

UFRRJ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

TESE

“Efeitos da N-Acetilcisteína na modulação autonômica cardíaca e nos parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo muscular após o exercício de salto em equinos”

Mariana do Desterro Inácio e Souza

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NA MODULAÇÃO AUTONÔMICA
CARDÍACA E NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO
METABOLISMO MUSCULAR APÓS O EXERCÍCIO DE SALTO EM
EQUINOS

MARIANA DO DESTERRO INÁCIO E SOUZA

Sob a orientação do Professor

Emerson Lopes Olivares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Julho de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S719e Souza, Mariana do Desterro Inácio e, 1984-
Efeitos da N-Acetilcisteína na modulação autonômica cardíaca e nos parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo muscular após o exercício de salto em equinos / Mariana do Desterro Inácio e Souza. - Seropédica, 2017.
73 f.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2017.

1. Variabilidade da Frequência Cardíaca. 2. Equinos. 3. Fisiologia Cardiovascular. 4. Fisiologia do Exercício em Equinos. 5. Clínica Esportiva em Equinos. I. Olivares, Emerson Lopes, 1974-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária III. Título.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

MARIANA DO DESTERRO INÁCIO E SOUZA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 31/07/2017

Emerson Lopes Olivares (Ph. D) UFRRJ
(orientador)

Daniel Augusto Barroso Lessa (Ph. D) UFF

Fábio da Silva de Azevedo Fortes (Ph. D) UEZO

Anderson Luiz Bezerra da Silveira (Ph. D) UFRRJ

Ana Paula Lopes Marques (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

À minha família, por todo o incentivo e aos animais, motivo de meu estudo.

Mariana do Desterro I. e Souza

BIOGRAFIA DA AUTORA

Nascida em 17 de Janeiro de 1984. Natural do Rio de Janeiro. Aficionada por cavalos desde criança sempre expressou seu desejo de trabalhar com animais. Formada em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro tendo concluído a Graduação em 2008. Durante a graduação estagiou em diversas áreas entre elas suas áreas de maior afinidade, a Clínica Veterinária de Grandes Animais e a Anestesiologia Veterinária. Concluiu seu Mestrado em 2011, iniciou seu Doutorado em 2013 e em 2014 ingressou nas fileiras do Exército Brasileiro na qualidade de Oficial Veterinária Temporária, atuando na Clínica Médica de Equinos não deixando, entretanto, de atuar também na Anestesiologia Veterinária de Pequenos Animais em diversas clínicas veterinárias da cidade do Rio de Janeiro.

RESUMO

DESTERRO, Mariana Inácio e Souza. **Efeitos do tratamento com N-acetilcisteína na modulação autonômica cardíaca e nos parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo muscular após o exercício de salto em equinos.** 2017. p.58. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos decorrentes da utilização de N-acetilcisteína (NAC) sobre o balanço simpátovagal cardíaco (estudo da variabilidade da frequência cardíaca, VFC), estresse oxidativo e a lesão muscular, gerados pela atividade física, após exercício de salto em equinos. Foram utilizados sete equinos de ambos os sexos (dois machos e cinco fêmeas) com idade média de $14,43 \pm 3,64$ anos, pesando $557,14 \pm 44,99$ kg. Todos treinados a realizarem provas equestres como as que serviram para o presente estudo. Inicialmente foi realizada uma coleta basal (grupo BASAL) de dados, em repouso, um dia antes de prova de salto contendo doze obstáculos posicionados a um metro de altura. A segunda coleta (grupo EX) foi realizada após prova de salto, iniciada quinze minutos após término da atividade física. Após sete dias desta primeira prova, iniciou-se o tratamento com NAC na dose de 10mg.kg^{-1} , por via oral a cada doze horas, durante quatorze dias, sendo então realizada a terceira coleta (grupo NAC) com os equinos em repouso. No dia seguinte foi realizada a quarta coleta (grupo NAC+EX) quinze minutos após exercício de salto. Em todas as coletas foi utilizado o monitor Polar Equine RS800 para a obtenção de traçado eletrocardiográfico e da variabilidade da frequência cardíaca, pelo método de Transformada Rápida de Fourier, através de software específico (Kubios HRV, versão 2.1, Finlândia). Em todos os momentos foram obtidas amostras de sangue, centrifugadas imediatamente após coleta à vácuo para obtenção de plasma e soro. Estas serviram para as avaliações séricas de Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (FA), Creatinina, Creatina Fosfoquinase (CPK), Gama Glutamil Transferase (GGT), Uréia e Lactato Desidrogenase (LDH) e plasmáticas de Lactato e Malondialdeído (MDA). O teste estatístico utilizado foi o ANOVA One Way para medidas repetidas. Na análise da VFC houve diferença estatística após o exercício com o uso de NAC observado claramente pela retirada simpática e aumento na entrada vagal, representadas por maiores valores de espectro de alta frequência (AF) normalizada e menores valores de baixa frequência (BF) normalizada e da razão BF/AF normalizadas. Nos testes bioquímicos houve aumento nos índices, em repouso, de FAL, GGT, LDH, AST, e ureia após o uso de NAC. Após o exercício, quando decorrido previamente o tratamento com NAC, houve aumento significativo nas taxas de CK, FA, GGT, LDH e ureia. Para a creatinina foram observados menores valores tanto em repouso quanto depois do exercício após o uso de NAC, sugerindo possível proteção renal induzida pelo medicamento. Considerando-se o potencial preventivo de intercorrências cardíacas que uma menor atividade simpática e uma entrada vagal mais acentuada após o exercício podem representar, podemos sugerir que a NAC é eficaz em melhorar a Variabilidade da frequência cardíaca diminuindo a possibilidade de arritmias fatais e morte súbita no crítico momento de recuperação pós exercício moderado e intenso bem como em repouso. Esse efeito parece ser independente dos efeitos bioquímicos uma vez que a NAC não diminuiu de maneira significativa o estresse oxidativo e a lesão tecidual causadas pela atividade de salto em equinos.

Palavras-chave: equinos, N-Acetilcisteína, variabilidade da frequência cardíaca

ABSTRACT

DESTERRO, Mariana Inácio e Souza. **Effects of treatment with N-acetylcysteine in cardiac autonomic modulation and biochemical parameters related to muscular metabolism after jumping exercise in horses.** 2017. p.58. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017

The aim of this study was to evaluate the effects of N-acetylcysteine (NAC) on cardiac sympathovagal balance (heart rate variability analysis, HRV), oxidative stress and muscle injury caused by physical activity after showjumping exercise in horses. Seven horses of both sexes (two males and five females) were used, with a mean age of 14.43 ± 3.64 years, weighing 557.14 ± 44.99 kg. The animals were showjumpers and used to undergo showjumping competitions. Initially, basal data samples (basal group) were taken at rest, one day before a showjumping competition containing twelve obstacles positioned one meter high. The second samples (EX group) were collected after a showjumping competition, and started fifteen minutes after the end of the physical activity. After seven days of this first test, the horses underwent treatment with NAC at the dose of $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, orally every 12 hours for fourteen days, and then, the third samples (NAC group) were then taken with the horses at rest. The next day the fourth data sample (NAC + EX group) were obtained fifteen minutes after the jump exercise. From the Polar Equine RS800 monitor all cardiac data was obtained. Heart rate variability analysis was performed by the Fourier Fast Transformation method using specific software (Kubios HRV, version 2.1, Finland). At all times blood samples were obtained, centrifuged immediately after vacuum collection to obtain plasma and serum. These were used for evaluations of Aspartate Aminotransferase (AST), Alkaline Phosphatase (FA), Creatinine, Creatine Phosphokinase (CPK), Glutamyl Transferase (GGT), Urea, Lactate Dehydrogenase (LDH), Lactate and Malondialdehyde (MDA). The statistical test used was One Way ANOVA for repeated measures. In the analysis of HRV, there was a statistical difference after exercise with the use of NAC clearly observed by sympathetic withdrawal and increase in vagal input, represented by higher values of normalized high frequency (AF) spectrum and lower normalized low frequency (BF) values and of the standard BF / AF ratio. In the biochemical tests there was an increase in the resting index of FAL, GGT, LDH, AST, and urea after the use of NAC. After exercise, when the NAC treatment had previously been performed, there was a significant increase in the rates of CK, FA, GGT, LDH and urea. Creatinine lower values were observed both at rest and post exercise after the use of NAC, suggesting possible drug-induced renal protection. Considering the preventive potential of cardiac interurrences that a lower sympathetic activity and a more pronounced vagal entry after exercise may represent, we may suggest that NAC is effective in improving heart rate variability by decreasing the possibility of fatal arrhythmias and sudden death in the Critical recovery moment after moderate and intense exercise as well as at rest. This effect appears to be independent of biochemical effects since NAC did not significantly decrease oxidative stress and tissue injury caused by jumping activity in horses.

Key-words: equine, N-Acetylcysteine, heart rate variability.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 2 |
| 2.1 Objetivos específicos | 2 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 3 |
| 4 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 4.1 Influência autonômica sobre o sistema cardiovascular | 3 |
| 4.1.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca | 3 |
| 4.1.2 Ajustes cardiovasculares e regulação autonômica durante o exercício físico aeróbico | 7 |
| 4.1.3 Recuperação da frequência cardíaca após exercício | 8 |
| 4.2 Avaliações laboratoriais do sangue | 9 |
| 4.2.1 Enzimas Séricas | 9 |
| 4.2.1.1 Aspartato Aminotransferase | 9 |
| 4.2.1.2 Creatina quinase | 10 |
| 4.2.1.3 Fosfatase Alcalina | 11 |
| 4.2.1.4 Gama Glutamil Transferase | 11 |
| 4.2.1.5 Lactato Desidrogenase | 12 |
| 4.2.2 Outros produtos do metabolismo muscular, hepático e renal | 13 |
| 4.2.2.1 Creatinina | 13 |
| 4.2.2.2 Lactato | 14 |
| 4.2.2.3 Ureia | 16 |
| 4.3 O Exercício de salto | 16 |
| 4.3.1 Exercício físico, formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo | 17 |
| 4.3.1.1 Estresse oxidativo e Malondialdeído | 18 |
| 4.3.1.2 Determinação do MDA | 19 |
| 4.3.1.3 Exercício, treinamento e suplementação com antioxidantes | 20 |
| 4.4 N-acetilcisteína | 23 |
| 4.4.1 N-acetilcisteína em equinos | 25 |
| 4.4.2 N-acetilcisteína e estresse oxidativo | 25 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 5.1 Animais | 27 |
| 5.2 Protocolo Experimental | 27 |
| 5.3 Avaliações bioquímicas | 28 |
| 5.3.1 Coletas das amostras de sangue | 28 |
| 5.4 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca | 29 |
| 5.5 Análises estatísticas | 30 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 6.1 Avaliações Laboratoriais | 30 |
| 6.1.1 Aspartato Aminotransferase | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1.2 Creatinina | 31 |
| 6.1.3 Creatina Fosfoquinase | 31 |
| 6.1.4 Fosfatase Alcalina | 32 |
| 6.1.5 Gama Glutamil Transferase | 32 |
| 6.1.6 Lactato | 32 |
| 6.1.7 Lactato Desidrogenase | 33 |
| 6.1.8 Ureia | 33 |
| 6.1.9 Malondialdeído | 34 |
| 6.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca | 34 |
| 6.2.1 Domínio da Frequência – Transformada Rápida de Fourier (TRF) | 34 |
| 6.2.1.1 Baixa Frequência (BF) | 34 |
| 6.2.1.2 Alta Frequência (AF) | 34 |
| 6.2.1.3 BF Normalizada | 35 |
| 6.2.1.4 AF Normalizada | 35 |
| 6.2.1.5 BF/AF | 35 |
| 6.2.1.6 BF/AF Normalizada | 35 |
| 6.2.1.7 Potência Total | 36 |
| 6.2.2 Domínio do Tempo – Análise autorregressiva | 37 |
| 6.2.2.1 R-R Médio | 37 |
| 6.2.2.2 Frequência Cardíaca Média | 37 |
| 7 CONCLUSÃO | 37 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |

1. INTRODUÇÃO

Em condições fisiológicas, existe uma complexa regulação autonômica fundamental para a manutenção da homeostase corporal. Apesar de o ritmo cardíaco parecer constante, o coração sadio varia a sua frequência batimento a batimento. Isto é consequência dos ajustes promovidos pelo sistema nervoso autônomo para a manutenção do equilíbrio cardiovascular. Durante a realização de uma atividade física, ocorre alteração do estado de repouso para o estado ativo, no qual alterações da modulação autonômica são fundamentais para a execução eficiente do exercício físico, sem intercorrências cardiovasculares.

Durante a execução de atividades físicas uma série de alterações autonômicas ocorrem sobre o sistema cardiovascular envolvendo, notadamente, retirada da atividade parassimpática com alterações da variabilidade da frequência cardíaca (FC) com consequente sobreposição da atividade simpática acarretando aumento da frequência cardíaca. Findo o exercício, ocorre de maneira reversa desaceleração cardíaca e reativação vagal. Assim, o entendimento da complexa regulação autonômica durante o exercício é fundamental para o sucesso do desenvolvimento de terapias ou de artifícios que visam à melhora da resposta autonômica cardiovascular de animais para a realização de atividades físicas específicas.

Uma forma de avaliação da modulação autonômica é o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Essa medida representa a modulação simpatovagal sobre o coração e é considerada útil para o prognóstico e diagnóstico de várias condições clínicas. Por meio da VFC é possível obter, de forma não invasiva, dados quantitativos sobre o balanço entre os sistemas autônomos simpático e parassimpático, no qual a medida da VFC mensura a relação da modulação simpática com ondas de baixa frequência (BF) em relação a modulação parassimpática com ondas de alta frequência (AF).

Em modelos experimentais de exercício é possível observar uma sobreposição da entrada simpática em relação a parassimpática, sendo essa sobreposição fundamental para a realização da atividade física. Apesar de estar estabelecida a alteração da VFC durante o exercício, existem poucos relatos de agentes farmacológicos que possam interferir de maneira benéfica sobre a VFC melhorando a modulação autonômica. Ao mesmo tempo, é crescente o número de estudos em que a N-acetilcisteína (NAC) figura como um possível modulador da atividade simpática, adicionando efeitos além da sua

utilização clínica mais trivial como agente mucolítico, antioxidante indireto e hepatoprotetor na intoxicação por drogas, como o paracetamol por exemplo.

Como um dos exemplos de evidência que a N-acetilcisteína poderia ter uma nova indicação para uso cardiológico, (LEE *et al.*, 2009) observaram que o uso crônico da NAC por via oral no modelo de ratos infartados pela oclusão permanente da artéria coronariana esquerda e, sem a associação de nenhum outro agente farmacológico, apresentou como um dos principais efeitos, além de sua esperada ação antioxidante, diminuição da hiper-inervação simpática. Esse efeito reduziu as arritmias cardíacas mesmo quando induzidas por estímulos elétricos. Extrapolando o paradigma de mucolítico, em estudos realizados em humanos vem sendo notável os efeitos da NAC como atenuador da sensação de fadiga muscular e antioxidante. A exemplo disto, LEELARUNGRAYUB *et al.* (2011); KERKSICK e WILLOUGHBY (2005) citaram a contribuição na manutenção da capacidade antioxidante total e diminuição da sensação de fadiga promovidas pela NAC.

Portanto, diante de poucos trabalhos na literatura sobre os reais efeitos da NAC como moduladora do sistema nervoso autônomo, sobretudo em condições fisiológicas, como o exercício físico, a principal hipótese do presente estudo foi avaliar se a droga em questão seria capaz de modificar a VFC de cavalos atletas após o salto. Adicionalmente, levando-se em consideração as alterações fisiológicas causadas pela atividade física, outros pontos investigados foram as modificações em valores de marcadores bioquímicos associados à lesão da musculatura esquelética e o provável papel da NAC na atenuação da lesão deste tecido muscular.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito, bem como as consequências da utilização da N-acetilcisteína como potencial modulador do balanço autonômico antes e após a atividade física moderada e intensa em cavalos submetidos a provas de saltos.

