Tech. Equine Pract.* 2(3), 278-291.
- Flamínio, MJB; Rush, BR; 1998: Fluid and electrolyte balance in endurance horses. *The Veterinary Clinics North America. Equine Practice*, Philadelphia, 14, 147-158.
- Godoi, FN; Almeida, FQ; Guarienti, GA; Santiago, JM; Junior, DG; Nogueira, YC; Brasileiro, LS; 2009: Perfil hematológico e características das fezes de equinos consumindo dietas hiperlipidêmicas. *Ciência Rural* 39(9), 110-120.
- Janiak, M; Suska, M; Dudzinska, W; Skotnicka, E; 2010: Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94(2), 137-145.
- Jiménez, MH; Cerrilla, MEO; Peralta, MC; Haro, JGH; Díaz-cruz, A; Perrusquía, RG; 2005: Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *INCI* 30(12), 728-734.
- Kaneko, JJ; Harvey, JW; Bruss, ML, 2008: *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th Ed. San Diego: Academic Press, 928 p.
- King, SS; Abughazaleh, AA; Webel, SK; Jones, KL; 2008: Circulating fatty acid profile in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. *Journal Animal Science* 86(5), 1114-23.
- Kirschvink, N; Moffarts, B; Lekeux, P. 2008: The oxidante/antioxidante equilibrium in horses. *The veterinary Journal*, 177, 178-191.
- Larson, RA; 1997: *Naturally Occurring Antioxidants*. Lewis Publishers, New York, 84-105.
- Lykkesfeldt, J; Svendsen, Ó; 2007: Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal* 173(3), 502-11.
- Machado, LP; 2006: *Eritrograma, glutathiona reduzida e superóxido dismutase eritrocitários e metahemoglobina em equinos da raça árabe submetidos a exercício em esteira. Efeito da suplementação com vitamina e (dl-alfa-tocoferol)*. 99p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina e Zootecnia de Botucatu – UNESP.
- Melo, SKM; Vaz, SG; Manso, ECC; Hunka, MM; Martins, IDS; Manso, HECCC; Manso Filho, HC; 2012: Influência da suplementação com concentrado extrusado rico em óleo

nos parâmetros hematológicos, biométricos e biomarcadores na digestão de potros. *Medicina Veterinária (UFRPE)* 6, 41-45.

Moffarts, B; Kirschvink, N; Art, T; Pincemail, J; Michaux, C; Cayeux, K; Defraigne, JO; Lekeux, P; 2005: Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 1, 211-220.

Moffarts, B; Kirschvink, N; Art, T; Pincemail, J; Lekeux, P; 2005: Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained Thoroughbred horses. *Veterinary Journal* 169(1), 65-74.

Nascimento, MLP; Ferreira, FC; 2013: *Por que na relação entre a concentração de hemoglobina globular média e a contagem de hemácias a avaliação do RDW-SD é importante?* NewsLab, São Paulo, 61, 94-104.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 2007: Nutrient requirements of horses. 6.ed. Rev. Washington, D.C.: National Academies. 360p.

Oliveira, MN; Sivieri, K; Alegro, JHA; Saad, SMI, 2002: Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Bras. de Ciên. Farmacêuticas*, 38(1), 1-21.

Ono, K; Inui, K; Hasegawa, T; Watanabe, H; Takagi, S; Hasegawa, A; Tomoda, I; 1989: Superóxido dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in equine erythrocytes. *Jpn J. Vet. Sci., Tokyo* 51(3), 656-658.

Ono, K; Inui, K; Hasegawa, T; Matsuki, N; Watanabe, H; Takagi, S; Hasegawa, A; Tomoda, I; 1990: The changes of antioxidative enzyme activities in equine erythrocytes following exercise. *Jpn. J. Vet. Sci., Tokyo*, 52(4), 759-765.

Perry, BW, 2009: Clinical Pathology references data. IN: Robinson, NE; Spraberry, KA. *Current Therapy in Equine Medicine*. Filadelfia: Saunders, 6th ed., p.956-980.

Pereira, AT; Pozzobon, R; Kunz, AR; 2013: Avaliação das concentrações de triglicérides e de ácido úrico em cavalos crioulos de rodeio dados preliminares. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 5(2).

Piccione, G; Giannetto, C; Fazio, F; Di Mauro, S; Caola, G; 2007: Haematological response to different workload in jumper horses. *Bulgarian Jour of Veter Medicine* 10(4), 21-28.

- Radak, Z; Chung, HY; Goto, S; 2008: Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biol Med* 44(2), 153-159.
- Rose, RJ; Hodgson, DR; 1994: An overview of performance and sport medicine. In: Hodgson, DR; Rose, RJ. *The athletic horse*. Philadelphia: W.B. Saunders, p.511.
- Sampaio, IBM; 2007: *Estatística Aplicada à experimentação animal*. 3.ed. Belo Horizonte: Editora FEPMVZ – Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia.
- Schneider, CD; Oliveira, AR; 2004: Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismo de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revi. Bras. Med. do Esport* 10(4), 303-313.
- Silveira, VF; 2005: *Malondialdeído, vitamina E, cortisol, hemograma e enzimas musculares em equinos da raça Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade*. 92f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Teixeira, VH; Valente, HF; Casal, SI; Marques, AM; Moreira, PA; 2009: Antioxidants do not prevent postexercise peroxidation and may delay muscle recovery. *Medicine Sci Sports Exerc* 41(9), 1752-1760.
- Vasconcelos, SML; Goulart, MOF; Moura, JBF; Manfredini, V; Benfato, MS; 2007: Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quími. Nova* 30(5), 1323-38.
- Vázquez, MR; El-Bachá, RS; Ordás, CA; Ribeiro, EB; Vicente, JGV; Rodrigues, LEA; 2006: Dieta afro-bahiana, estrés oxidativo y ejercicio físico. *Rev. de Nutrição*, Campinas, 19(6), 673-683.
- Weigel, RA; 2014: *Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e função de polimorfonucleares em equinos alimentados com óleo mineral, de soja, de arroz, de linhaça ou peixe*. 57p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina e Zootecnia de Botucatu – USP.
- Urso, ML; Clarkson, PM; 2003: Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, Bethesda, 189(1), 41-54.
- Zhu, A; Kaneshiro, M; Kaunitz, JD; 2010: Evaluation and Treatment of Iron Deficiency Anemia: A Gastroenterological Perspective. *Dig.Dis. Sci* 55, 548-559.

Table 1 – Assurance level of the mix of oils used in both experimental groups during the experiment, according to the manufacturer.

Humidity (max.)	10.0g
Digestible Energy (min.)	8500.0Kcal
Ethereal Extract (min.)	980.0g
Polyunsaturated Fatty Acids (min.)	520.0g
Omega 3 (min.)	300.0g
Linolenic Fatty Acid (min.)	80.0g
Gamma oryzanol (min.)	500.0 mg
Peroxide Index (max.)	20 mEq
Free acidity in Oleic Acid (max.)	20.0g
Vitamin E (min.)	300.0UI

*Results expressed per kilogram of product.

Table 2 – Variation in the antioxidant and hematological biomarkers of horses under maintenance and supplemented with a mix of oils, rich in omega 3, omega 6 and vitamin E, for 8 weeks.

Biomarker	Phase of the Experiment		
	Pre-test	+4 weeks	+8 weeks
Glutathione peroxidase (UI/g Hb)	328.37±10.29	367.35±16.89	336.53±14.86
Superoxide dismutase (UI/g Hb)	1983.05±140.84 ^B	1857.15±69.19 ^B	2476.28±154.46 ^A
Uric acid (mg/dL)	0.21±0.02 ^B	0.23±0.07 ^A	0.21±0.02 ^B
Red blood cell count (x10 ⁶ /UL)	7.67±0.19	7.81±0.65	7.04±0.21
Hemoglobin (g/dL)	11.90±0.35	10.92±0.39	10.87±0.39
Hematocrit (%)	35.12±0.92	32.23±1.07	32.20±1.25
Total plasma proteins (g/dL)	6.86±0.06	6.93±0.14	6.65±0.12
White blood cell count (x10 ³ /UL)	8.18±0.45 ^{AB}	7.51±0.50 ^B	9.23±0.31 ^A
Lymphocytes (%)	31.51±4.45	31.58±3.93	28.51±2.58
Platelets (x10 ³ /UL)	141.2±15.80	156.66±13.26	114.25±29.57
MCV (fL)	45.76±0.55	45.16±0.67	45.71±0.78
MCHC (g/dL)	33.85±0.22	33.85±0.16	33.75±0.25
RDW-SD (fL)	34.95±0.31 ^B	36.25±0.47 ^B	37.96±0.51 ^A
RDW-CV (%)	18.76±0.17 ^B	19.97±0.17 ^A	20.56±0.29 ^A
Creatine kinase (UI/L)	173.68±20.49	178.80±22.40	218.38±21.22

*Different letters on the same line indicate P<0.05 in Tukey's test. RDW-SD: standard deviation of the red blood cell distribution width; RDW – CV: Coefficient of variation of the red blood cell distribution width.

Table 3 – Variation in the antioxidant and hematological biomarkers of horses in marcha training supplemented with a mix of oils, rich in omega 3, omega 6 and vitamin E, for 8 weeks.

Biomarker	Phase of the Experiment		
	Pre-test	+4 weeks	+8 weeks
Glutathione peroxidase (UI/g Hb)	322.58±5.06 ^B	346.23±7.72 ^A	361.73±6.37 ^A
Superoxide dismutase (UI/g Hb)	1335.37±71.74	1550.64±94.61 ^B	2022.97±83.42 ^A
Uric acid (mg/dL)	0.18±0.02 ^B	0.22±0.04 ^A	0.22±0.01 ^A
Red blood cell count (x10 ⁶ /UL)	9.42±0.41	8.68±0.38	8.60±0.35
Hemoglobin (g/dL)	12.94±1.21	13.23±0.37	13.52±0.39
Hematocrit (%)	42.13±1.39	39.14±1.34	39.54±1.29
Total plasma proteins (g/dL)	6.54±0.10	6.64±0.10	6.74±0.08
White blood cell count (x10 ³ /UL)	10.08±0.57	10.28±0.51	10.21±0.67
Lymphocytes (%)	46.72±2.17	46.07±2.33	44.61±2.76
Platelets (x10 ³ /UL)	120.2±8.9	116.9±9.11	123.5±16.35
MCV (fL)	44.67±0.69	45.27±0.64	44.21±0.53
MCHC (g/dL)	33.37±0.24	33.86±0.27	34.08±0.28
RDW-SD (fL)	36.69±0.29	37.26±0.37	37.44±0.38
RDW-CV (%)	20.60±0.34	20.45±0.30	20.41±0.40
Creatine kinase (UI/L)	167.89±16.39	178.16±15.94	196.14±16.64

*Different letters on the same line indicate P<0.05 in Tukey's test. RDW-SD: standard deviation of the red blood cell distribution width; RDW – CV: Coefficient of variation of the red blood cell distribution width.

Table 4 – Result of the chemical-bromatological analysis of the concentrate provided for the animals under maintenance care (concentrate A) and in training (concentrate B) during the entire experiment and their respective assurance levels.