2.1 Objetivos específicos

Para realizar a investigação proposta no objetivo principal, o presente estudo pôde ser subdividido nas possibilidades de avaliações experimentais descritas a seguir:

- Avaliar possíveis alterações no balanço simpatovagal cardíaco antes e após a atividade de salto;
- Avaliar se a N-Acetilcisteína poderia ter ação antioxidante em cavalos antes e após o exercício;
- Avaliar se a N-Acetilcisteína seria capaz de influenciar marcadores bioquímicos que indicam o estado funcional da musculatura esquelética;
- Avaliar se a N-Acetilcisteína poderia ter ação como agente atenuador dos efeitos lesivos do exercício infligidos à musculatura esquelética.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando-se o agronegócio do cavalo no Brasil de acordo com os dados da “Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo”, de 2016, publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o PIB da equinocultura em 2015 era 16 Bilhões de reais, totalizando um efetivo de 5.363.185 equinos em 2013, destes, 1.100.00 equinos estão desempenhando funções relacionadas a esporte e lazer sendo 17,2% especificamente aplicados no hipismo. O equino atleta gera 125.700 vagas diretas de emprego (MAPA, 2016), cabendo ressaltar, diante dos citados números, a importância do presente estudo da variabilidade da frequência cardíaca como determinante do estado da ação autonômica exercida no coração do cavalo atleta de salto. Pesquisas neste tema ainda são escassas e a correlação entre VFC, NAC e exercício físico poderiam contribuir sobremaneira para uma melhor compreensão das respostas autonômica e da musculatura esquelética antes e após a atividade física. Notória contribuição também se faz presente na observação dos efeitos do fármaco citado sobre a autonomia cardíaca, na atenuação de efeitos lesivos do exercício ao tecido muscular esquelético bem como sobre o estresse oxidativo causado pelo exercício de salto em equinos

Mudanças nos padrões da VFC fornecem um indicador sensível e antecipado de comprometimentos na saúde. Uma alta variabilidade na frequência cardíaca é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável, com mecanismos autonômicos eficientes, enquanto que, baixa variabilidade é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, implicando a presença de mau funcionamento fisiológico no indivíduo. Diante da sua importância como um marcador que reflete a atividade do SNA sobre o nódulo sinusal e como uma ferramenta clínica para avaliar e identificar comprometimentos na saúde (VANDERLEI *et al.*, 2009).

Nas diversas modalidades de esportes equestres é desejável que o coração desacelere e a frequência cardíaca do cavalo e retorne ao valor basal, dentro de um determinado intervalo de tempo, para que o mesmo seja considerado apto a continuar na prova. Sem um balanço simpato-vagal afinado e, conseqüentemente, uma boa VFC, o animal atleta pode acabar não chegando à frequência cardíaca desejada e com isso ser descartado da competição. Isso porque a diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é um fator preditivo de risco para arritmia e morte súbita cardíaca (KLEIGER *et al.*, 1987). Flutuações da frequência cardíaca são indicativos da capacidade do sistema nervoso autônomo de responder a perturbações fisiológicas e estímulos ambientais que afetam o sistema cardiovascular (PARATI *et al.*, 1995).

O estudo da VFC é um método que nos permite analisar as flutuações que ocorrem durante períodos curtos ou prolongados (24h) (MALIK e CAMM, 1993); (TASK-FORCE, 1996), estes períodos podem ser desde o repouso pré, trans e pós exercício tendo a vantagem de possibilitar uma avaliação não invasiva e seletiva da função autonômica. As chamadas medidas no domínio do tempo são índices obtidos de um registro contínuo de eletrocardiograma, a partir do qual determina-se a dispersão da duração dos intervalos entre complexos QRS normais, isto é, resultantes de despolarização sinusal (tabela 1). Os vários índices propostos para mensuração da VFC no domínio do tempo podem ser derivados de cálculos aritméticos, estatísticos ou geométricos (TASK-FORCE, 1996).

A VFC também pode ser avaliada através das medidas no domínio de frequência (AKSELROD *et al.*, 1985); (PAGANI *et al.*, 1984; MALLIANI *et al.*, 1991); (MORAES e FERLIN, 1992). Estas medidas são derivadas da análise da densidade do espectro de potência que descreve a distribuição da densidade (variância) em função da frequência (TASK-FORCE, 1996). Em outras palavras, a análise espectral decompõe a

variabilidade total da FC (potência total) em seus componentes causadores (frequência ultra baixa, frequência muito baixa, baixa frequência e alta frequência), apresentando-os segundo a frequência com que alteram a FC.

A análise espectral geralmente é realizada com gravação de 200 a 500 intervalos de RR consecutivos, por Transformada Rápida de Fourier (TRF) ou algoritmos autorregressivos (AR) (AKSELROD *et al.*, 1981). O primeiro método é facilmente disponível na maioria das bibliotecas matemáticas, mas requer uma edição adequada dos dados antes da inserção em software para análise espectral computadorizada (CERUTTI, 1995). Algoritmos autorregressivos são baseados em uma abordagem (AKSELROD *et al.*, 1981; CERUTTI, 1995), que assume que cada série temporal de intervalo RR é uma saída de um determinado modelo matemático. Para facilitar a correlação com outros estudos, convencionou-se utilizar preferencialmente a TRF (PHYSICK-SHEARD, P. W. *et al.*, 2000). Para cálculo da densidade espectral, delimitam-se normalmente, em humanos, quatro faixas de frequências distintas: 1) alta frequência (AF: 0,15 a 0,40 Hz), modulada pelo sistema nervoso parassimpático e gerado pela respiração (FURLAN *et al.*, 1990); 2) baixa frequência (BF: 0,04 a 0,15 Hz), modulada tanto pelo simpático quanto pelo parassimpático (CHESS *et al.*, 1975; SAUL *et al.*, 1990). Tem sido correlacionada ao sistema barorreceptor e termorregulador (KITNEY e ROMPELMAN, 1980), à atividade periférica vasomotora e ao sistema renina-angiotensina (AKSELROD *et al.*, 1985; MALIK e CAMM, 1993); 3) frequência muito baixa (FMB; 0,01 à 0,04 Hz) tem sido proposta como um marcador da atividade simpática (MALIK e CAMM, 1993), porém isto ainda não está bem definido; 4) frequência ultra baixa (FUB: 10^{-5} à 10^{-2} Hz sua correspondência fisiológica ainda permanece obscura (MALIK e CAMM, 1993).

A potência de AF e BF podem ser calculados em absoluto (ms^2) e unidades normalizadas (nu), sendo este último obtido multiplicando por 100 a razão entre o poder de cada componente individual e a potência total menos o componente MBF (ex.: $LF/(Potência\ Total-MBF)$) (PAGANI *et al.*, 1986). Já foi comprovado que o procedimento de normalização facilita a avaliação de alterações em BF e AF de forma independente das variações concomitantes na potência total e reflete a interação recíproca que caracteriza as atividades simpáticas e vagais na maioria dos processos fisiológicos e condições patológicas (AKSELROD *et al.*, 1981; PAGANI *et al.*, 1986; MALLIANI *et al.*, 1991; TASK-FORCE, 1996). Uma similar avaliação do equilíbrio simpatovagal é fornecida pelo uso da relação BF/AF.

Para aumentar a comparabilidade entre estudos da análise TRF da VFC, as seguintes recomendações devem ser levadas em consideração: (1) usar conjuntos de dados de aproximadamente 5 minutos de duração; (2) usar pelo menos 512 pontos das séries temporais derivadas dos dados entre batimentos originais para calcular o espectro de potência; usar bandas de frequência adequadas às espécies, como os intervalos de AF à de 0,13 a 0,26 Hz (corresponde a uma taxa respiratória de 8-16 m.r.p.m. para equinos; (3) expressar também os dados em unidades normalizadas como porcentagem ou proporção da potência total ($BF / \text{potência total} \times 100$ ou $AF / \text{potência total} \times 100$). Conforme já utilizado por [PHYSICK-SHEARD, P. W. et al. \(2000\)](#) e (VILLAS-BOAS, 2016) em estudo anterior em equinos, neste trabalho optou-se por utilizar como bandas de frequência para BF 0.01–0.07 Hz e para AF 0.07–0.50 Hz.

4.1.2 Ajustes cardiovasculares e regulação autonômica durante o exercício físico aeróbico

Durante o exercício, ocorre aumento da atividade simpática e diminuição da descarga vagal propiciando aumento da frequência cardíaca (FC), volume ejetado e contratilidade miocárdica para satisfazer as demandas energéticas dos músculos que trabalham. A aceleração cardíaca no exercício resulta da inibição parassimpática em baixas intensidades de exercício e da inibição parassimpática e ativação simpática em intensidades moderadas (SHEPHARD, 1987).

Sabe-se que a magnitude das respostas neural e hemodinâmica ao exercício está relacionada à intensidade do exercício (FORJAZ *et al.*, 1998). KANNANKERIL e GOLDBERGER (2002) mostraram que o exercício moderado está associado a um encurtamento do comprimento do ciclo sinusal do nodo sino atrial, comprimento do ciclo de bloqueio atrioventricular, do intervalo atrioventricular e do período refratário efetivo ventricular. Este estudo também fornece a primeira avaliação dos efeitos parassimpáticos na eletrofisiologia cardíaca durante o exercício e a sua recuperação. Embora o exercício seja associado à retirada parassimpática, ainda existem efeitos parassimpáticos mensuráveis no nódulo sinusal, no nodo atrioventricular e ventrículo durante exercício e moderado e no período de recuperação. Os efeitos parassimpáticos durante o exercício são inferiores aos observados em repouso (KANNANKERIL e GOLDBERGER, 2002).

Visto que a adaptação ao exercício adquirido por treinamento físico pode influenciar significativamente a resposta cardiovascular ao exercício (HAGBERG *et al.*,

1980), os índices de Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) e particularmente o poder espectral das ondas de alta frequência (AF) correspondentes a atividade parassimpática são, em grande parte, influenciados pelo padrão de respiração sendo por isso recomendado controlar a frequência respiratória e o Volume corrente em estudos de VFC (BROWN, T. E. *et al.*, 1993). Sabe-se que podem haver interações simpáticas-parassimpáticas significativas que podem resultar em efeitos parassimpáticos acentuados (KOLMAN *et al.*, 1975; MARTINS e ZIPES, 1980).

4.1.3 Recuperação da frequência cardíaca após exercício

Em estudos em humanos já foi observado que, o efeito parassimpático no período inicial de recuperação pós-exercício faz com que a FC tenda a atingir os valores de repouso. A frequência cardíaca diminui rapidamente durante os primeiros 1-2 minutos após a cessação do exercício, e gradualmente depois disso. Em humanos, na recuperação dos ritmos moderado e intenso, a frequência cardíaca permanece elevada acima do nível de pré-exercício por um período de tempo relativamente longo (até 60 min) (BROWN, S. P. *et al.*, 1993; CARTER *et al.*, 1999; NISHIME *et al.*, 2000; TAKAHASHI, T *et al.*, 2000; TAKAHASHI, Tatsuhisa *et al.*, 2000). Devido à presumida origem parassimpática da VFC e à taxa de diminuição da frequência cardíaca após o exercício, postula-se que os índices de VFC antes e depois do exercício poderiam estar associados à taxa de recuperação da frequência cardíaca. Esses dados têm implicações importantes na interação entre exercício, atividade autonômico e risco de morte súbita. Do ponto de vista clínico, a quantificação da VFC durante várias manobras (repouso, exercício, pós exercício) pode fornecer informações adicionais sobre adaptabilidade e flexibilidade do sistema cardiovascular com potencial aplicação clínica prognóstica.

O período de recuperação após o exercício também está associado a mudanças autonômicas. A FC diminui e provavelmente reflete a retirada simpática e a reativação parassimpática (IMAI *et al.*, 1994). No entanto, estudos sobre a VFC durante a recuperação proporcionam resultados conflitantes. Em comparação com o exercício, a potência da AF na recuperação foi notada por aumentar (ARAI *et al.*, 1989) ou diminuir (PERINI *et al.*, 1990), embora a variação da frequência cardíaca na recuperação tenha sido consistentemente demonstrada como diminuída em comparação com avaliações

basais (ARAI *et al.*, 1989; AHMED *et al.*, 1994 355). No estudo de (KANNANKERIL e GOLDBERGER, 2002), os efeitos parassimpáticos foram claramente demonstrados na recuperação e foram intermediários entre os observados em repouso e aqueles observados durante o exercício. A inervação parassimpática do coração demonstra diferenças regionais (RANDALL, 1994). As vias pré-ganglionares vagais para o nódulo sinusal estão situadas na almofada de gordura da veia pulmonar, enquanto que aqueles que inervam o nódulo AV estão na camada de gordura que cobre a entrada do seio coronariano no septo interatrial inferior. Comparado com os nodos há poucos gânglios encontrados nos tecidos ventriculares. Os nervos parassimpáticos são distribuídos para regiões altamente restritas do coração em percursos anatômicos discretos, que podem ser alterados seletivamente (RANDALL *et al.*, 1992).

4.2 Avaliações laboratoriais do sangue

4.2.1 Enzimas Séricas

As enzimas séricas foram analisadas no intuito de correlacionar a utilização da N-acetilcisteína com lesões musculares e metabólicas que cursam com a prática de exercício físico moderado e intenso conforme o praticado pelos animais no presente estudo.

4.2.1.1 Aspartato aminotransferase (AST)

As enzimas comumente utilizadas para indicar a lesão muscular são a aspartato aminotransferase (AST), Creatinoquinase (CK) e a lactato desidrogenase (LDH) (VALBERG *et al.*, 1993). A cinética da elevação sérica e da eliminação de cada uma dessas enzimas é diferente e devem ser consideradas na interpretação dos resultados. As transaminases AST e alanina aminotransferase (ALT) são exemplos de enzimas de extravasamento. Considera-se que pequenos fragmentos de membrana contêm enzima de indução sejam liberados, cheguem a corrente sanguínea e provoquem aumento da atividade sérica dessa enzima. Exemplo o aumento de Fosfatase alcalina (ALP) e gamma glutamil transferase (GGT) na colestase (LASSEN e WEISER, 2007).

A AST catalisa a transaminação da L-aspartato a 2-oxiglutarato em oxaloacetato e glutamato. São encontradas duas isoenzimas, uma citossólica e outra mitocondrial, que podem ser encontradas no fígado, músculos, coração, eritrócitos e células da mucosa intestinal (HOFFMANN *et al.*, 1989). Portanto, a AST aumenta em caso de maior exercício muscular, devendo ser estudada junto com a creatinoquinase. Valores

elevados podem significar danos musculares. Foram encontrados maiores níveis de AST em cavalos supertreinados comparados aos cavalos controlados (TYLER-MCGOWAN *et al.*, 1999). O exercício determinou aumento dos valores de CK e AST em ambos os grupos possivelmente pelo mecanismo de aumento da permeabilidade das paredes celulares em função do exercício (SICILIANO *et al.*, 1995). As atividades séricas da AST, CK e LDH elevam-se imediatamente e retornam a valores semelhantes ao de repouso 30 minutos após o término do Teste Padrão de Exercício Progressivo. O pico de atividade enzimática da AST foi de 12 h a 24 h; da CK de 3 h a 6 h e da LDH 24 h após o término do Teste Padrão de Exercício Progressivo (THOMASSIAN *et al.*, 2007). O exercício induz mudanças reversíveis na ultraestrutura do músculo esquelético dos cavalos, como a elevação da permeabilidade do sarcolema e das proteínas musculares, tais como a mioglobina, CK e a AST que são liberadas na circulação. Discretos aumentos dessas enzimas após o exercício não estão associados com a lesão da célula muscular, mas com o aumento da permeabilidade da membrana. Porém, caso haja lesão em nível ultraestrutural durante o exercício, um aumento marcante na concentração dessas proteínas será observado, de maneira que, a avaliação da magnitude e do tempo de curso dessas alterações auxilia identificar o tipo da lesão muscular (VALBERG, 1996).

4.2.1.2 Creatinoquinase (CK)

Também conhecida pelo nome de creatina quinase ou, ainda, creatina fosfoquinase (CPK), a creatinoquinase catalisa a transferência reversível do grupo fosforilado de um trifosfato de adenosina (ATP) para a creatina, para produzir Adenosina difosfato (ADP)+fosfocreatina (PCr). A principal função da CK citosólica, além de sua ação de amortecimento, é o reabastecimento de ATP em locais de alta demanda de energia (BESSMAN e GEIGER, 1981). O ATP sintetizado por fosforilação oxidativa nas mitocôndrias é alterado para fosfocreatina pela creatinoquinase mitocondrial (mi-CK), que é então transportado para citosol e reconvertido para ATP pela CK da miofibrila, que está ligada à miosina (WALLIMANN *et al.*, 1984). A reação da miosina ATPase usa preferencialmente ATP fornecida pela reação de creatinoquinase miofibrilar do que a ATP citosólica (YAGI e MASE, 1962; SAVABI *et al.*, 1983).

A creatinoquinase possui quatro isoenzimas. A CK-MM está presente nos músculos esquelético e cardíaco, a CK-BB está presente no cérebro, e a CK-MB que é uma isoenzima encontrada principalmente no coração. A quarta isoenzima é a CK-Mt

que é uma enzima mitocondrial que responde por até 15% da atividade da CK cardíaca (KRAMER e HOFFMANN, 1997). Em medicina veterinária, a determinação das isoenzimas de CK ainda não tem utilidade prática, embora seja comum na medicina humana. A CK é a enzima mais sensível para indicar lesão muscular. Pode ocorrer um incremento na atividade plasmática desta enzima por injeção intramuscular, decúbito prolongado, convulsões, esforço prolongado e outras lesões musculares (DACVECC e DACVO, 2003).

WOLFFENBÜTTEL et al. (2003), verificaram que cães com leptospirose apresentavam atividade sérica da CK aumentada. Em medicina humana, este é um dos primeiros testes a serem realizados quando existe suspeita desta enfermidade. Este achado sugere uma extensa degeneração muscular, que explica as dores pelo corpo relatadas em humanos e observados na clínica veterinária. Incremento significativo de CK pode ocorrer em bovinos transportados por longos períodos (TADICH *et al.*, 2000), devido ao esforço físico a que são submetidos os animais. O esforço do parto também é um fator de aumento da CK (MORAIS *et al.*, 2000), assim como o exercício de cavalos de pentatlon (BALOGH *et al.*, 2001). A liberação de enzimas citoplasmáticas, incluindo CK, AST e LDH, foi considerada um parâmetro de avaliação para a lesão muscular durante o exercício (LINDSAY *et al.*, 1980). Dentre estas, a atividade da CK foi considerada por DUNCAN e PRASSE (1986) o indicador mais específico e sensível para detectar e monitorar a lesão muscular em equinos. No equino a CK é encontrada no músculo esquelético, miocárdio e cérebro. Parece haver pouca ou nenhuma troca entre o líquido cerebrospinal e o plasma. Um aumento significativo na concentração da CK plasmática total deverá estar associada a lesão muscular cardíaca ou esquelética. Isoladamente a concentração plasmática da CK não poderá ser usada para diferenciar lesão cardíaca de lesão muscular esquelética. Segundo HORTOBAGYI e DENAHAN (1989) e BRUIN et al. (1994) a CK plasmática é um marcador de excesso de treino.

4.2.1.3 Fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina está presente no intestino, nos rins, no fígado e nos ossos. Duas isoenzimas foram descritas, uma de origem intestinal e outra inespecífica (KRAMER e HOFFMANN, 1997). Além delas, existe uma isoenzima induzida por corticosteróide. No soro de cães podem ser encontradas isoenzimas de origem óssea, hepática e induzida por corticosteróide (SYAKALIMA *et al.*, 1997).

Além dos corticosteróides, outras drogas induzem aumento da fosfatase alcalina, tais como esteróides, barbitúricos, cefalosporinas, fenobarbital, fenotiazinas, fenilbutazona, tetraciclina, tiabendazol e halotano. A fosfatase alcalina de origem óssea pode estar aumentada em animais jovens, em consolidação de fraturas, hiperparatireoidismo, osteossarcoma, osteomalácia ou na deficiência de vitamina D. Nem toda hepatopatia significativa causa um aumento significativo da enzima. Necrose hepatocelular geralmente cursa com aumento transitório da fosfatase alcalina (WILLARD *et al.*, 1993).

4.2.1.4. Gama-glutamil transferase (GGT)

A γ -glutamiltransferase (GGT) está presente, principalmente, nas células epiteliais dos ductos renais e biliares (KRAMER e HOFFMANN, 1997), apresentando atividade sérica muito baixa em cães e gatos, quando comparada à de ruminantes (COLES, 1984). Também conhecida como gama-glutamil transpeptidase (GTP), é uma enzima de membrana, associada a numerosos tecidos (MEYER *et al.*, 1995) com exceção do músculo. Apresenta grande atividade nos rins e no fígado, mas somente aquela de origem hepática é normalmente encontrada no plasma, pois a de origem renal é excretada na urina. O aumento da atividade da enzima ocorre, em todas as espécies examinadas, após colestase. Em felinos, mas não em cães, pode ser utilizada no lugar da fosfatase alcalina, com maior sensibilidade e especificidade para o fígado. Em cães pode ser induzida pelo tratamento com prednisolona, sem causar colestase. A elevação de sua atividade sérica está relacionada com doenças hepáticas, especialmente aquelas que afetam o sistema de ductos biliares (THOMPSON e PAULI, 1981). A colestase provoca aumento na atividade sérica desta enzima, em todas as espécies (MEYER *et al.*, 1995; KRAMER e HOFFMANN, 1997) com melhor atividade diagnóstica que a fosfatase alcalina.

4.2.1.5 Lactato desidrogenase (LDH)

É uma enzima presente em vários tecidos, em particular no músculo esquelético, músculo cardíaco, fígado e eritrócitos, mas também nos rins, ossos e pulmões. Existem cinco isoenzimas conhecidas, que não são comumente analisadas nos laboratórios veterinários. Isoladamente a enzima não é específica para nenhum órgão devendo ser avaliada em conjunto com outras enzimas séricas a exemplo da AST e CK (THOMASSIAN *et al.*, 2007), conforme já citado anteriormente. Qualquer intensidade

de hemólise é prejudicial, pois o extravasamento de enzimas eritrocitárias incrementa a atividade total da LDH no plasma.

Segundo [HOFFMANN *et al.* \(1989\)](#) a LDH catalisa a reação reversível de oxidação do piruvato em L-lactato com o cofator NAD e é encontrada no coração, fígado, musculatura esquelética, rins e glóbulos vermelhos. A LDH juntamente com a AST e CK foram utilizadas por Garcia citado por [SCHEFFER e GONZÁLEZ \(2003\)](#), para monitorar a intensidade do exercício em cavalos crioulos. Em estudo realizado por [SOUTTO *et al.* \(2013\)](#) com cavalos de pólo suplementados com vitamina E e Selênio, houve pico na atividade sérica de LDH no grupo controle 24 h após o jogo evidenciando uma demora na remissão da atividade sérica de LDH nos animais não tratados com antioxidantes.

Lesões musculares de etiologias variadas podem estar relacionadas ao aumento da LDH. A deficiência de vitamina E e selênio e a mioglobínúria são causas de aumento de LDH ([HARVEY *et al.*, 1997](#); [KANEKO *et al.*, 2008](#)). [BALOGH *et al.* \(2001\)](#) demonstraram que, em cavalos de salto, a LDH aumentou imediatamente após o exercício e se manteve elevada após 24 horas, diferente da CK que teve um pico após o exercício, mas voltou aos valores basais após um dia. Por se apresentar como um bom indicador de lesão muscular, [GARCÍA *et al.* \(1999\)](#) utilizaram a LDH em conjunto com CK e AST para monitorar a intensidade de exercício de cavalos crioulos.

A LDH pode também ser utilizada para avaliar cardiomiopatias diversas (isquemia, endocardite bacteriana, dirofilariose, trombose aórtica e infarto do miocárdio). Normalmente a LDH aumenta menos rapidamente que a CK, mas também mantém os valores elevados por mais tempo. Após o infarto agudo do miocárdio, em humanos, a LDH atinge valores acima da referência após 16 horas, atingindo valores máximos em 40 horas e mantendo a atividade elevada por até 8 dias ([CHAPELLE, 1994](#)).

4.2.2. Outros produtos do metabolismo muscular, hepático e renal.

4.2.2.1 Creatinina

A creatinina é uma substância nitrogenada não-proteica ([FINCO, 1997](#)), excretada pela filtração glomerular ([COLES, 1984](#)). A creatinina plasmática é derivada, praticamente em sua totalidade, do catabolismo de creatina presente no tecido muscular. A creatina é um metabólito utilizado para armazenar energia no músculo, na forma de fosfocreatina, e sua degradação para creatinina ocorre de maneira constante, ao redor de

2% do total de creatina diariamente. A conversão de fosfocreatina é uma reação não enzimática e irreversível, dependente de fatores estequiométricos. A excreção de creatinina só se realiza por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada pelo organismo. Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência na funcionalidade renal (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A produção diária de creatinina é relativamente constante, não sendo influenciada por fatores extra-renais, como acontece com a uréia. Alguns pesquisadores consideram que a produção de creatinina é proporcional à massa muscular do indivíduo; entretanto, estudos em humanos mostram que a idade e o sexo influenciam sua concentração sérica, e não massa muscular corporal. Uma vez formada, a creatinina é excretada do organismo quase completamente por via renal durante a filtração glomerular e, qualquer anormalidade que diminua a velocidade do fluxo urinário resulta na elevação da sua concentração sérica (COLES, 1984). Em função da espécie e do sexo, pode haver secreção de pequena quantidade de creatinina nos túbulos renais, como em pacientes humanos do sexo masculino, porém, geralmente tal ocorrência tem importância clínica. Fatores como as citocinas, que provocam aumento do catabolismo muscular endógeno na caquexia causada por septicemia ou câncer, podem aumentar a liberação e a produção de creatinina (LASSEN e WEISER, 2007).

KANEKO *et al.* (1997) citam que valores de referência para creatinina em equinos estão compreendidos na faixa de 106 a 168 $\mu\text{mol/l}$ ou 1 a 2 mg/dL . Valores elevados de creatinina podem significar problemas agudos ou crônicos, e valores muito baixos podem significar distrofia muscular.

4.2.2.2 Lactato

Durante o exercício a energia não provem apenas de reações oxidativas. Reações como a glicólise anaeróbia consiste numa outra via de produção de ATP onde não se utiliza O_2 podendo, entretanto, ocorrer na presença de oxigênio, não sendo a anaerobiose uma condição para sua ocorrência. Envolve dez reações químicas, onde a quebra parcial de glicose ou do glicogênio muscular proporciona a formação de ATP de forma rápida, produzindo também o lactato (BOTTEON, 2012).

Dessa maneira, esta via fornece ATP rapidamente com baixa energia (2 mmol de ATP por mmol de unidade glicosil). O sistema lactato, no entanto, continua muito mais rápido do que a produção de energia aeróbica e compensa o menor rendimento de

energia molar sendo a principal fonte de energia em provas de salto, modalidade desportiva de alta intensidade e curta duração de atividade. O sistema lactato também produz piruvato e consome nicotinamida adenina (NADH). Realimentando o sistema de produção aeróbia de energia para que possa continuar, a célula dispõe de piruvato em excesso e regenera NAD^+ pela conversão de piruvato a lactato (ROBERGS *et al.*, 2004).

O lactato é produzido no citosol pelo ramo fermentativo da via glicolítica, através da redução de piruvato com a oxidação concomitante de NADH para NAD^+ , uma reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH). O lactato é transportado através da membrana com o auxílio de transportadores monocarboxilatos, que funcionam como symporters (transportador unidirecional) que move quantidades equimolares de monocarboxilatos, como piruvato, lactato e butirato, e H^+ (HALESTRAP e MEREDITH, 2004). Diversas células e tecidos, como células do fígado, células germinativas e neurônios, metabolizam lactato convertendo-o para piruvato através de LDH e depois convertendo o piruvato em glicogênio (no fígado) ou CO_2 (outros tecidos) (GLADDEN, 2004).

O lactato formado em fibras musculares ativas pode atingir fibras adjacentes altamente oxidativas, onde será utilizado como combustível e pode ser oxidado em CO_2 . Por outro lado, o lactato que provém de fibras ativas pode ser transportado para os capilares e em seguida, entrar na circulação e ser reconvertido a glicogênio no fígado (STANLEY *et al.*, 1985). A principal desvantagem da produção de lactato é a produção indireta de íons H na célula. Lactato é transportado para outros tecidos onde será reconvertido a piruvato, com consumo de H, e oxidado através do ciclo do ácido cítrico ou utilizado para gliconeogênese no fígado e nos rins. A acidez gerada inicialmente será neutralizada pelo consumo do lactato em outros tecidos (CONNETT *et al.*, 1984; BROOKS, 1986). Diversos fatores podem promover a elevação dos níveis de lactato no sangue, por exemplo, os níveis de lactato no sangue sobem com a alimentação, porém há um aumento muito maior durante um treinamento extenuante. Com o início do exercício, há uma enorme aceleração na velocidade de quebra do glicogênio do músculo (glicogenólise), na absorção de glicose e na quebra de glicose (glicólise) (BROOKS, 1986). Inicialmente o acúmulo intracelular de lactato é removido por transporte facilitado para a circulação sanguínea porém, a saturação deste mecanismo, resulta em um súbito aumento exponencial no acúmulo de lactato intracelular conhecido como limiar anaeróbico que geralmente ocorre quando a concentração plasmática de lactato atinge a concentração de 4 mmol/L (HYYPÄ e PÖSÖ, 1998).

O aumento da glicólise muscular gera um acúmulo de lactato, que por sua vez será liberado para o sangue. Embora o nível de lactato durante o exercício dependa de vários fatores, a duração e a intensidade do exercício são as determinantes principais. Grande parte da demanda do aumento de energia no início do exercício será suprida por fontes de energia não oxidativas, basicamente glicogenólise e glicólise. O lactato, contrastando com a glicose e outras substâncias orgânicas combustíveis é um substrato menor e mais prontamente substituível, locomovendo-se através da membrana celular por transporte facilitado e seu movimento não exige a presença de cofatores, tais como a insulina. Além disso, o lactato pode ser formado rapidamente no músculo em grandes quantidades e liberado na circulação geral. Por outro lado, as células musculares com grandes reservas de glicogênio não podem liberar quantidades significativas dessa fonte potencial de energia em forma de glicose, já que o músculo não contém uma enzima importante necessária para a produção de glicose livre que pode ser liberada no sangue (GLADDEN, 2004). Medicina Veterinária, a concentração de lactato tem sido empregada com um indicador da gravidade de doenças. Foi inversamente correlacionada com a sobrevivência de equinos com cólica (MOORE *et al.*, 1976) e posteriormente utilizada como um indicador de gravidade da cólica para cavalos (FURR *et al.*, 1995).

4.2.2.3 Ureia

A ureia é sintetizada no fígado a partir da amônia proveniente do catabolismo de aminoácidos. Os níveis de ureia são analisados em relação ao nível de proteína na dieta e ao funcionamento renal. A ureia é excretada principalmente pela urina e, em menor grau, pelo intestino. Na maioria dos animais, o nível de ureia é indicador de funcionamento renal (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A ureia no seu ciclo incorpora duas moléculas de amônia, cuja principal fonte provém do catabolismo proteico (FINCO, 1997). Sua dosagem deve ser realizada sempre que houver suspeita de redução do funcionamento renal (COLES, 1984). As mudanças nas concentrações da ureia no sangue podem ocorrer devido à dieta do animal, às alterações no fígado e nas funções renais e à mudança na taxa do catabolismo da proteína (FINCO, 1997).

O aumento plasmático da ureia pode ser por causas pré-renais, que antecede a filtração ou por causas pós-renais, como na obstrução urinária. A concentração de ureia está aumentada na falha cardíaca, no choque hipovolêmico, na hipotensão, na

desidratação e nas doenças renais (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002). A diminuição plasmática da ureia ocorre em insuficiência hepática (com aumento de amônia), na síndrome da má absorção, na sobreidratação e em dietas com nível baixo de proteínas (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002).

4.3 O Exercício de salto

Apesar de a velocidade e a duração da atividade durante provas de salto serem baixas, a contribuição energética é derivada de processos oxidativos (respiração aeróbica) e do metabolismo anaeróbico. A competição de saltos inclui um aquecimento de 30 minutos de exercício brando ou moderado com reações aeróbicas para produção de energia, seguidos de 2 minutos ou menos de exercício de alta intensidade, predominantemente anaeróbio havendo mais de uma fonte de obtenção de ATP (LEKEUX *et al.*, 1991).