Parameters	Concentrate A		Concentrate B	
	Assurance Level (%)	Bromatological Analysis	Assurance Level (%)	Bromatological Analysis
Dry Matter	-	88.39	-	87.66
Crude Protein	15.0(min)	16.24	13.0 g (min)	18.22
Ethereal Extract	8.0 (min)	1.13	3.0 g (min)	3.37
Crude Fiber	25.0 (max)		13.0 g (max)	
Acid Detergent Fiber		21.94		10.24
Neutral Detergent Fiber	-	50.32	-	31.56
Crude Energy (Mcal/kg)	-	3.6	-	4.1

*Results expressed as a percentage of the dry matter.

**6.2. MARCHA GAIT SIMULATION TEST DECREASE ANTIOXIDATIVE
BIOMARKERS IN FOUR-BEAT GAITED HORSES**

MARCHA GAIT SIMULATION TEST DECREASE ANTIOXIDATIVE BIOMARKERS IN FOUR-BEAT GAITED HORSES

Stephânia Katurchi Mendes Mélo¹, Lucia Maia Cavalcanti Ferreira¹, Mônica Miranda Hunka¹, Bruno de Lima Barbosa¹, José Mário Girão Abreu², Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso¹, Hélio Cordeiro Manso Filho^{1*}

1- Equine Research Center & Laboratory of Applied Molecular Biology for Animal Production, Department of Animal Sciences, Rural Federal University of Pernambuco, Recife-PE; 2 - Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza

*Corresponding author: helio.mansofo@ufrpe.br; Telephone: +55 (81) 33206103
Rua Dom Manoel de Medeiros, SN, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco – PE. CEP: 52171-900

Abstract

The aim of the present study was to characterize the modification of anti-oxidative biomarkers, as well as hematological and protein metabolism biomarkers, in four-beat gaited horses after the marcha gait simulation test (MST). Twelve adult Mangalarga Marchador horses were submitted to the MST and blood samples were taken at four time points: pre-test/fasting; immediately after the MST; 15 and 120 minutes after the MST. The following measurements were taken: RBC's, Hb, HT, WBC's, LYMPH, PLAT, MCV, MCHC, RDW-SD, RDW-CV, GPX, SOD, TPP, AcUr, URE, CREAT and ALB. The results were analyzed using ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$). The results confirmed reductions in GPX and SOD ($P < 0.05$) and increases in AcUr, TPP, ALB, URE, CREAT, CGV, HT, Hb, CGB, LYMPH, PLAT, MCV and RDW-SD ($P < 0.05$) immediately after the MST. Lymphocytes reduced after the 120-minute recovery period ($P < 0.05$). In conclusion, the MST significantly decreased the anti-oxidative biomarkers, immediately after the MST, and produced changes in protein and hematological biomarkers. These results are important for this group of athlete animals, who may participate frequently in competitions with short intervals between gait tests.

Keywords: horses; oxidative stress; lymphocytes; dehydration; exercise

Introduction

Exercise and regular training are associated with increase in reactive oxygen species and these metabolites have correlation with muscle fatigue and, sometimes, important inflammation and damage in different tissues [1]. Also, the physical conditioning produced physiological and metabolic adaptations, favoring the contribution of energy compounds and protectors of several cellular functions, including those that combat oxidative stress. Therefore, an understanding of the adaptive processes that are active during physical activity is important in order to assess clinical condition, performance and, especially, the recovery of athlete horses after training and competitions [2]. Regular assessments of these biomarkers could improve our knowledge about physical exercise and the horse's performance, while also preventing illnesses, thereby favoring the wellbeing of athlete horses throughout their sporting lives.

Marcha gait is natural, dissociated, four-stroke walking, during which the rider maneuvers the animal with stability and comfort, and is characteristic of certain breeds around the world [3]. In Brazil, marcha gait can be classified as *batida*, *picada* or *centro*, none of which involve suspension, and can be known by other names in different horse-breeding areas. Several studies have shown that marcha gait is an aerobic exercise of low- to medium-intensity and long-duration, in which horses usually move at a mean speed of 3.0 to 4.0 m/s, with a mean heart rate of approximately 140 bpm in the marcha gait phase [4, 5]. This type of movement is greatly appreciated in different parts of the world, although as yet, no studies have demonstrated how oxidative stress (OxS) biomarkers adapt to gait exercises in these breeds.

In recent years, researchers have realized the importance of understanding the effects of physical exercise and the regulation of OxS on athlete horses. Several publications have shown that physical exercise, in different equine disciplines, can favor the oxidative process in detriment to the anti-oxidative process, thereby enabling the production of free radicals, which have been correlated with the pathophysiology of several equine diseases [6, 7, 8] and may contribute to increase the time to recovery. These OxS-related injuries can occur when there is an imbalance between the increase in the production of free radicals and/or the low production of antioxidant cellular systems, which fail to control and eliminate these substances. This imbalance is known as oxidative stress [9].

The four-beat gaited breeds are found all around the world and their gaits have different names. With the discovery of the DMRT3 gene, which is correlated with the way

how the limbs do association during movement [3], it became clear that a better awareness of metabolic and oxidative stress biomarkers would be important in order to understand the expression of this gene and the performance of animals during progressive and dissociated gait. Very little information exists that correlates possible alterations in antioxidant, protein and hematological metabolism biomarkers during the typical development of aerobic exercise among four-beat gaited horses. Therefore, the aim of the present study was to characterize the adaptations of oxidative stress, hematological and protein metabolism biomarkers in four-beat gaited horses after a marcha gait simulation test. These data will contribute to the development of feeding and supplementary programs that seek to recover anti-oxidative capacity, thereby improving the animals performance and contributing to the wellbeing of this group of athletes.