A atividade de salto é um exercício bem exigente para o animal que demanda vários anos de treinamento para desenvolver todo o potencial de um cavalo (CLAYTON, 1991). O treino de saltadores envolve a utilização de exercícios periódicos que causam modificações estruturais, funcionais e comportamentais deixando os animais aptos à participar de competições (FERRAZ *et al.*, 2010). A performance do atleta é determinada por diferentes e interdependentes processos hematológicos, bioquímicos e fisiológicos (BERTONE *et al.*, 2004). Em cavalos de salto muitos estudos tem sido desenvolvidos com o propósito de identificar um padrão de algumas alterações fisiológicas, bioquímicas e hematológicas durante o treinamento e a atividade física (LEKEUX *et al.*, 1991; BARREY e VALETTE, 1993) mostrando significativas variações em alguns desses parâmetros após treino ou prova.

4.3.1 Exercício físico, formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

O interesse acerca dos mecanismos de geração e adaptação de radicais livres de oxigênio (RLO) ou espécies reativas de oxigênio (EROS) ao exercício aumentou significativamente a partir da demonstração de sua relação com o consumo de oxigênio. Esta correlação do exercício com a produção de EROS vem ganhando crescente espaço no estudo da fisiologia do exercício, especialmente na medicina esportiva equina.

As EROS são formadas pela redução incompleta do oxigênio, gerando espécies que apresentam alta reatividade para outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares e, até mesmo, o DNA. O exercício físico agudo, em função do incremento do consumo de oxigênio, promove o aumento da formação de EROS (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROS é maior que sua degradação resultando em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Desta forma, o estresse oxidativo (EO) ocorre quando há um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (SIES, 1986). Entretanto, o treinamento físico é capaz de gerar adaptações capazes de mitigar os efeitos deletérios provocados pelos EROS. Estas adaptações estão relacionadas a uma série de sistemas, dos quais os mais importantes são os sistemas enzimáticos antioxidantes, compostos pela superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004)).

4.3.1.1 Estresse oxidativo e Malondialdeído

Durante o exercício físico o aporte e o consumo de oxigênio nos músculos esqueléticos e tecidos aumentam levando a um incremento na produção de EROS. O exercício físico extenuante pode induzir ao estresse oxidativo (KINNUNEN *et al.*, 2005). O cavalo tem a habilidade única de aumentar em até sessenta vezes sua captação de oxigênio durante exercício intenso (ART e LEKEUX, 2005), o que resulta em maior produção mitocondrial de EROS (JI, 1999; ART e LEKEUX, 2005), consequentemente induzindo a peroxidação lipídica (DEKKERS *et al.*, 1996; CHIARADIA *et al.*, 1998) e expondo o equino ao estresse oxidativo induzido pelo exercício (BALOGH *et al.*, 2001). A musculatura esquelética pode estar sujeita a um grau de estresse oxidativo durante o exercício maior que o fígado ou o coração devido à produção de EROS (JI, 1999).

Os principais substratos alvos para os EROS são os ácidos graxos poli-insaturados da membrana fosfolipídica. A modificação desta membrana resulta em desorganização do esqueleto celular e de sua função. Um dos produtos finais mais conhecidos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), que serve como um confiável e mais comumente utilizado marcador do nível geral de peroxidação lipídica e da presença de estresse oxidativo (DEL RIO *et al.*, 2005; GROTTTO *et al.*, 2009). A

produção aumentada de EROS pode favorecer a lipoperoxidação da membrana celular diminuindo, entretanto, a integridade da membrana das células musculares (DEKKERS *et al.*, 1996; KIRSCHVINK *et al.*, 2008), o que pode incorrer em danos teciduais (ART e LEKEUX, 2005) e fadiga muscular (MARLIN *et al.*, 2002). Diversos relatos mostram a relação entre estresse oxidativo e danos à musculatura esquelética em equinos atletas (CHIARADIA *et al.*, 1998; FRANKIEWICZ-JÓZKO e SZARSKA, 2000; WHITE *et al.*, 2001; HARGREAVES *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2003).

Outro estudo de suplementação de vitamina E investigou o efeito de três dietas que proporcionaram diferentes níveis, deficiente, baixo e alto, de vitamina E ao longo de noventa dias em dezenove cavalos regularmente exercitados (SICILIANO *et al.*, 1997). Embora as concentrações séricas e musculares de vitamina E aumentassem em cavalos recebendo o regime de vitamina E baixo ou alto, as concentrações de substâncias reagentes com ácido tiobarbitúricos (TBARS) musculares permaneceram inalteradas, bem como as atividades de CK e de AST.

4.3.1.2 Determinação do MDA

O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular, tem uma cadeia curta (1,3-dicarbonil) e é um ácido moderadamente fraco ($pK_a = 4,46$). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos, a exemplo do ácido tiobarbitúrico (TBA), para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996). A sua condensação com o TBA forma produtos, usualmente em uma reação com pH baixo e temperaturas elevadas (80-100 °C), que podem ser determinados por absorvância. A reação não específica do MDA com grupos amino primários ocorre em várias biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, aminas e fosfolípidos) produzindo complexos 1:1, que são bases de Schiff conjugadas (JANERO, 1990).

O teste padrão, introduzido por Kohn e Liversedge, em 1944 (LIMA ADBALLA, 2001) é bastante popular porque é simples e rápido, porém inespecífico. Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura. Essa reação, chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)”, representa múltiplos

métodos que utilizam o TBA, formando o complexo MDA:TBA (1:2), $C_{11}H_8N_4S_2O_4 \cdot H_2O$ (P.M.=342,35), que tem absorção máxima em 532nm. Neste teste utiliza-se como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano ou tetraetoxipropano (YU *et al.*, 1986). A avaliação do MDA pelo teste com TBA não é específica, pois muitas outras substâncias que ocorrem em materiais biológicos também reagem com o TBA. Esta inespecificidade é particularmente importante em lipídeos contendo AGPI auto oxidados como produtos de decomposição secundária, incluindo complexa mistura de compostos saturados de cadeia curta (alcanos), insaturados (alcenos e alcadienos) e aldeídos monofuncionais, além de MDA. Alguns aldeídos monofuncionais também são reativos ao TBA, em meio ácido e à temperatura elevada utilizada no teste das TBARS, formando produtos derivados do TBA com um espectro no visível similar ao do complexo MDA: TBA (1:2). Portanto, o teste espectrofotométrico com o TBA pode medir variedades de espécies que absorvem em 532 nm. Outra possível interferência neste método deve-se à presença de metais de transição, o que possibilita uma geração de MDA durante a análise. É essencial incluir-se quantidade suficiente de antioxidante para prevenir a auto-oxidação dos lípidos e a subsequente formação de MDA, durante a fase de aquecimento do ensaio. Adicionalmente, é aconselhável também tratar os reagentes com quelantes de metais de transição para impedir a interferência destes. Outra desvantagem do teste das TBARS é a instabilidade do cromógeno, que absorve em 532 nm (FUKUNAGA *et al.*, 1995). Portanto, as condições do teste das TBARS influenciam na análise da lipoperoxidação. Quatro fatores importantes devem ser considerados neste teste: a influência das condições da reação e dos reagentes na resposta ao TBARS; a não especificidade do TBA para a reação com o MDA; a não exclusividade do MDA como produto final da lipoperoxidação e, finalmente, a impossibilidade de se distinguir o complexo MDA:TBA dos outros produtos reativos ao TBA por espectrofotometria (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

4.3.1.3 Exercício, treinamento e suplementação com antioxidantes

Desde que Davies e colegas de trabalho demonstraram em 1982 que o exercício físico gera radicais livres, o impacto do exercício físico e o treinamento sobre o equilíbrio oxidante/antioxidante tem sido amplamente investigado em roedores laboratoriais (LEEUWENBURGH e HEINECKE, 2001) e em humanos (SEN e

PACKER, 2000) As mudanças induzidas pelo exercício do equilíbrio oxidante/antioxidante são essencialmente decorrentes do aumento do transporte de elétrons mitocondriais nas células musculares (DI MEO e VENDITTI, 2001). Uma geração aumentada de ROS pode favorecer a peroxidação da membrana das células musculares e assim diminuir a integridade da membrana. As correlações positivas que foram detectadas entre o vazamento das enzimas musculares e os peróxidos lipídicos plasmáticos são compatíveis com esta hipótese (WILLIAMS *et al.*, 2004a).

Numerosos estudos mostraram que as alterações oxidantes/antioxidantes induzidas pelo exercício no exercício de cavalos variam em relação ao tipo de exercício (corrida, exercício de esteira padronizado, exercício de corrida padronizado, resistência) e os marcadores avaliados no sangue, embora geralmente seja acordado que o exercício induz alterações significativas do equilíbrio circulante oxidante-antioxidante. No entanto, existe controvérsia em termos de resultados pouco reproduzíveis e até contraditórios que sugerem que o design experimental, a aptidão dos cavalos, a abordagem analítica e os fatores ambientais influenciam fortemente os resultados dos estudos.

Outra descoberta interessante é o fato de que as alterações de antioxidantes (AOX) induzidas pelo exercício não aparecem necessariamente durante ou imediatamente após o exercício, mas que podem ser detectáveis de dezesseis a vinte e quatro horas depois da atividade (BALOGH *et al.*, 2001; MARLIN *et al.*, 2002; DE MOFFARTS *et al.*, 2004). Ainda não foi abordado se essas perturbações prolongadas do equilíbrio oxidante/antioxidante influenciam os episódios consecutivos do exercício, a exemplo da rotina de treinamento em dias consecutivos. No entanto, o treinamento pode influenciar positivamente a capacidade antioxidante do organismo. Na verdade, um aumento nos diferentes AOX, como vitamina C, ácido úrico, GPx (glutathione peroxidase) e SOD (superóxido dismutase), foi observado em cavalos mestiços após um período de doze semanas de treinamento aeróbico e anaeróbico, enquanto o aumento no consumo de oxigênio (medido como mudança de VO_2 máx.) foi positivamente correlacionado com o aumento da atividade da SOD de eritrócitos (DE MOFFARTS *et al.*, 2004). Embora o treinamento aumente o sistema de defesa antioxidante do organismo, períodos prolongados de treinamento e competições de corrida podem induzir distúrbios do equilíbrio oxidante/antioxidante (AVELLINI *et al.*, 1995; DE MOFFARTS *et al.*, 2005), que poderiam estar relacionados a inapropriado fornecimento nutricional de AOX. Na medicina esportiva humana, foi estabelecido que a necessidade

de vestígios e vitaminas é aumentada nos atletas (CLARKSON e THOMPSON, 2000; JENKINS, 2000). Os ratos que foram esgotados da glutathiona reduzida (GSH) mostraram ser menos tolerantes ao exercício do que os ratos não esgotados ou suplementados, sugerindo que uma deficiência antioxidante diminui o desempenho, enquanto a suplementação antioxidante em indivíduos não deficientes não melhora o desempenho (SEN *et al.*, 1994).

Conseqüentemente, os suplementos AOX parecem ser de interesse na prevenção de uma deficiência induzida por exercício (ou induzida por doença) entretanto, conforme já proposto e comprovado por diversas pesquisas, a suplementação não parece melhorar o desempenho. Os ensaios de suplementação de AOX em cavalos esportivos fornecem evidências de que distúrbios ou deficiências induzidas pelo exercício podem ser impedidas pelo menos parcialmente. Objetivando elucidar os efeitos já amplamente descritos e avaliados da suplementação, cabe citar uma série de ensaios significativos com as principais substâncias utilizadas como AOX na medicina esportiva equina.

A primeira delas é a vitamina E. o primeiro relatório sobre o efeito do estado da vitamina E sobre a peroxidação lipídica em cavalos exercitados foi publicado em 1992 (MCMENIMAN e HINTZ, 1992). Foi realizada suplementação oral de vitamina E de pôneis de polo submetidos a testes de exercícios de esteira e avaliada a relação entre a concentração de vitamina E no sangue e a peroxidação lipídica (avaliada por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS). A suplementação sob a forma de óleo de milho aumentou a concentração plasmática de vitamina E e uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de vitamina E e TBARS foi encontrada pré e pós-exercício. Curiosamente, o aumento da atividade de GPx e SOD de sangue total e um aumento da vitamina C plasmática foram registrados após a suplementação de vitamina E, o que sugeriu aos autores que os ácidos graxos poliinsaturados fornecidos pelo óleo de milho aumentavam o peso pró-oxidativo, independentemente da suplementação de vitamina E. Alternativamente, pode-se hipotetizar que a suplementação de vitamina E aumentou a reciclagem de AOX e a melhoria dos efeitos AOX sinérgicos.

Em outro estudo, [AVELLINI *et al.* \(1999\)](#) investigaram o efeito da vitamina E em combinação com Selênio em onze cavalos de corrida submetidos a um período de treinamento e suplementação de setenta dias. Neste, o treinamento combinado com suplementação levou a uma geração significativamente menor de MDA sérico induzida por exercício e, a capacidade de captura total de radicais de peróxido do plasma foi significativamente aumentada. Os níveis de vitamina E e MDA foram, como com a

vitamina E e TBARS no estudo de [MCMENIMAN e HINTZ \(1992\)](#), significativamente e negativamente correlacionados. Embora este estudo não tenha permitido a dissociação entre os efeitos de treinamento e suplementação, demonstrou uma clara modulação do equilíbrio oxidante/antioxidante, que está de acordo com o estudo de [DE MOFFARTS *et al.* \(2004\)](#), que investigou o efeito da intensidade do exercício e do treinamento em cavalos de raça padrão. Já no trabalho de [WILLIAMS e CARLUCCI \(2006\)](#) suplementação intensa de vitamina E dos cavalos não conseguiu melhorar a modulação das alterações oxidativas induzidas pelo exercício em comparação com a suplementação basal. Além disso, a concentração plasmática de vitamina A (β -caroteno) diminuiu, possivelmente devido a um efeito inibitório da vitamina E no metabolismo da vitamina A.

O efeito da suplementação de vitamina C também foi investigado em cavalos de corrida (WHITE *et al.*, 2001) e cavalos de resistência (WILLIAMS *et al.*, 2004a). No primeiro estudo, 5g de vitamina C foram injetados por via intravenosa em 14 cavalos puro sangue antes de uma corrida e 30 cavalos correram a corrida sem nenhum tratamento. A vitamina C aumentou os níveis plasmáticos de vitamina C, impediu o aumento induzido pelo exercício de TBARS no plasma e manteve a capacidade antioxidante plasmática e a reatividade antioxidante total. A atividade sérica de CK aumentou em cavalos tratados e não tratados. No segundo estudo, 46 cavalos de resistência foram suplementados por 3 semanas antes de uma corrida de resistência de 80 km com vitamina E (n = 23 animais) ou uma combinação de vitamina E e vitamina C (n = 23 animais) (WILLIAMS *et al.*, 2004a). Considerando que os níveis de vitamina C permaneceram maiores em cavalos que receberam apenas vitamina E, não foram relatadas diferenças relacionadas ao tratamento com relação aos peróxidos lipídicos, GSH de glóbulos vermelhos, atividade de GPx de glóbulos vermelhos e de glóbulos brancos e a atividade de CK e AST no soro. No entanto, correlações positivas entre peróxidos lipídicos plasmáticos, CK e AST, sugerindo associação entre vazamento muscular e peroxidação lipídica induzida pelo exercício.

Em estudo comparativo entre a suplementação de ácido lipóico versus a de vitamina E, utilizou-se cavalos de enduro subdivididos em três grupos, controle, vitamina E e ácido lipóico, com quatro animais cada. Glóbulos vermelhos e brancos, atividade da GPx, apoptose de células brancas, GSH de sangue total, CK plasmático, AST, ácido láctico, vitamina C e E foram avaliados após 2 semanas de suplementação oral imediatamente antes, durante e depois de uma corrida de resistência de 55 km

(WILLIAMS *et al.*, 2004b). Cavalos suplementados com ácido lipóico e vitamina E tiveram níveis mais elevados de vitamina E e vitamina C do que cavalos do grupo controle, bem como concentrações superiores de GSH no sangue total e atividade de GPx nos glóbulos brancos, enquanto que toda atividade da GPx no sangue total foi menor. Esses resultados ilustram o efeito de reciclagem e eliminação do ácido lipóico (BAST e HAENEN, 2003) e forneceu evidências de que a modulação do sistema de glutathiona, que é um sistema antioxidante de primordial importância de eritrócitos e células musculares (JI, 1999), podem ser encontrados em cavalos. Além disso, isso, o estudo mostrou que o aumento de CK e de ácido láctico induzido pelo exercício foi menor em cavalos suplementados, enquanto que a atividade de AST foi menor apenas no grupo suplementado com ácido lipóico. No entanto, a apoptose de glóbulos brancos induzida pelo exercício diminuiu em ambos os grupos suplementados.

4.4 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína, um precursor da glutathiona reduzida, esteve em uso clínico por mais de 30 anos principalmente como um mucolítico. Além da ação mucolítica, a NAC é estudada e utilizada em condições caracterizadas por diminuição da GSH ou em situações em que há aumentado grau de estresse oxidativo tais como infecção pelo vírus da imunodeficiência viral humana, câncer e doença cardíaca. Devido à sua atividade hepatoprotetora, administração oral e intravenosa de NAC tem sido amplamente utilizada no tratamento do envenenamento por paracetamol (KELLY, 1998).

A NAC é um tiol que possui a fórmula química $C_5H_9NO_3S$ (ZIMENT, 1987). Em humanos é rapidamente absorvida após uma dose oral, no entanto, o extenso metabolismo da primeira passagem pelas células do intestino delgado e do fígado resulta na incorporação de NAC em cadeias de peptídeos de proteínas e na formação de uma variedade de metabólitos da NAC. Apenas uma pequena porcentagem da molécula chega intacta ao plasma e conseqüentemente aos tecidos (DE CARO *et al.*, 1989).

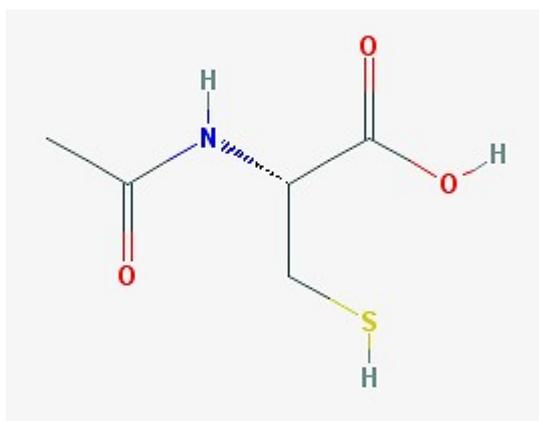


Figura 2: Fórmula química da N-acetilcisteína.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=12035>).

O grupo sulfidrila é responsável por grande parte da atividade metabólica da NAC já que o grupo amino acetil-substituído torna a molécula mais estável contra oxidação. Os resultados experimentais indicam que no fluido gástrico a maioria dos compostos contendo tiol são relativamente instáveis, no entanto, no fluido intestinal apenas dezesseis por cento do NAC é oxidado, enquanto a oxidação de outros compostos que contêm moléculas de tiol é entre 75 e 100 por cento (BONANOMI e GAZZANIGA, 1979).

Apenas três por cento da NAC marcada radioativamente é excretada nas fezes após a administração oral, indicando uma absorção quase completa de NAC e seus metabólitos (BORGSTRÖM *et al.*, 1986). O pico de concentração plasmática de NAC é atingido em menos de uma hora após a administração oral (BORGSTRÖM *et al.*, 1986; DE CARO *et al.*, 1989). Em humanos, a meia vida plasmática da NAC livre é estimada em cerca de 2,15 horas e a NAC praticamente não é detectável de dez a doze horas após administração (DE CARO *et al.*, 1989). Entre treze e trinta e oito por cento de uma dose oral de NAC marcada radioativamente é recuperada na urina dentro de 24 horas (BORGSTRÖM *et al.*, 1986).

Conforme estudo realizado por [LEELARUNGRAYUB *et al.* \(2011\)](#) em estudo que teve por objetivo investigar em humanos os efeitos da ingestão de curto prazo (7 dias) de 1.200mg/dia de NAC sobre a fadiga muscular, e sua capacidade de controlar a CK e lactato em homens sedentários, foi verificado que esta droga ajuda a proteger da fadiga muscular e pode manter a capacidade antioxidante após exercício físico intenso, no entanto, não influencia nos valores de CK.

Evidências prévias têm demonstrado que o lactato não afeta a fadiga muscular mas que o fosfato inorgânico do fosfato de creatina é sua principal causa (WESTERBLAD *et al.*, 2002). Além disso, a fadiga muscular pode estar relacionada à incremento de radicais livres nas fibras musculares esqueléticas. Estudos recentes têm demonstrado que o removedor de radicais livres, NAC, pode postergar a fadiga muscular (SHINDOH *et al.*, 1990).

4.4.1 N-acetilcisteína em equinos

Para diversas espécies, bem como para equinos, a NAC possui uma grande possibilidade de aplicações clínicas. Como agente mucolítico interrompe as ligações dissulfeto entre os polímeros de mucina, reduzindo assim a viscosidade do muco. Ainda, múltiplos estudos apoiam suas propriedades benéficas antioxidativas, especialmente em doenças inflamatórias crônicas (KASIELSKI e NOWAK, 2001; ZUIN *et al.*, 2005; ESTANY *et al.*, 2007; DURU *et al.*, 2008). Além disso, a NAC possui algumas propriedades antimicrobianas (MÅRDH e CEDERLUND, 1993), cabendo ressaltar que o NAC tem sido usado para tratar doenças respiratórias, como pneumonia, pneumonia por aspiração de mecônio em neonatos equinos (MORRESEY, 2008) e fibrose cística pulmonar em humanos. A NAC também diminui a formação de biofilmes e o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* (PEREZ-GIRALDO *et al.*, 1997). Há ainda relatos de uso da NAC na manutenção da viabilidade uterina em éguas reprodutoras (GORES-LINDHOLM *et al.*, 2013).

4.4.2 N-acetilcisteína e estresse oxidativo

O grupo tiol desempenha importante no sistema biológico. Este grupo está presente em uma série de proteínas e não proteínas como a GSH, que é submetida a interações tiol-dissulfídio para controlar o estresse induzido por oxidação. A peroxidação de lipídios insaturados da membrana é causada por superóxido, H₂O₂ e HO levando a danos irreversíveis inativando proteínas chave e enzimas presentes no retículo sarcoplasmático e na cadeia respiratória na mitocôndria (SHI *et al.*, 2009). Foi proposto há tempos que biotióis tais como GSH, glutamyl-cisteína, homocisteína, cisteína e NAC podem ser úteis, por exemplo, na diminuição do estresse oxidativo agudo causado por agentes quimioterápicos (SHI *et al.*, 2009).

Apesar de a NAC ser capaz de remover diretamente radicais livres as taxas de sua reação direta com EROS é muitas ordens de grandeza inferiores às taxas de enzimas

antioxidantes tais como superóxido dismutase e catalase (JOHNES, 2003). A NAC é prontamente hidrolisada a cisteína, precursora do biotiol glutationa, esta, por sua vez, é hidrolisada em uma reação de dois passos envolvendo as enzimas γ -glutamilcisteína ligase e a γ -glutamilcisteína sintetase (MEISTER, 1995). A NAC é um removedor indireto de radicais livres uma vez que aumenta os níveis de glutationa que, por sua vez, elimina diretamente radicais livres através da enzima glutationa peroxidase (UNVERFERTH *et al.*, 1985).

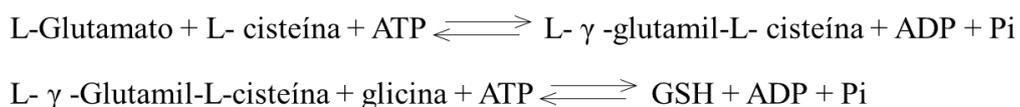


Figura 3: Reações através das quais a cisteína constituirá a glutationa.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente o Protocolo Experimental deste projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP-UFRRJ) protocolado 1180260517.

Neste estudo foram realizadas coletas de amostras de sangue e análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca. A coleta de sangue foi feita com o propósito de serem dosadas enzimas, proteínas e produtos do metabolismo muscular, renal e hepático a fim de correlacionar os valores obtidos a possíveis lesões hepáticas, renais e/ou musculares advindas do tratamento com a NAC e do esforço aos quais os animais foram submetidos. A avaliação da VFC foi realizada para identificar quais foram as alterações no equilíbrio autonômico do coração antes e após exercício físico, com e sem a utilização de NAC.

5.1 Animais

Foram utilizados neste estudo sete equinos atletas adultos, pertencentes ao Exército Brasileiro de ambos os sexos, pesando $557,14 \pm 44,99$ kg com idade média de $14,43 \pm 3,64$ anos, sendo dois machos e cinco fêmeas, praticantes de “Hipismo Clássico– Modalidade Salto”. Estes cavalos eram mantidos em baias individuais, bem ventiladas, com água no cocho *ad libitum* e eram alimentados com feno, alfafa, capim fresco e ração distribuídos em seis diferentes horários de alimentação, levados em consideração para que as aferições de dados cardíacos não coincidissem com os horários de refeição.

Os animais eram treinados e habitualmente realizavam treinos e provas de salto, que serviram para a coleta de dados. Esta modalidade do hipismo foi escolhida pois consiste de uma pista com 12 obstáculos variados de moderado a alto grau de dificuldade, dispostos na altura de 1 metro, recrutando assim vias metabólicas aeróbicas e anaeróbicas de obtenção de energia.

5.2 Protocolo Experimental

O grupo de animais foi submetido a apenas um tratamento com N-Acetilcisteína sendo os equinos avaliados em diferentes momentos com o decorrer do tempo. A cada novo momento de avaliação o mesmo grupo de sete animais receberá um diferente nome, à saber:

1. **Grupo Basal (BASAL)** – Coleta de dados (sangue e monitorização cardíaca) basais realizada com os animais dentro de suas respectivas baias, sem tratamento com a NAC.
2. **Grupo Exercício (EX)** – Coleta de dados (sangue e monitorização cardíaca) realizada logo após término de atividade física (prova hípica de saltos) sem tratamento com a NAC.
3. **Grupo N-Acetilcisteína (NAC)** – Uma semana após a coleta Exercício, os animais iniciaram tratamento com N-Acetilcisteína por via oral, duas vezes ao dia, durante 14 dias. A coleta de dados (sangue e monitorização cardíaca) basais sob influência de NAC foi realizada com os animais em repouso dentro de suas respectivas baias após terem sido tratados com NAC,
4. **Grupo N-Acetilcisteína+Exercício (NAC+EX)** - Coleta de dados (sangue e monitorização cardíaca) realizada logo após término de atividade física decorrida no dia seguinte a Coleta NAC.

5.2.1 Tratamento com N-acetilcisteína

Os cavalos dos grupos NAC e NAC+EX receberam, por via oral, a dose de 10mg.Kg⁻¹ através de solução contendo NAC na concentração 200mg.mL⁻¹.

5.2.2 Exercícios

Os animais dos grupos exercício (EX e NAC+EX), após 25 minutos de aquecimento, saltaram em pistas com percursos de mesmo traçado e com obstáculos dispostos todos a altura de 1,00 metro.

5.2.2 Delineamento experimental



Coleta de Dados (Sangue e Monitorização cardíaca):

M1 - Coleta 1: Basal em repouso

M2 – Coleta 2: Quinze minutos após exercício de salto

INac – Início do tratamento com NAC.

M3 – Coleta 3: Realizada com os animais em repouso após 14 dias de administração de NAC por via oral duas vezes ao dia

M4 – Coleta 4: Realizada quinze minutos após o exercício, ao fim do tratamento com NAC.

5.3 Avaliações bioquímicas

Com as amostras de sangue foi possível avaliarmos as alterações induzidas pelo exercício nos seguintes parâmetros:

5.3.1. Coleta das amostras de sangue

As coletas de sangue foram realizadas em quatro momentos (M1 a M4). As amostras foram classificadas em 4 diferentes grupos: Grupo Basal, Grupo EX, Grupo NAC e Grupo NAC+EX. As amostras foram obtidas através de punção da veia jugular com agulha para coleta à vácuo calibre 21G. Em cada momento o sangue era recolhido à vácuo diretamente em três diferentes tubos. Para obtenção de plasma utilizou-se dois diferentes tubos contendo anticoagulante, Fluoreto de sódio + EDTA e Heparina. Para obtenção de soro foram utilizados tubos contendo acelerador de coagulação. As amostras foram em seguida centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 20 minutos para obtenção de plasma e soro, sendo estes produtos titulados e acondicionados em eppendorfs em alíquotas de 1mL para então serem resfriadas e armazenadas em freezer a -20°C para posteriormente serem armazenadas em freezer a -80°C.

Nas amostras de soro, foram realizadas as determinações das concentrações de creatinina, atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase, creatinina, creatinoquinase, fosfatase alcalina, gama glutamil transferase, lactato desidrogenase e

uréia. As amostras de sangue colhidas com Fluoreto de sódio+EDTA, foram empregadas na determinação das concentrações plasmáticas de lactato.

Para a obtenção dos resultados bioquímicos, as amostras de soro e de plasma com lactato foram submetidas à avaliação automática no equipamento Labmax 240. Na Tabela 2 estão correlacionadas as metodologias aplicadas a cada parâmetro avaliado.

Para obtenção de plasma utilizado na avaliação de Malondialdeído, utilizou-se as amostras derivadas do sangue coletado com o tubo contendo anticoagulante heparina. Nesta análise utilizou-se metodologia descrita por [FELDMAN \(2004\)](#).

| <i>METODOLOGIA</i> | <i>PARÂMETRO AVALIADO</i> |
|--|---|
| Ensaio Cinético Ultravioleta | Aspartato Aminotransferase (AST); Creatina Fosfoquinase (CK); Lactato Desidrogenase (LDH); Uréia |
| Ensaio Cinético De Dois Pontos | Creatinina |
| Ensaio Cinético Colorimétrico | Fosfatase alcalina (FA); Gama Glutamil Transferase (GGT) |
| Ensaio De Ponto Final | Lactato |
| Teste das Substâncias Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico | Malondialdeído |

Tabela 2: Metodologias utilizadas para as análises e respectivos parâmetros analisados.

5.4 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

A análise da variabilidade da frequência cardíaca foi feita com o monitor cardíaco “Polar Equine RS800”, utilizado para a obtenção de traçado eletrocardiográfico e, a variabilidade da frequência cardíaca, pelo método de Transformada Rápida de Fourier, através de software específico (Kubios HRV, versão 2.1, Finlândia). A coleta de dados do Grupo Basal foi realizada quatorze dias antes de prova de salto. Já a coleta do grupo Exercício (EX) foi realizada instantes após término de prova de salto de obstáculos. Quatorze dias após o início da administração de NAC, com o animal em repouso obtivemos dados da VFC de cada animal após o tratamento com NAC. Finalmente, a coleta de dados do Grupo NAC+EX foi realizada no dia seguinte ao dia final da administração de NAC com o animal em repouso já após realização de atividade física, para ser aferida a VFC de cada animal após exercício

realizado. Não houve motivos para que a VFC fosse aferida durante exercício máximo pois de acordo com estudos já realizados, a VFC só provê informações sobre o controle autonômico do coração durante exercício moderado (PHYSICK-SHEARD, P. W. *et al.*, 2000; COTTIN *et al.*, 2005).

Após a obtenção de dados com o monitor Polar, do mesmo foram extraídos dado com auxílio do programa Polar Equine Pro Trainer 5 Equine Edition. Os dados oriundos deste sistema foram então detalhadamente analisados com o software finlandês Kubios HRV, versão 2.1. As recomendações utilizadas para realizar a análise de variabilidade da frequência através da Transformada Rápida de Fourier (TRF) incluíram o uso de trechos de 5 minutos do tacograma. O número de pontos usado para o TRF influencia a potência da frequência mais alta bem como a potência observada em diferentes bandas de frequência (VON BORELL *et al.*, 2007). No software Kubios foram definidas as faixas de frequência para análise de muito baixa frequência (MBF 0 - 0.01 Hz), baixa frequência (BF 0.01 - 0.07 Hz) e alta frequência AF 0.07 - 0.5 Hz, com 256 pontos/Hz no domínio de frequência e 4Hz de taxa de interpolação conforme já utilizado em outros estudos (VILLAS-BOAS, 2016), (PHYSICK-SHEARD, P. *et al.*, 2000)

5.5 Análises Estatísticas

As avaliações estatísticas foram realizadas em dois diferentes softwares: Graph Pad Prism e Stat. O teste estatístico utilizado foi o Anova One Way para medidas repetidas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca

O achado mais importante do presente estudo foi a observação de que a N-acetilcisteína (NAC) interfere na modulação autonômica cardíaca alterando a variabilidade da frequência cardíaca no período de recuperação de exercício de salto em equinos. Este efeito caracterizou-se pelo aumento do espectro de alta frequência (AF) e diminuição do espectro de baixa frequência (BF) que caracterizam respectivamente a modulação parassimpática e simpática sobre o coração. Como esperado, o balanço autonômico nesse período, analisado aqui em termos da relação BF/AF normalizada, diminuiu, o que sugere um balanço autonômico maior em direção ao parassimpático até mesmo maior do que aquele observado no estado de repouso dos animais, uma vez que esses valores foram significativamente menores do que os do controle (animais em repouso na baía, seja com ou sem tratamento com NAC).