Material and methods

Animals and management systems: 12 Mangalarga Marchador horses (7 male; 5 female), with a mean age of 6.0 ± 1.5 years and a mean weight of 423.0 ± 17.0 kg, were used in the present study. All of the animals were from the same training center and received the similar nutritional provisions, with ~ 6.0 kg/day/animal of concentrate (16% protein; 4% fat; 12% crude fiber; 2.3 Mcal DE/kg), plus ~ 16.0 kg/day/animal of fresh elephant grass (*Pennisetum purpureum*). These nutritional provisions were in line with exercises classified as medium-intensity and medium-duration [10]. The animals also had access to fresh water and mineralized salt *ad libitum*. The animals trained three days per week for 60 minutes ($\sim 60\%$ marcha gait @ ~ 3.5 m/s). On the other four days of the week, the animals were released into a “dry-lot” (0.5 hectares) for approximately eight hours per day, with the rest of the day spent in individual boxes (4x4m). Prior to the marcha gait simulation test (MST), each horse rested for, at least, two days.

All of the horses were submitted to the MST individually in the morning, between 7 and 10 AM, after 12 hours of fasting, as previously described in the literature [5]. The test involves 10 minutes at walk, followed by 30 minutes of marcha gait, and a recovery at walk of 15 minutes, while mounted, all of which was conducted on a competition circuit of firm sand. The horses that took part were not fed with concentrate or forage until two hours after the MST, although they did have free access to fresh water and mineralized salt. All of the procedures used in the present study were in accordance with the animal care directives of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE/CEUA #026/2013).

Blood collection and biomarker analysis: blood samples were collected from the jugular vein into pre-cooled vacum tubes with sodium heparin and without anticoagulant, at four time periods: pre-test/fasting, immediately after the MST, and 15 and 120 minutes after the MST. Samples from the tube containing sodium heparin were used to measure the red blood cell (RBC) count, hemoglobin (Hb), hematocrit (HT), leucocytes (LEUC), lymphocytes (LYMPH), platelets (PLAT), the mean corpuscular volume (MCV), the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), the standard deviation of red cell distribution width (RDW-SD) and the coefficient of variation of red cell distribution width (RDW-CV). These measurements were taken using a veterinary hematological analyzer (Sysmex pocH-100iVTM, Roche®). The concentrations of glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) were determined using commercial kits (Randox® - Ransel) and a semi-automatic biochemical analyzer (Doles D-250, Doles®). Total plasma proteins (TPP) were determined using refractometry.

The sample without anticoagulant was centrifuged (3000 rotations per minute for five minutes) to obtain the serum, which was then used to measure uric acid (AcUr), urea (URE), creatinine (CREAT) and albumin (ALB), together with commercial kits (Doles®) and a semi-automatic biochemical analyzer (Doles D-250, Doles®). All of the samples were analyzed on the same day as the blood collections and all samples were analyzed in duplicate. The coefficients of variation (inter-trial and intra-trial) for all of the parameters were under 10%.

Statistical analysis: the results were submitted to analysis of variance (ANOVA) for repeated measures with one factor. Tukey's test was used as a post-hoc test to compare the mean values. In both cases, the *p* value was set at 5%. SigmaPlot® 13.0 (SigmaPlot 13.0, Systat Software, Inc., USA) software was used for all of the statistical analyses and the results were expressed as mean +/- standard deviation values.

Results

The results showed that the MST can reduce antioxidant protection in four-beat gaited horses immediately after the test. In the present study, GPX and SOD decreased immediately after the MST ($P < 0.05$) and returned to pre-test values within 120 minutes after

the test ($P>0.05$). In contrast, the Uric acid also increased after the MST, when compared with pre-test values ($P<0.05$), and TPP and ALB increased after the MST ($P<0.05$), with the highest concentration of both recorded immediately after the MST and the lowest concentration recorded prior to the test. TPP remained high after the 120-minute recovery period, when compared with the pre-test values ($P<0.05$). Urea only increased 120 minutes after the MST ($P<0.05$). Creatinine increased significantly after the MST, when compared with the pre-test values ($P<0.05$) (Table 1).

Analysis of the hematological biomarkers showed that they all increased immediately after the MST ($P<0.05$) and then decreased gradually, but remained higher than the pre-test values after the 120-minute recovery period. WBC's and PLAT values increased significantly after the MST ($P<0.05$), with the highest values recorded 120 minutes after the MST and reduced values recorded 15 minutes after the MST. Lymphocytes increased significantly immediately after the MST ($P<0.05$) and reduced significantly 120 minutes after the MST, when compared with the pre-test values. MCHC and RDW-CV values did not change during the experiment ($P>0.05$) (Table 2).

All of the animals completed the MST without exhibiting signs of fatigue, lameness or any other illness correlated with the MST in the three days after the test had been completed. The mean velocity of the animals was ~ 3.28 m/s and the combined load (rider and harness) was ~ 91.0 kg. The climate was stable during the days of testing, with mean temperatures of $\sim 29^\circ$ C and mean relative humidity levels of 60 to 80%.

Discussion

In the present study, the effects of the MST on superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) concentration were demonstrated and showed that these biomarkers were reduced immediately after the MST ($P<0.05$) (GPx $\sim 11\%$ and SOD $\sim 26\%$), and returned to pre-test values within 120 minutes after the test. Therefore, among four-beat gaited horses, aerobic exercise was able to modify the concentration of important antioxidant biomarkers, such as SOD and GPX, even with decrease in plasma volume by increases in RBC's, HT and TPP immediately after the MST. These findings could be significant for this group of animals, given that they may perform marcha gait challenges at intervals of less than 24 hours during competitions.

Exercise is a powerful stimulus for the production of reactive oxygen species (ROS). In high quantities, these ROS can be associated with exercise intolerance among the animals, as well as horses poor performance in competitions [1, 11], which in turn lead to early fatigue and delay in recovery. SOD is an essential enzyme for the survival of erythrocytes [12] and GPX is an enzyme that, together with other antioxidant substances, participates in the transformation of ROS, playing a vital role in antioxidant cellular defense (hydro-soluble phase) in different tissues [13]. However, there is no information about possible modification of these biomarkers in four-beat gaited horses submitted to their typical challenges, despite of the importance of this horse's group for the equine industry in different countries. However, in endurance horses, which do typical aerobic exercise, occur elevated demand for antioxidants and a large decrease in blood glutathione and vitamin C during competitions, and supplementation with oil rich in antioxidant products are frequently in this equine discipline [14].

Different experiments have shown that exercise with certain foods, principally oils with elevated concentration in omega 3 and 6, favor modifications in the concentrations of SOD and GPX. Recently it was shown in four-beat gaited horses, which were under typical training protocol and supplemented with blend of oil, rich in omega 3 and 6 plus vitamin E, had a increase SOD (~51%) and in GPX (~12%) concentrations [15]. Also, a study conducted with different breeds of athlete horses, where made comparisons before and after moderately-intense exercise, found interesting results associated with antioxidant biomarkers, where in the Ukrainian riding horses, there was a significant increase in SOD and GPX (~ 12.7 and 17.19 U.ml⁻¹ and 0.84 and 0.88 μmol.min⁻¹ml⁻¹, respectively), but in the Holsteins horses a significant increase in SOD was recorded (16.39 and 26.88 U.ml⁻¹), whereas GPX was significantly reduced (2.69 and 1.70 μmol.min⁻¹ml⁻¹), indicating that oxidative stress directly depends on the characteristic of the exercise and their effects over different tissue [16, 14]. Moreover, in racehorses and pentathlon horses it was demonstrated significant decreased in the antioxidant biomarkers that reduced OxS [17, 18]. In the present study, the concentrations of SOD and GPX immediately reduced by ~26% and ~11%, respectively, demonstrating that marcha gait is capable of increasing the consumption or reduce the production of these important biomarkers in this group of horses in South America, similarly what was observed in endurance horses [14].

In contrast, other studies have shown that exercise does not affect the variations in oxidative stress biomarkers in athletic horses. In endurance horses, to assess GPX before and

after 80km, it was found no significant differences between the collections (33 ± 5 mU/mg and 39 ± 7 mU/mg, respectively) [6]. Also, another study of endurance horses confirmed no significant variations in GPX levels after 80 km, with variations of ~ 43 and ~ 53 mol.mg⁻¹.Hb⁻¹.min⁻¹, before and after 80km, respectively [19], and in racehorses submitted to a treadmill test and a racetrack test, finding no significant differences between the different types of exercise for GPX and SOD [11]. Nevertheless, resistance exercises, like endurance and marcha challenges [4, 14, 20], tend to cause a high loss of water, which in turn increases the concentration of the blood parameters during the ride and in the recovery phase, possibly hiding certain modification of these biomarkers. In actual study, the MST also produced an increase in hematocrit (HT) and the concentrations of total plasma proteins (TPP), causing a reduction in the plasma volume, which produce increase in some biomarkers analyzed here.

Uric acid is a product of the oxidation of xanthines, in the purine metabolism, and is an important non-enzymatic antioxidant, which is found in greater quantities in plasma than antioxidant vitamins C and E [21]. In the present study, significant alterations were found in the different phases of the MST, which contribute to elevate the general anti-oxidative capacity of marcha horses. Like in the present study, previous research of different equestrian disciplines has highlighted an increase in AcUr during physical exercise, which returns to normal after a period of rest [22, 23], which is important to the animals' recovery. This increase during exercise is caused by the degradation of ATP and the primary reaction of the antioxidant defense against the production of oxygen reactive species at the time of the most intense exercise [23]. This result was expected, and could reflect the satisfactory level of conditioning of the animals and the breeding system used, with fresh forage and rest periods in the dry-lots. Also, it is important observe that uric acid concentration found here, in all phases of the MST, were lower than those described in the literature [20, 24, 25], but the level of exercise and the nutritional differences may have influence in these concentration.

The hematocrit (HT), and concentrations of total plasma proteins (TPP) and albumin (ALB), when combined should be used to assess the level of hydration in practical conditions. Therefore, when electrolytes and fluids from the vascular compartment are redistributed to extracellular areas, ALB and TPP may increase significantly [26]. In the present MST, the concentration of TPP rose in the final stages and remained high until 120 minutes after the test, despite the fact that the animals had free access to fresh water and mineral salt. Other studies of marcha gait horses have also noted that this dehydration continues until more than four hours after the end of the MST [4, 27]. In the present study, the TPP and ALB values for

the resting and fasting animals were considered normal for adult horses and similar to other studies with marcha gait horses [4, 24, 27, 28], given that the animals that participated in this research were healthy and in good athletic condition. The recovery of water balance in this group of animals, apparently, was slow, which could have an impact when the animals perform successive competitions over the course of a day and these process may contribute to increase the OxS during recovery period, like occur in endurance horses.