Uma limitação importante desse estudo foi a impossibilidade do registro eletrocardiográfico durante o exercício de saltos por questões técnicas, como a falta de contato dos eletrodos, interferências e a alta frequência de transientes no registro eletrocardiográfico inviabilizando qualquer tipo de análise. Dessa forma, não se pode avaliar o papel da NAC na modulação autonômica trans-exercício. Estudos futuros melhorando a técnica de registro nessa circunstância serão necessários para melhor compreensão do efeito da NAC no exercício.

De qualquer forma, o objetivo principal desse estudo foi investigar a participação da NAC na modulação autonômica cardíaca no período de recuperação (pós-exercício) uma vez que a capacidade de retomada dos parâmetros cardiovasculares ao estado basal em curto espaço de tempo pode ser considerada um bom indicio de adaptação ao exercício (YU *et al.*, 2013). Nesse contexto, e de forma interessante, os animais quando tratados com NAC apresentaram aumento da modulação vagal em relação a eles mesmos quando não tratados com NAC no período de recuperação do exercício, sem alterar de forma significativa a frequência cardíaca, pois, independentemente do tratamento com a NAC, em ambas as situações experimentais (período de recuperação com ou sem NAC) as frequências cardíacas se mantiveram elevadas em relação aos controles (animais em repouso com ou sem NAC). O fato de a VFC no domínio da frequência ter sido alterada sem modificação da frequência cardíaca, aumenta a importância da utilização da análise espectral nessas situações pois

revela informação adicional importante que a simples análise da frequência cardíaca não revelaria.

Considerando que este estudo foi realizado “a campo” em situação cotidiana dos animais, isto é, exercício de salto em equinos atletas do exército brasileiro, fica clara a impossibilidade de realização de estudos invasivos com eutanásia para coleta e obtenção de tecidos para análises mais profundas acerca dos possíveis mecanismos que fundamentem os efeitos da NAC na modulação da VFC. Portanto, estudos futuros em animais de laboratório em condição de exercício físico poderão ser importantes para maior compreensão do mecanismo de ação da NAC na modulação autonômica.

No entanto, dados do nosso laboratório mostram que o tratamento de ratos submetidos ao infarto do miocárdio por meio da oclusão permanente da artéria coronária esquerda com NAC, alterou a modulação simpato-vagal em direção ao vago e melhorou os índices de contractilidade miocárdica analisados por meio de ecodopplercardiografia. Embora sejam dois modelos completamente distintos (equinos submetidos ao exercício físico vs. ratos submetidos ao infarto do miocárdio), possuem em comum a hiperatividade simpática e o mesmo efeito modulador da NAC atuando nessas duas condições distintas.

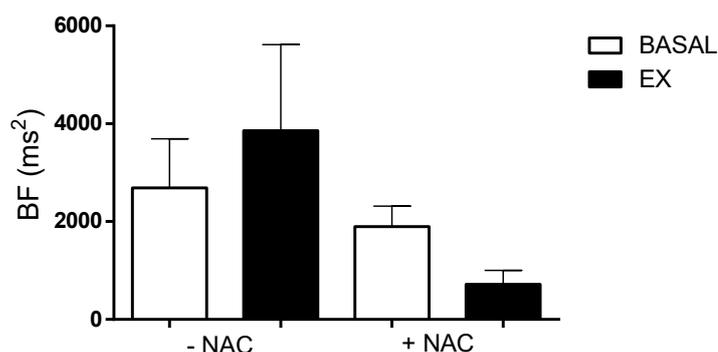
Procurando fundamentação bioquímica/molecular para o efeito da NAC, foi observado em nosso estudo com ratos infartados aumento da atividade da Glutathione peroxidase (principal enzima antioxidante) e redução de produtos pró-oxidantes como o peróxido de hidrogênio em corações de ratos infartados tratados com NAC durante 28 dias pós-infarto (Costa CRM et al., dados não publicados). Embora seja difícil relacionar o efeito local da NAC no coração com a modulação autonômica, mesmo em nível experimental, é possível especular sobre o efeito da NAC no sistema nervoso central, considerando seu poder de ultrapassar a barreira hematoencefálica. [YU et al. \(2013\)](#), utilizando o mesmo modelo de infarto do miocárdio em ratos, demonstraram que o aumento da atividade simpática pós-infarto foi induzido por estresse oxidativo gerado no núcleo paraventricular hipotalâmico e mediado por angiotensina II e pela via NF-kB. Portanto, é inevitável supor que a diminuição do estresse oxidativo, não só no coração como provavelmente no SNC, pode ter sido responsável pelo aumento da modulação vagal/diminuição da modulação simpática e conseqüentemente melhora nos índices de performance cardíaca dos ratos infartados. Se isso pode ser extrapolado para os equinos atletas, futuros estudos serão necessários.

Nesse estudo em equinos atletas não avaliamos quaisquer parâmetros de performance, portanto nada se pode inferir sobre a relação entre o aumento da modulação parassimpática/diminuição da simpática na recuperação pós-exercício com melhora adaptativa ou aumento de rendimento ao exercício induzido pela NAC. Se as alterações autonômicas induzidas pela NAC nesse estudo são duradouras, e mais, se essas alterações em períodos mais prolongados poderão interferir com parâmetros relativos, por exemplo, a maior adaptação ou aceleração da adaptação ao exercício, outros protocolos experimentais deverão ser utilizados em futuros estudos para testar essa(s) hipótese(s).

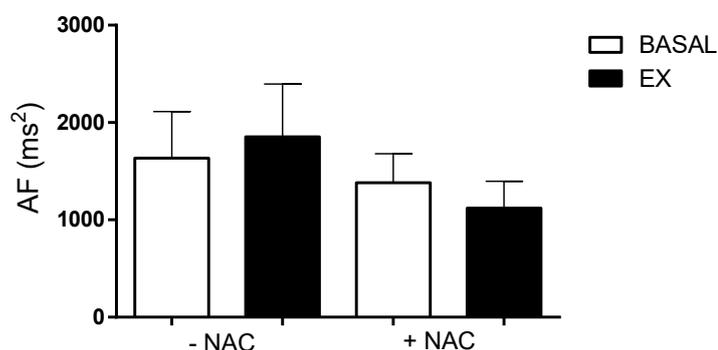
6.1.1 Domínio da Frequência - Transformada Rápida de Fourier (TRF)

6.1.1.1 Baixa Frequência (BF) e Alta Frequência (AF)

Para BF, não houve diferença significativa entre os grupos testados.



Para AF, também não houve diferença significativa entre os grupos testados.



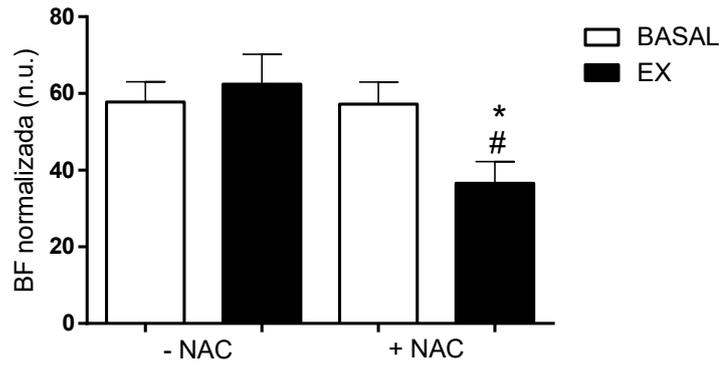
A medição dos componentes de potência BF e AF geralmente é feita em valores absolutos de potência (ms²). BF e AF também podem ser medidos em unidades normalizadas (u.n.) que, representam o valor relativo de cada componente de potência em proporção à potência total menos o componente MBF. A representação de BF e AF

em u.n. enfatiza o comportamento controlado e equilibrado dos dois ramos do sistema nervoso autônomo. A normalização tende a minimizar o efeito das mudanças no poder total nos valores dos componentes BF e AF, motivo pelo qual também avaliamos a razão entre BF u.n. e AF u.n.. (BF/AF u.n.). e, curiosamente, obtivemos gráfico muito similar ao obtido para a Potência Total. No entanto, na análise BF/AF normalizada, houve diferença significativa entre os grupos NAC+EX vs. BASAL e, cabe ressaltar veementemente, entre os grupos NAC+EX e EX. Chama à atenção esta diferença ter sido significativa entre os grupos em que os animais foram submetidos à exercício e não ter sido estatística entre os grupos em repouso (BASAL e NAC). Isto dá espaço para deduzirmos que, somando-se ao fato de ter havido uma diminuição na entrada simpática e aumento na parassimpática após o exercício, estas foram ainda mais acentuadas devido ao uso da NAC. Tal fato corrobora a teoria de que a NAC é realmente capaz de alterar a inervação simpática não apenas, como já proposto por [LEE *et al.* \(2009\)](#), após infarto em ratos, como também, pelo observado neste estudo, em equinos sadios após exercício. Isto é de grande importância pois há relatos de que a atividade parassimpática deprimida durante o exercício ou uma deficiente recuperação parassimpática após o exercício pode resultar em aumento do risco de morte súbita cardíaca. Por outro lado, a atividade parasimpática aumentada pode ser protetora contra a morte súbita ([VANOLI *et al.*, 1991 369](#)).

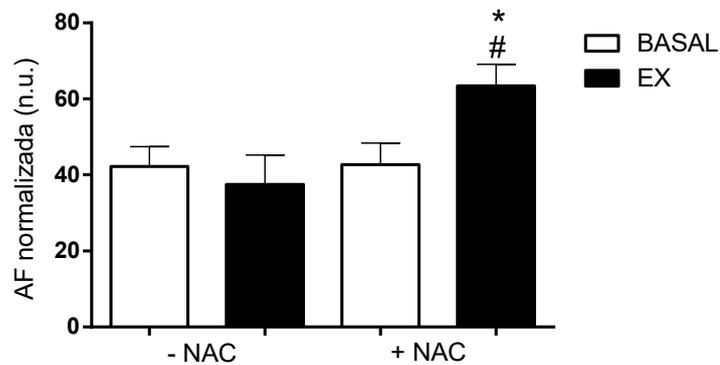
Neste estudo também foram observados os valores médios e respectivos desvios padrão de BF/AF em comparação a outros estudos e foi constatado que os animais deste trabalho apresentaram para a relação BF/AF ($1,73 \pm 1,38$) valores similares aos de outros estudos em humanos, ratos e em cavalos ([PAGANI *et al.*, 1986](#); [KUWAHARA *et al.*, 1996](#); [TASK-FORCE, 1996](#)).

6.1.1.2 BF Normalizada e AF Normalizada

Houve diferença significativa entre os grupos EX e NAC+EX ($P=0,003$), BASAL e NAC+EX ($P<0,001$) e NAC e NAC+EX ($P<0,001$).



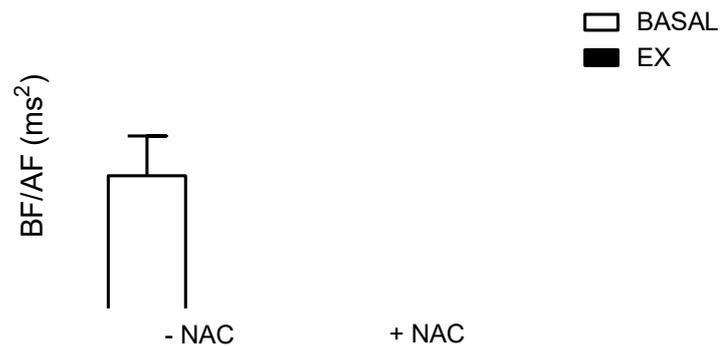
Para AF também houve diferença significativa entre os grupos NAC+EX e EX ($P= 0,002$), NAC+EX e BASAL ($P<0,001$) e NAC+EX e NAC ($P<0,001$).



A representação de BF e AF em unidades normalizadas enfatiza o comportamento controlado e equilibrado dos dois ramos do sistema nervoso autônomo. A normalização tende a minimizar o efeito das mudanças no poder total nos valores dos componentes BF e AF e, por este motivo realizamos a avaliação destes componentes normalizados tendo sido marcante o aumento da atividade parassimpática (AF n.u.) no grupo tratado com NAC após o exercício (NAC+EX) em relação ao grupo apenas exercitado (EX). Tal achado se mostra sobremodo interessante pois conforme já citado por [VANOLI et al. \(1991\)](#), uma atividade parassimpática aumentada pode ser preventiva de morte súbita.

6.1.1.3 BF/AF

Para BF/AF, não houve diferença significativa entre os grupos testados.



O fato de a relação BF/AF não ter variado significativamente não define os resultados desta pesquisa como ausentes de importância pois, o valor de BF em ms^2 , conforme já mencionado, sofre outras influências. Afirmar que a razão entre estes dois valores poderia estar isenta destas interferências ou, ainda, ir além e acreditar que BF/AF representa o balanço simpato-vagal é simplificar demais algo que tem muita complexidade conforme já foi colocado em pauta por [BILLMAN \(2013\)](#). A hipótese de que a razão BF/AF reflete com precisão o equilíbrio simpato-vagal repousa sobre vários pressupostos inter-relacionados da seguinte forma (modificado de (ECKBERG, 1997): (1) A modulação simpática cardíaca é um fator principal, se não o exclusivo, responsável pelo pico de BF do espectro de potência da frequência cardíaca; (2) a modulação parassimpática cardíaca é exclusivamente responsável pelo pico de AF do espectro de potência da frequência cardíaca; (3) doença ou desafios fisiológicos provocam mudanças recíprocas nas modulações simpática e parassimpática cardíacas (ou seja, o aumento da modulação parassimpática cardíaca é sempre acompanhada de reduções correspondentes na atividade do nervo simpático cardíaco e vice-versa); e (4) há uma interação linear simples entre os efeitos da atividade da inervação cardíaca simpática e da parassimpática na variabilidade da frequência cardíaca (VFC).

Com base nestas premissas, Pagani e colaboradores propuseram que a relação entre BF e AF (BF / AF) pudesse ser utilizada para quantificar a mudança de relação entre as modulações simpática e parassimpática (isto é, o equilíbrio simpato-vagal) (PAGANI *et al.*, 1984; PAGANI *et al.*, 1986; MALLIANI *et al.*, 1991) em saúde e na doença. No entanto, este conceito já foi desafiado (KINGWELL *et al.*, 1994; KOH *et al.*, 1994); HOPF *ET AL.*, 1995; ECKBERG, 1997; HOULE E BILLMAN, 1999; (BILLMAN, 2011). Apesar das limitações sérias e amplamente subestimadas, a relação BF/AF ganhou ampla aceitação como uma ferramenta para avaliar a regulação autonômica cardiovascular, onde os aumentos no BF/AF assumem que refletem uma

mudança para "dominância simpática" e as diminuições nesse índice correspondem a uma "dominância parassimpática".