During exercise, there may be an increase in the metabolism of proteins by muscle degradation and consequent modifications in the concentrations of urea (UREA) and creatinine (CREAT). In the present study, the concentration of urea increased 120 minutes after the MST, which may be the result of some protein degradation in skeletal muscle during and after exercise, corroborating earlier studies that have demonstrated modifications in the protein metabolism of this tissue in horses, as well as the slow recovery of the plasma volume and water balance [4, 27, 28]. In addition, modifications in the concentrations of UREA and CREAT may be caused by the hepatic metabolization of nitrogenous compounds and could be an indicator of the use of gluconeogenesis as an alternative energy production route. It was previously demonstrated the significant consumption of free glutamine during the recovery period of marcha gait horses [27]. Glutamine and Alanine are largely produced and released by skeletal muscle during exercise and contribute to energetic metabolism [27, 29]. Also, a study of endurance horses, who typically perform aerobic exercises, confirmed increases in creatinine [30]. However, the values reported in all phases for UREA and CREAT here were similar of the normal range for horses [24].

Physical exercise causes variations in plasma volume and the release of cortisol, leading to modifications in hematological biomarkers. In the present study, RBC's, HT, Hb, MCV, PLAQ and RDW-SD increased immediately after the MST, as previously reported in similar experiments [4, 20, 27, 28]. In horses, splenic contraction is also responsible for this increase, given that the globular volume can increase by as much as 40% due to the combination of this factor and the redistribution of the circulating volume, thereby increasing arterial blood pressure [1, 31]. An increase in the globular volume stabilizes the concentration of blood oxygen during intense exercise and increases the concentration of hemoglobin after the exercise [32]. This process is important in athlete horses, since it carries oxygen to the tissues and helps to remove the compounds formed, including urea and creatinine.

Analysis of the white blood cells of athlete horses is important in order to determine their stress levels and the response of lymphocytes to exercise. Several authors have noted an

ideal ratio, around 1.5:1, between neutrophils and lymphocytes in horses [2] and have suggested that imbalances in this ratio could be linked to overtraining [2, 31]. In the present study, a greater neutrophils:lymphocyte ratio was recorded (2:1) at rest, which decreased after the MST, and these results may indicate that the animals adapted to the marcha exercise. Analysis of white blood cell in the present study showed that there was a transitory increase of leucocytes and a decrease of lymphocytes after exercise and were similar to other studies [32, 33]. Also, earlier studies of horses that performed different exercise challenges have shown that lymphocytes concentration is reduced during the recovery phase [20, 34], and may have association with reduction of the anti-oxidative biomarkers in these cells, but these aspect need more attention in marcha gait horses.

The MCV and RDW values in horses are important when seeking to identify possible modifications in erythropoiesis. The MCV is the parameter that is most commonly used to classify anemia and assess the response of the bone marrow, although a great number of erythrocytes must be modified to modify the MCV [35]. In the present study, the MCV was high and directly correlated with the increases in RBC's and HT, although it still remained within the normal values for the species, as previously described by [24]. The RDW-SD is the standard deviation of the distribution curve of erythrocytes and this index is a direct measurement of the distribution curve of erythrocytes. In the present study, a significant difference was found immediately after the MST, remaining closer to the values found among the resting and fasting animals, similarly to MCV. The values found in all phases were higher than those reported by [36] and corroborate the findings of [37], who reported an increase in the size of the erythrocytes and attributed it to the liberation of cells by the spleen. Another biomarker for the mean size of the erythrocytes is RDW-CV [38] and in the present study there was no statistically significant differences for it, and their concentration were similar to those reported for four-beat gaited horses [25]. Finally, RDW-SD and MVC had similar modifications, which was expected because both biomarkers reflected the similar type of evaluation of the red blood cells.

Conclusion

In the present study, there was a significant reduction in the anti-oxidante biomarkers (GPX and SOD) in the initial recovery phase of the MST, followed a small elevation in uric acid concentration. Although the concentrations of these biomarkers returned to pre-test levels after 120 minutes, accompanied by a reduction of the plasma value produced by increase in

RBC's, HT and TPP. The variations in the anti-oxidante biomarkers were accompanied by a significant reduction in lymphocytes concentration and an increase in leucocytes during recovery period, which has importance to understand the effects of the marcha gait during recovery of the post-MST in four-beat horses.

References

- [1] Art T, Lekeux P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. *Livestock Production Science* 2005, 92:101-111.
- [2] Rose RJ, Hodgson DR. An overview of performance and sport medicine. In: Hodgson DR, Rose RJ. *The athletic horse*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994;p.511.
- [3] Promerová M, Andersson LS, Juras R, Penedo MC, Reissmann M, Tozaki T, Bellone R, Dunner S, Hořín P, Imsland F, Imsland P, Mikko S, Modrý D, Roed KH, Schwochow D, Vega-Pla JL, Mehraba-Ni-Yeganeh H, Yousefi-Mashouf N, Cothran GE, Lindgren G, Andersson L. Worldwide frequency distribution of the 'Gait keeper' mutation in the DMRT3 gene. *Anim Genet* 2014; 45(2):274-282.
- [4] Silva FS, Melo SKM, Manso HECCC, Abreu JMG, Manso Filho HC. Hematological and Biochemical Changes in Mangalarga Marchador Horses After a Four-Beat Gait Challenge in Three Different Distances. *Comp Exerc Physiol* 2014;10(2):105-111.
- [5] Manso Filho HC, Manso HECCC, McKeever KH, Duarte SRR, Abreu JMG. Heart rate responses of two breeds of four-gaited horses to a standardised field gaited test. *Comp Exerc Physiol* 2012;8(1):41-46.
- [6] Hargreaves BJ, Kronfeld DS, Waldron JN, Lopes MA, Gay LS, Saker KE, Cooper WL, Sklan DJ, Harris PA. Antioxidant Status of Horses during Two 80-km Endurance Races. *J Nut* 2002; 132:1781S-1783S.
- [7] Williams CA, Kronfeld DS, Hess MT, Saker KE, Waldron JN, Crandell KM, Hoffman RM, Harris PA. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J Ani Sci* 2004;82(2):588-594.
- [8] Janiak M, Suska M, Dudzinska W, Skotnicka E. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2010;94(2):137-145.