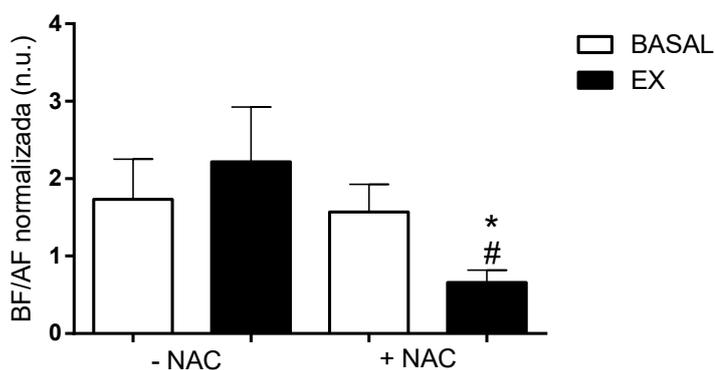
Portanto, é vital avaliar de maneira crítica os pressupostos sobre os quais este conceito se baseia. Conforme observado anteriormente, a análise de VFC geralmente revela dois ou mais picos, menor frequência (BF) e um pico de frequência mais alta (AF), que frequentemente se supõe que correspondem à modulação neuronal simpática e parassimpática cardíacas, respectivamente (PAGANI *et al.*, 1984; PAGANI *et al.*, 1986; MALLIANI *et al.*, 1991). No entanto, evidências demonstram claramente que essa suposição é ingênua e simplifica bastante as complexas interações não-lineares entre as divisões simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo (BERNTSON *et al.*, 1997; ECKBERG, 1997; PARATI *et al.*, 2006; BILLMAN, 2009; 2011). Isto é particularmente verdadeiro no tangente à relação entre o poder de BF e a regulação simpática cardíaca (RANDALL *et al.*, 1991; AHMED *et al.*, 1994; KINGWELL *et al.*, 1994; HOPF *et al.*, 1995; ECKBERG, 1997; HOULE e BILLMAN, 1999; PARATI *et al.*, 2006; BILLMAN, 2009; 2011). Por exemplo, uma duplicação da atividade parassimpática contra a manutenção da ativação do nervo simpático produz o valor BF/AF idêntico como redução de 50% na atividade do nervo simpático em relação a uma regulação parassimpática de fundo constante. Com base na literatura, pode-se concluir que a ativação parassimpática contribui para pelo menos 50% da variabilidade da BF, enquanto a atividade simpática, na melhor das hipóteses, apenas contribui com 25% dessa variabilidade (RANDALL *et al.*, 1991). Uma parte substancial da variabilidade na banda BF também resulta de outros fatores não identificados como atividade vasomotora e barorreflexo e frequência respiratória que podem influenciar BF e AF. De forma semelhante, a atividade simpática pode contribuir com talvez até 10% da variabilidade da AF (TAYLOR *et al.*, 2001; COHEN e TAYLOR, 2002). Conforme já suposto por (REYES DEL PASO *et al.*, 2013) a idoneidade do componente BF da VFC como índice de controle simpático cardíaco e a relação BF/AF como índice de equilíbrio simpatovagal pode ser crítico.

Conseqüentemente, os efeitos da mudança da atividade simpática e parassimpática no BF/AF são bastante variáveis e não são intuitivamente óbvios (RANDALL *et al.*, 1991; TAYLOR *et al.*, 2001; COHEN e TAYLOR, 2002). A exemplo disto, neste estudo podemos observar um significativo aumento da entrada vagal e da retirada simpática no grupo NAC+EX quando comparado ao grupo EX

porém, a relação BF/AF do grupo EX teve média e desvio médio de $2,22 \pm 1,30$ enquanto que a os valores do grupo NAC+EX foi inegavelmente menor ($0,66 \pm 0,32$).

6.1.1.4 BF/AF Normalizada

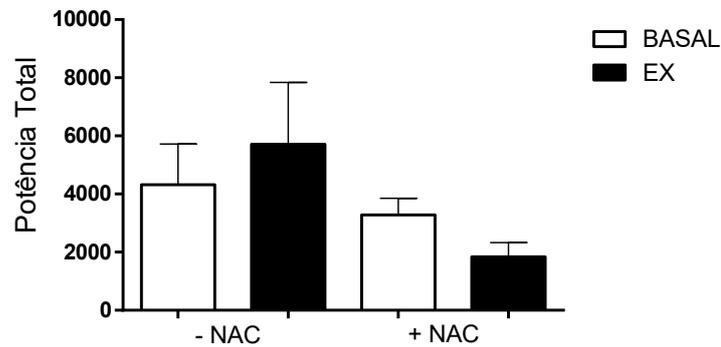
Para a razão entre BF normalizada e AF normalizada houve diferença significativa entre os grupos EX e NAC+EX ($P=0,041$) e BASAL e NAC+EX ($P=0,039$).



Ao avaliarmos a razão entre BF u.n. e AF u.n.. (BF/AF u.n.), curiosamente, obtivemos gráfico muito similar ao obtido para a Potência Total (discutido a seguir). No entanto, na análise BF/AF normalizada, houve diferença significativa entre os grupos NAC+EX vs. BASAL e, cabe ressaltar veementemente, entre os grupos NAC+EX e EX. Chama à atenção esta diferença ter sido significativa entre os grupos em que os animais foram submetidos à exercício e não ter sido estatística entre os grupos em repouso (BASAL e NAC). Isto dá espaço para deduzirmos que, somando-se ao fato de ter havido uma diminuição na entrada simpática e aumento na parassimpática após o exercício, estas foram ainda mais acentuadas devido ao uso da NAC. Tal fato corrobora a teoria de que a NAC é realmente capaz de alterar a inervação simpática não apenas, como já proposto por [LEE *et al.* \(2009\)](#), após infarto em ratos, como também, pelo observado neste estudo, em equinos sadios após exercício. Isto é de grande importância pois há relatos de que a atividade parassimpática deprimida durante o exercício ou uma deficiente recuperação parassimpática após o exercício pode resultar em aumento do risco de morte súbita cardíaca. Por outro lado, a atividade parassimpática aumentada pode ser protetora contra a morte súbita (VANOLI *et al.*, 1991 369).

6.1.1.5 Potência Total

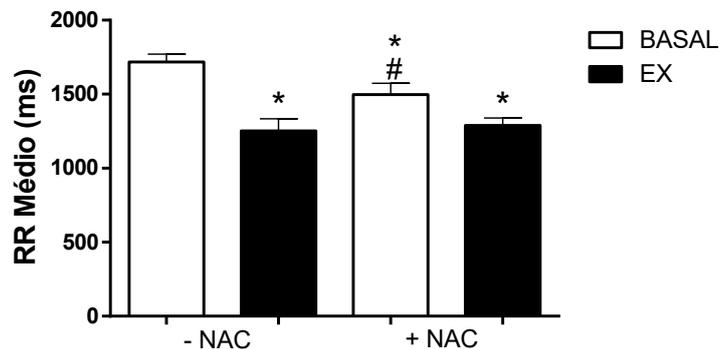
Para a Potência Total não houve diferença significativa entre os grupos testados.



6.1.2 Domínio do Tempo – Análise Auto Regressiva (AR)

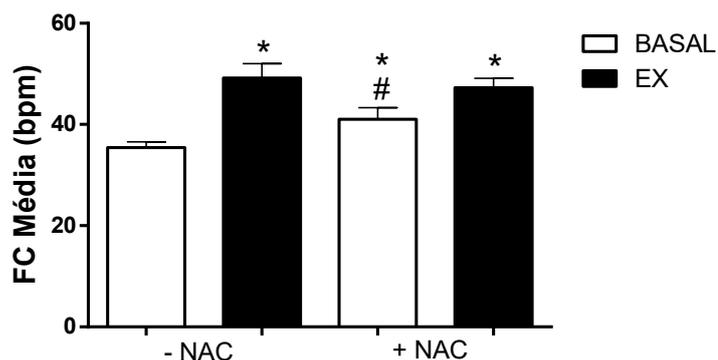
6.1.2.1 R-R Médio

Houve diferença significativa nas comparações entre os grupos BASAL e EX ($P < 0,001$), BASAL e NAC ($P = 0,011$) e BASAL e NAC+EX ($P < 0,001$), NAC e EX ($P = 0,003$) e NAC e NAC+EX ($P = 0,005$).



6.1.2.2 Frequência Cardíaca Média

Houve diferença significativa nas comparações entre os grupos EX e BASAL ($P < 0,001$), NAC+EX e BASAL ($P < 0,001$), EX e NAC ($P = 0,002$), NAC+EX e NAC ($P = 0,005$) e NAC e BASAL ($P = 0,035$).



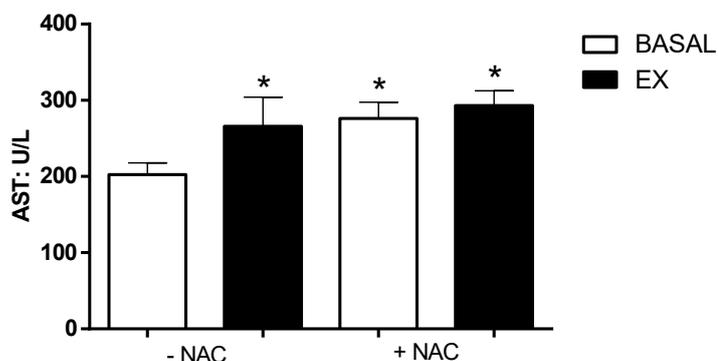
Conforme já demonstrado em outros estudos, a frequência cardíaca média pode não sofrer modificações, à despeito de alterações significativas observadas na variabilidade da frequência cardíaca comprovada pela análise da relação BF/AF normalizada.

6.2 Avaliações Laboratoriais

Ainda que o principal objetivo deste estudo tenha sido os efeitos advindos do tratamento com NAC sobre a atividade autonômica cardíaca, em conjunto foram avaliados parâmetros bioquímicos indicativos de estresse oxidativos e lesão muscular causados pela atividade física. Não foram constatadas reduções nos parâmetros relativos a lesão muscular pelo menos aqueles avaliados aqui como CK, AST e LDH.

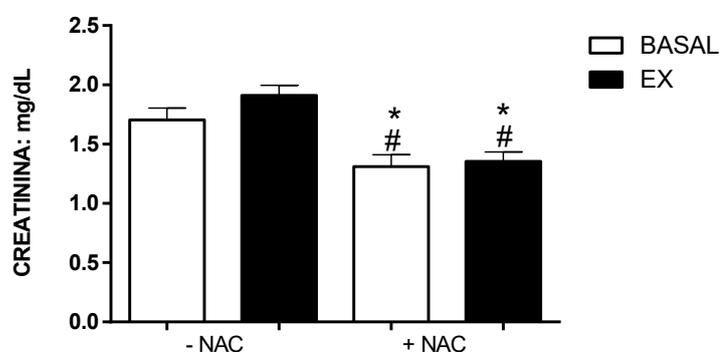
6.2.1 Aspartato Aminotransferase

A atividade de Aspartato Aminotransferase (AST) variou significativamente entre os grupos Basal e NAC+EX ($P < 0,001$), NAC e BASAL ($P = 0,003$) e EX e BASAL ($P = 0,003$).



6.2.2 Creatinina

A atividade de Creatinina variou significativamente entre os grupos BASAL e NAC ($p=0,0124$), BASAL e NAC+EX ($p=0,0401$), EX e NAC ($p= 0,0006$) e, finalmente, entre EX e NAC+EX. ($p= 0,0020$).



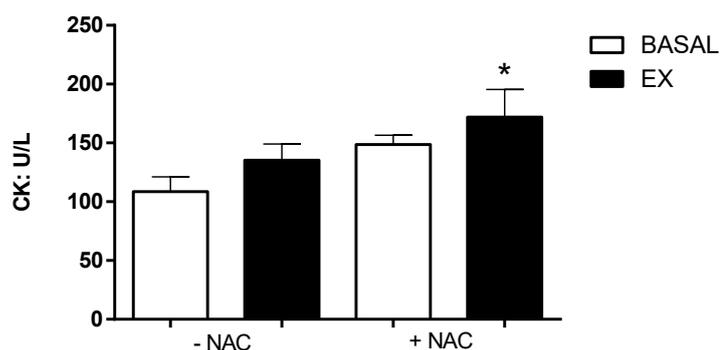
As menores concentrações séricas de Creatinina observadas nos equinos deste estudo após a administração de NAC corroboram pesquisas anteriores onde o mesmo foi inferido acerca da NAC. [SAVLUK *et al.* \(2017\)](#) concluíram que o uso profilático de NAC intravenoso teve efeito protetor sobre a função renal em pacientes humanos nefropatas (portadores de insuficiência renal moderada) submetidos a cirurgias cardiovasculares.

Anteriormente foi observado por [BURNS *et al.* \(2005\)](#) que a lesão de isquemia de reperfusão, o estresse oxidativo e a inflamação sistêmica são fatores que desempenham um papel significativo no desenvolvimento da insuficiência renal aguda (IRA) após cirurgia cardíaca. Baseado nesta afirmação, podemos extrapolar que o estresse oxidativo oriundo do exercício físico, bem como eventuais processos inflamatórios oriundos de exercício físico extenuante poderiam causar agravos a saúde renal que poderiam ser mitigados ou minimizados em decorrência da utilização prévia de NAC. As diminuições nos valores séricos de Creatinina corroboram resultados de outros estudos já realizados em humanos onde também, face ao também uso da NAC, houve diminuição deste metabólito no soro após exposição à radiocontrastes em pessoas submetidas a exames de imagem ([TEPEL *et al.*, 2000](#); [DIAZ-SANDOVAL *et al.*, 2002](#); [SHYU *et al.*, 2002](#)). Cabe lembrar que alterações na manipulação renal, por exemplo, na secreção tubular e no metabolismo da creatinina, bem como interferência metodológica na dosagem de creatinina podem afetar as concentrações séricas de creatinina. Ainda, por causa da ingestão de creatinina na dieta, da secreção tubular de creatinina e de variações na massa muscular dos pacientes pode haver uma estimativa incorreta da taxa

de filtração glomerular, se for tomada por referência apenas os níveis séricos de creatinina para se avaliar a função renal (SHEMESH *et al.*, 1985; LEVEY *et al.*, 1988; PERRONE *et al.*, 1992).

6.2.3 Creatina Fosfoquinase

A atividade de CK variou significativamente entre os grupos BASAL e NAC+EX (P=0,0402).



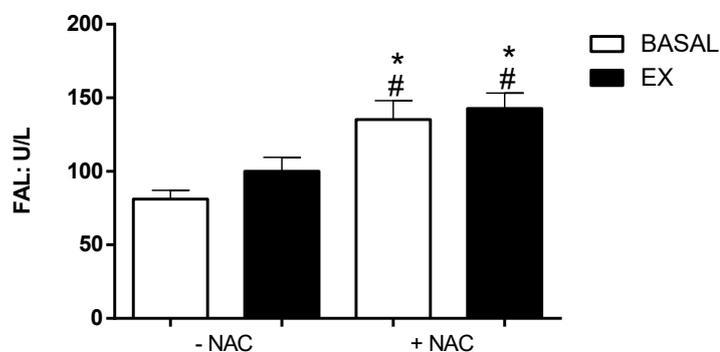
O aumento nos valores da CK estão em consonância com o resultado obtido no estudo de [WHITE *et al.* \(2001\)](#) no qual apesar da utilização de vitamina E a atividade sérica de CK aumentou em cavalos tratados e não tratados sendo provavelmente o exercício o responsável pela elevação sérica desta enzima. Portanto, a vitamina E não deve ter influenciado na prevenção do aumento do valor de CK. Devido semelhança com este estudo que utilizou NAC, esta observação pode ser extrapolada para justificar a também elevação dos valores de CK.

A partir dos nossos resultados, a maior porcentagem de elevação das enzimas CK e LDH em relação a AST pode ser explicada pela localização das enzimas nas células da musculatura esquelética. Como as enzimas CK e LDH estão presentes no citossol celular, o aumento da permeabilidade da membrana fez com que maior quantidade dessas enzimas fosse transportada para a circulação. Já a concentração sérica da AST foi interpretada levando-se em consideração a sua localização também nas mitocôndrias, e como se considerou a elevação das enzimas decorrente do aumento da permeabilidade da membrana celular. Alterações patológicas estão relacionadas com elevações superiores a 100% da AST após o exercício, independentemente da intensidade de exercício ou do nível de condicionamento do animal. Para exercício submáximo é esperado incremento de até 50% nos valores de AST em comparação ao aferido anteriormente à atividade (basal) (REED *et al.*, 2005).

Segundo [STOCKHAM \(1995\)](#), o exercício pode liberar quantidades de enzimas suficientes para aumentar os valores séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e desidrogenase láctica (LDH). [ROSE e HODGSON \(1993\)](#) e [HARVEY et al. \(1997\)](#) descrevem que eventuais lesões musculares podem ser verificadas através da aferição da atividade de aspartato aminotransferase (AST), creatina fosfoquinase (CK) e desidrogenase láctica (LDH), embora esta última seja menos específica. A elevação da atividade destas enzimas, no caso do corrente estudo, indica que os animais foram submetidos a exercício intenso, porém, ainda que tenha sido observada elevação sérica das citadas enzimas, tal incremento nas taxas seguiu os valores compreendidos dentro do esperado para animais submetidos à exercício submáximo ([REED et al., 2005](#)).