- [9] Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003;189:41-54.
- [10] NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of horses. 6.ed. Rev. Washington, D.C.: National Academies. 2007; 360p.
- [11] Moffarts B, Kirschvink N, Art T, Pincemail J, Lekeux P. Effect of exercise on blood oxidant/antioxidant markers in Standardbred horses: comparison between treadmill and race track tests. *Equine Vet J Suppl.* 2006;36:254-257, 2006.
- [12] Halliwell B, Gutteridge, JMC; 2001. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press, 936p; 2001.
- [13] Prego EC, Balboa JP, Miranda EC. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutation peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 1997;16(1)10-15.
- [14] Bergero D, Assenza A, Caola G. Contribution to our knowledge of the physiology and metabolism of endurance horses. *Livestock Production Science* 2015, 92:167-176.
- [15] Melo SK, Diniz AI, Lira VL, Oliveira Muniz SK, Silva GR, Manso HE, Manso Filho HC. Antioxidant and hematological biomarkers in different groups of horses supplemented with polyunsaturated oil and vitamin E. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr (Berl)* 2016;100(5):852-859. doi:10.1111/jpn.12456.
- [16] Andriichuk A, Tkachenko H, Tkachova I. Oxidative stress biomarkers and erythrocytes hemolysis in Well-trained equine athletes before and after exercise. *J Equine Vet Sci* 2016;36:32-43. doi:10.1016/j.jevs.2015.09.011.
- [17] Balogh N; Gaál T; Ribiczeyné PSz; Petri Á; 2001: Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. *Vet Clin Pathol* 2011;30:214-8. doi:10.1111/j.1939-165X.2001.tb00434.x.
- [18] Moffarts B, Kirschvink N, Art T, Pincemail J, Lekeux P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidants status in trained Thoroughbred horses. *Vet J, London* 2005;169(1)7-9.
- [19] Kinnunen S, Atalay M, Hyypä S, Lehmuskero A, Hänninen O, Oksala N. Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. *J Sports Sci Med* 2005a;4(4):415-421.

- [20] Wanderley EK, Bem BSC, Melo, SKM, Gonzalez JC, Manso HECCC, Manso Filho HC. Hematological and biochemical changes in Mangalarga Marchador horses after a four-beat gait challenge in three different distances. *J Equine Vet Sci* 2015;35:259-263.
- [21] Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfoto MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím. Nova* 2007;30(5):1323-1338.
- [22] Evans DL, Priddle TL, Davie AJ. Plasma lactate and uric acid responses to racing in pacing Standardbreds and relationships with performance. *Equine Vet J* 2002;34(suppl.):131-134.
- [23] Castejón F, Trigo P, Muñoz A, Riber C. Uric acid responses to endurance racing and relationships with performance, plasma biochemistry and metabolic alterations. *Equine Vet J* 2006;38:70–3. doi:10.1111/j.2042-3306.2006.tb05516.x.
- [24] Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th Ed. San Diego: Academic Press, 928 p, 2008.
- [25] Melo SKM, Lira LB, Almeida TLAC, Rego EW, Manso HECCC, Manso Filho HC. Índices hematimétricos e bioquímica sanguínea no cavalo de cavalgada em condições tropicais. *Cie Ani Bras* 2013;14(2).
- [26] Kingston JK. Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ. *Equine Sports Medicine and Surgery*. 1.ed. Philadelphia: Saunders; 2004, p.939-948.
- [27] Wanderley EK, Manso Filho HC, Manso HECCC, Santiago TAE, McKeever KH. Metabolic changes in four-beat gaited horses after field marcha simulation. *Equine Vet J Suppl* 2010; 38:105-109.
- [28] Filippo Padi, Martins LP, Meireles MAD, Lannes ST, Peçanha RMS, Graça FAS. Gender Differences–Induced Changes in Serum Hematologic and Biochemical Variables in Mangalarga Marchador Horses After a Marcha Gait Competition. *J Equine Vet Sci* 2016;43:18-22.
- [29] Wagenmakers AJM. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: Role in human physiology and metabolism. *Exerc Sports Sci Rev* 1998;26:287-314.

- [30] Dias DCR, Rocha JS, Gusmão AL, El-Bachá RS, Ayres MCC. Efeito da suplementação com vitamina E e selênio sobre o quadro hematológico, enzimas marcadoras de lesão muscular e índice de peroxidação de biomoléculas em equinos submetidos à atividade de salto. *Ci Anim Bras* 2009;10(3):790-801.
- [31] Korhonen PAS, Lilius EM, Hyyppa S, Rasanen LA, Poso AR. Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in standardbred trotters. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2000;47(9):565-573.
- [32] Ferraz GC, Teixeira-neto AR, D'angelis FHF, Lacerda Neto JC, Queiroz Neto A. Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2009;46(6):431-437.
- [33] Orozco CAG, Martins CB, D'angelis FHF, Freitas EVV, Christovão FG, Queiroz Neto A, Lacerda Neto JC. Efeito do exercício sobre variáveis hematológicas de equinos antes e após participação em prova de enduro de 40 km. *Ars Vet* 2006;22(3):179-183.
- [34] Dias DCR, Rocha JS, Mello FM, El-Bachá RS, Ayres MCC. Influência do exercício sobre o hemograma, enzimas marcadoras de lesão muscular e índice de peroxidação de biomoléculas em equinos submetidos à atividade de salto. *Rev Bras Cie Vet* 2011;18(1):36-42.
- [35] Žvorc Z, Rafaj RB, Kuleš J, Mrljak V. Erythrocyte and platelet indices in babesiosis of dogs. *Vet. Archiv* 2010;80(2):259-267.
- [36] Miranda RL, Mundim AV, Saquy ACS, Costa ÁS, Guimarães EC, Gonçalves FC, Silva FOC. Perfil hematológico de equinos submetidos à prova de Team Penning. *Pesq Vet Bras* 2011;31(1).
- [37] Smith JE, Erickson HH, Debowes RM. Changes in circulating equine erythrocytes induced by brief, high-speed exercise. *Equine Vet J* 1989; 21(6):444-446.
- [38] Balarin MRS, Lopes RS, Kohayagawa A, Laposy CB, Fonteque JH. Valores da amplitude da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) em equinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. *Braz J Vet Res An Sci* 2006;43:637-641.

Table

1. Results for the protein and anti-oxidant metabolism biomarkers in four-beat gaited horses (n=12) before and after the marcha gait simulation test (MST).

Biomarkers	Phases of the experiment			
	Resting and fasting	Immediately after MST	+15 minutes after MST	+120 minutes after MST
GPX, UI/gHb	385.5±21.3 ^A	345.2±20.2 ^B	368.4±20.5 ^{AB}	387.3±21.8 ^A
SOD, UI/gHb	2095.3±115.0 ^A	1538.1±74.9 ^C	1787.1±73.6 ^B	1985.9±75.4 ^{AB}
Uric acid, mg/dL	0.30±0.03 ^B	0.31±0.05 ^{AB}	0.33±0.10 ^A	0.31±0.07 ^{AB}
TPP, g/dL	6.50±0.13 ^C	7.53±0.22 ^A	7.25±0.21 ^{AB}	7.15±0.19 ^B
Albumin, g/dL	4.33±0.10 ^B	4.94±0.14 ^A	4.65±0.12 ^{AB}	4.79±0.09 ^A
Urea, mg/dL	29.65±1.65 ^B	31.51±1.24 ^B	30.81±1.35 ^B	35.43±1.73 ^A
Creatinine, mg/dL	1.30±0.07 ^B	1.47±0.06 ^{AB}	1.49±0.06 ^A	1.35±0.07 ^{AB}

Observations: different letters on the same line indicate $P < 0.05$ according to Tukey's test.

GPX: glutathione peroxidase; SOD: superoxide dismutase; TPP: total plasma protein.

Table 2. Results of the hematological biomarkers in four-beat gaited horses (n=12) before and after the gait simulation test.

Biomarkers	Phases of the experiment			
	Resting and fasting	Immediately after MST	+15 minutes after MST	+120 minutes after MST
RBC, x10 ⁶ /UL	8.78±0.32 ^C	11.44±0.33 ^A	10.31±0.36 ^B	9.60±0.25 ^B
Hematocrit, %	40.06±1.25 ^D	52.80±1.32 ^A	47.52±1.53 ^B	44.03±1.08 ^C
Hemoglobin, g/dL	13.55±0.40 ^C	17.98±0.42 ^A	16.00±0.50 ^B	14.95±0.41 ^B
Leucocytes, x10 ³ /UL	10.34±0.41 ^D	12.84±0.67 ^{BC}	11.75±0.53 ^{BC}	15.09±0.60 ^A
Lymphocytes, %	5.07±0.32 ^C	7.19±0.53 ^A	6.46±0.40 ^B	3.40±0.23 ^D
Platelets, x10 ³ /UL	97.50±11.49 ^C	112.16±12.37 ^{AC}	99.16±10.94 ^B	118.41±13.27 ^A
MCV, fL	45.70±0.56 ^C	46.24±0.49 ^A	46.09±0.52 ^{AB}	45.90±0.54 ^{BC}
MCHC, g/dL	33.88±0.26	33.88±0.26	33.69±0.26	33.91±0.31
RDW-SD, fL	37.35±0.27 ^B	37.78±0.26 ^A	37.59±0.30 ^{AB}	37.53±0.24 ^{AB}
RDW-CV, %	20.33±0.29	20.48±0.31	20.30±0.33	20.27±0.31

Observations: different letters on the same line indicate $P < 0.05$ according to Tukey's test. RBC: red blood cells; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW-SD: red cell distribution width –; RDW-CV: red cell distribution width – coefficient of variation.

7.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização dos efeitos da suplementação com óleo polinsaturado e vitamina E sobre biomarcadores hematológicos, de função digestiva e do estresse oxidativo, em animais das raças Puro-Sangue Árabe e Mangalarga Marchador promovem uma melhor compreensão dos efeitos da suplementação;

A suplementação tem o objetivo de contribuir para uma melhora no desempenho, na adaptação aos estímulos do treino e proteger contra lesões indesejadas;

Antioxidantes são largamente utilizados por atletas, porém não está claro se é realmente necessário adicionar antioxidantes à dieta dos atletas;

A suplementação deve ser indicada apenas em casos de déficit, pois estudos ainda são inconclusivos em relação aos benefícios no combate e sua recomendação para a população geral.

A avaliação do condicionamento físico e adaptações metabólicas dos animais atletas durante o teste de simulação de marcha, forneceram resultados de valores padrão para equinos sadios nessa categoria, contribuindo assim para o desenvolvimento de programas de avaliação e adaptação física.