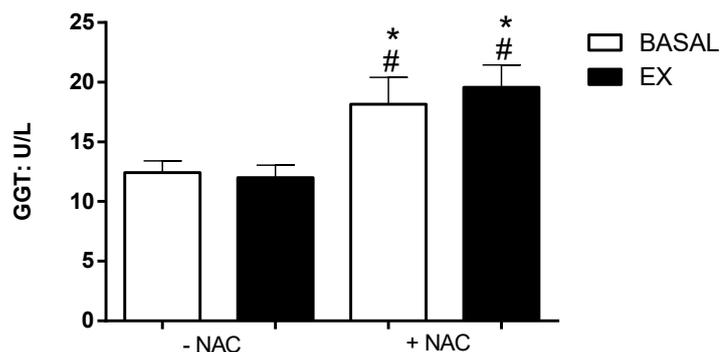
6.2.4 Fosfatase Alcalina

A atividade de Fosfatase Alcalina (FA) variou significativamente entre os grupos BASAL e NAC+EX. ($P<0,001$), EX e NAC+EX ($P<0,001$), NAC e BASAL ($P<0,001$) e entre NAC e EX ($P<0,001$).



6.2.5 Gama Glutamil Transferase

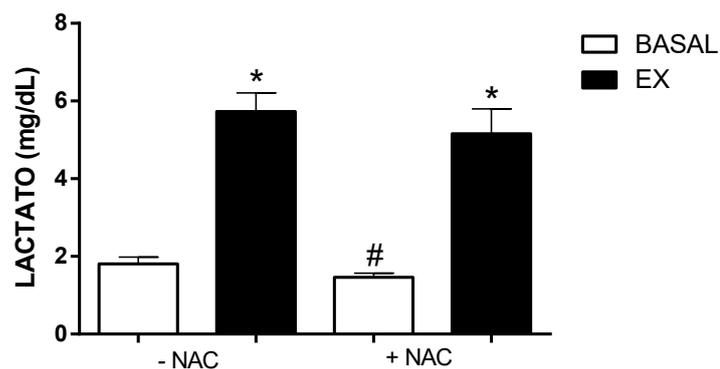
A atividade de GGT variou significativamente entre os grupos BASAL e NAC+EX. ($P<0,001$), EX e NAC+EX ($P<0,001$), NAC e BASAL ($P<0,001$) e entre NAC e EX ($P<0,001$).



Neste estudo foi observado aumento nas taxas de GGT, similarmente a outros estudos onde, a expressão aumentada de GGT por oxidantes foi demonstrada em ambos os níveis de proteína, atividade e mRNA. A GGT tem sido usada como um marcador clínico porque sua atividade está elevada em muitas doenças (ARKKILA *et al.*, 2001) (WANNAMETHEE *et al.*, 1995; WHITFIELD, 2001), incluindo doenças hepáticas, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e Câncer (VANDERLAAN e PHARES, 1981; HANIGAN, 1998), embora a implicação biológica ainda não esteja clara. Muitas substâncias, incluindo drogas, substâncias cancerígenas e álcool, também são capazes de aumentar a expressão do gene de GGT em várias células e tecidos (GRIFFITHS *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 1998). A expressão aumentada de GGT durante o estresse oxidativo facilita o turnover da GSH, síntese *de novo* de GSH e metabolismo e desintoxicação de conjugados de GSH que aumentam a resistência das células ao estresse subsequente. Portanto, a regulação da expressão do gene GGT é uma importante resposta adaptativa e ajuda a proteger células e tecidos de lesões oxidativas. Correlacionando estes fatos ao observado neste trabalho, podemos inferir serem dois os principais motivos para a elevação sérica de GGT: (1) O uso de certos medicamentos podem levar ao aumento da liberação hepática de GGT e, dado o aumento no grupo NAC em relação ao grupo BASAL, isso pode ter sido induzido pelo uso de NAC durante 14 dias e; (2) o estresse oxidativo provocado pelo exercício aumentou mais ainda a taxa sérica de GGT, visto a diferença significativa observada entre os grupos NAC+EX e EX e NAC+EX e BASAL.

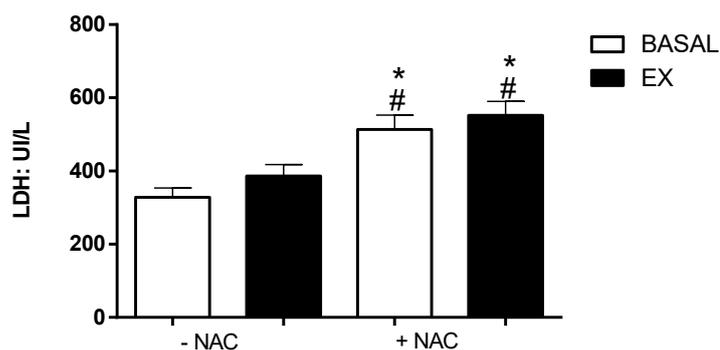
6.2.6 Lactato

Houve diferença significativa entre os grupos BASAL e EX, BASAL e NAC+EX, EX e NAC e, finalmente, entre NAC e NAC+EX. O valor de P entre estes confrontos foi <0,0001.



6.2.7 Lactato Desidrogenase

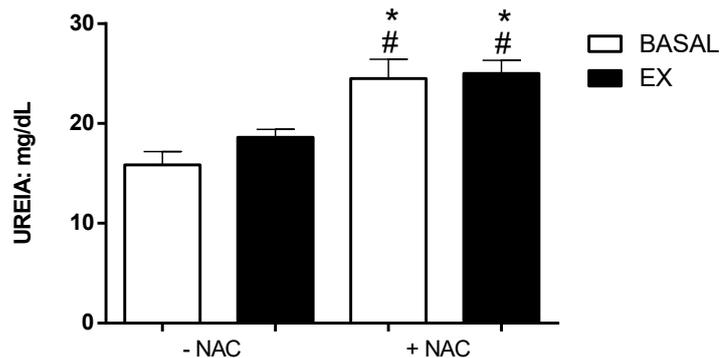
A atividade de Lactato Desidrogenase (LDH) variou significativamente entre os grupos BASAL e NAC ($P=0,001$), BASAL e NAC+EX ($P<0,001$), EX e NAC ($P=0,041$) e entre os grupos EX e NAC+EX. ($p=0,013$).



A desidrogenase láctica (LDH) é uma enzima com atividade nos hepatócitos e nas fibras musculares e tem sido utilizada associada à creatino fosfoquinase (CK) para avaliação das lesões musculares, entre elas as provocadas pelo exercício (HARVEY *et al.*, 1997).

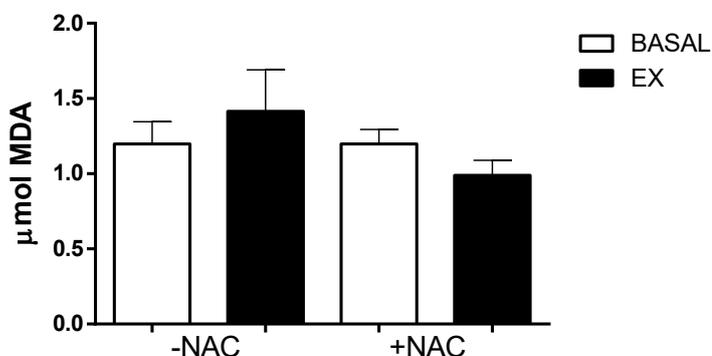
6.2.8 Uréia

A atividade de Uréia variou significativamente entre os grupos BASAL e NAC+EX. ($P<0,001$), EX e NAC+EX ($P<0,001$), NAC e BASAL ($P<0,001$) e entre NAC e EX ($P<0,001$).



6.2.9 Malondialdeído

Para Malondialdeído, não houve diferença significativa entre os grupos testados.



Ao ser avaliado o MDA, constatou-se que para os grupos BASAL e NAC, grupos estes em que os animais estavam em repouso e conseqüentemente não submetidos a estresse oxidativo excessivo, apresentaram médias iguais em cada grupo (1,97 μmol MDA) ($p = 0,9999$). Porém, quando a produção de radicais livres foi maior, claramente as médias dos grupos aumentaram tanto em EX quanto em NAC+EX. Ainda que não tenha havido diferença significativa entre estes dois grupos, foi observada uma tendência clara de menor produção de MDA no grupo NAC+EX ($p = 0,368$). É possível que, o aumento do número de animais de ambos os grupos possa tornar esses dados significativos e, ou seja, diminuir a produção de MDA no exercício em animais previamente tratados com NAC. Cabe lembrar que o estresse oxidativo exacerbado leva realmente à lesão celular porém, apesar de todas as pesquisas realizadas no intuito de investigar efeitos antioxidantes de diversas substâncias, o EO não pode ser considerado de todo ruim pois, uma das adaptações criadas com o exercício de rotina é a resposta antioxidante durante atividade extenuante (PITTALUGA *et al.*, 2006).

A avaliação do MDA pelo teste com ATB não é específica, pois muitas outras substâncias que ocorrem em materiais biológicos também reagem com o TBA. Esta inespecificidade é particularmente importante em lipídeos contendo AGPI auto oxidados como produtos de decomposição secundária, incluindo complexa mistura de compostos saturados de cadeia curta (alcanos), insaturados (alcenos e alcadienos) e aldeídos monofuncionais, além de MDA. Alguns aldeídos monofuncionais também são reativos ao TBA, em meio ácido e à temperatura elevada utilizada no teste das TBARS, formando produtos derivados do TBA com um espectro no visível similar ao do complexo MDA: TBA (1:2). Portanto, o teste espectrofotométrico com o TBA pode medir variedades de espécies que absorvem em 532 nm. Outra possível interferência neste método deve-se à presença de metais de transição, o que possibilita uma geração de MDA durante a análise. É essencial incluir-se quantidade suficiente de antioxidante para prevenir a auto-oxidação dos lípidos e a subsequente formação de MDA, durante a fase de aquecimento do ensaio. Adicionalmente, é aconselhável também tratar os reagentes com quelantes de metais de transição para impedir a interferência destes. Outra desvantagem do teste das TBARS é a instabilidade do cromógeno, que absorve em 532 nm (FUKUNAGA *et al.*, 1995). Portanto, as condições do teste das TBARS influenciam na análise da lipoperoxidação. Quatro fatores importantes devem ser considerados neste teste: a influência das condições da reação e dos reagentes na resposta ao TBA; a não especificidade do TBA para a reação com o MDA; a não exclusividade do MDA como produto final da lipoperoxidação e, finalmente, a impossibilidade de se distinguir o complexo MDA:TBA dos outros produtos reativos ao TBA por espectrofotometria (JANERO, 1990; BENZIE, 1996). É possível que, devido a todas estas influências, não tenhamos obtido resultados significativos.

7. CONCLUSÃO

Diante do constatado em todas as análises realizadas podemos concluir que o uso da N-acetilcisteína por 14 dias pode influenciar a variabilidade da frequência cardíaca, diminuindo a entrada simpática e aumentando a modulação vagal após atividade física. Outrossim, diante das alterações bioquímicas observadas, podemos sugerir uma aparente nefroproteção ao avaliarmos a creatinina como marcador de lesão renal. Por fim, a ausência na demonstração a da diminuição do estresse oxidativo nos

animais tratados com NAC pode sugerir outros efeitos menos explorados na literatura para a NAC na condição de exercício físico e abrir novos e promissores mecanismos de ação para esse fármaco.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

MAPA, 2016. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>

AHMED, M. W. et al. Effect of physiologic and pharmacologic adrenergic stimulation on heart rate variability. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 24, n. 4, p. 1082-1090, 1994. ISSN 0735-1097.

AKSELROD, S. et al. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 249, n. 4, p. H867-H875, 1985. ISSN 0363-6135.

AKSELROD, S. et al. **Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control**. MASSACHUSETTS INST OF TECH CAMBRIDGE HARVARD-MIT DIV OF HEALTH SCIENCES AND TECHNOLOGY. 1981

ARAI, Y. et al. Modulation of cardiac autonomic activity during and immediately after exercise. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 256, n. 1, p. H132-H141, 1989. ISSN 0363-6135.

ARKKILA, P. E. et al. Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 52, n. 2, p. 113-118, 2001. ISSN 0168-8227.

ART, T.; LEKEUX, P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. **Livestock Production Science**, v. 92, n. 2, p. 101-111, 2005. ISSN 0301-6226.

AVELLINI, L.; CHIARADIA, E.; GAITI, A. 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**, v. 123, n. 2, p. 147-154, 1999. ISSN 1096-4959.

AVELLINI, L.; SILVESTRELLI, M.; GAITI, A. Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. **Veterinary research communications**, v. 19, n. 3, p. 179-184, 1995. ISSN 0165-7380.

BALOGH, N. et al. 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. ISSN 1939-165X.

BARREY, E.; VALETTE, J. Exercise-related parameters of horses competing in show jumping events ranging from a regional to an international level. *Annales de Zootechnie*, 1993. p.89-98.

BAST, A.; HAENEN, G. R. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. **Biofactors**, v. 17, n. 1-4, p. 207-213, 2003. ISSN 1872-8081.

BENZIE, I. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996. ISSN 0963-7486.

BERNTSON, G. G. et al. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. **Psychophysiology**, v. 34, n. 6, p. 623-648, 1997. ISSN 1469-8986.

BERTONE, A. et al. Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete. **Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete**, 2004.

BESSMAN, S. P.; GEIGER, P. J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. **Science**, v. 211, n. 4481, p. 448-452, 1981. ISSN 0036-8075.

BILLMAN, G. E. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 4, p. H1171-H1193, 2009. ISSN 0363-6135.

_____. Heart rate variability—a historical perspective. **Frontiers in physiology**, v. 2, 2011.

_____. The LF/HF ratio does not accurately measure cardiac sympatho-vagal balance. **Frontiers in physiology**, v. 4, 2013.

BONANOMI, L.; GAZZANIGA, A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **European journal of respiratory diseases. Supplement**, v. 111, p. 45-51, 1979. ISSN 0106-4347.

BORGSTRÖM, L.; KÅGEDAL, B.; PAULSEN, O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. **European journal of clinical pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 217-222, 1986. ISSN 0031-6970.

BOTTEON, P. de TL Lactato na medicina veterinária-Atualização conceitual. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 4, p. 283-287, 2012.

BROOKS, G. Lactate production under fully aerobic conditions: the lactate shuttle during rest and exercise. *Federation proceedings*, 1986. p.2924-2929.

BROWN, K. E. et al. Enhanced γ -glutamyl transpeptidase expression and selective loss of CuZn superoxide dismutase in hepatic iron overload. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 4, p. 545-555, 1998. ISSN 0891-5849.

BROWN, S. P. et al. Blood pressure, hemodynamic, and thermal responses after cycling exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 1, p. 240-245, 1993. ISSN 8750-7587.

BROWN, T. E. et al. Important influence of respiration on human RR interval power spectra is largely ignored. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 5, p. 2310-2317, 1993. ISSN 8750-7587.

BRUIN, G. et al. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 5, p. 1908-1913, 1994. ISSN 8750-7587.

BURNS, K. E. et al. Perioperative N-acetylcysteine to prevent renal dysfunction in high-risk patients undergoing CABG surgery: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 294, n. 3, p. 342-350, 2005. ISSN 0098-7484.

CARTER, R. et al. Muscle pump and central command during recovery from exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 4, p. 1463-1469, 1999. ISSN 8750-7587.

CERUTTI, M. Spectral analysis of the heart rate variability signal. **Heart rate variability**, p. 63-74, 1995.

CHAPELLE, J. Diagnóstico bioquímico del infarto de miocárdio. **Bioquímica Clínica. Barcelona: Barcanova**, p. 235-256, 1994.

CHESS, G.; TAM, R.; CALARESU, F. Influence of cardiac neural inputs on rhythmic variations of heart period in the cat. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 228, n. 3, p. 775-780, 1975. ISSN 0002-9513.

CHIARADIA, E. et al. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, n. 4, p. 833-836, 1998. ISSN 1096-4959.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637s-646s, 2000. ISSN 0002-9165.

CLAYTON, H. Show Jumping. **Conditioning Sport Horses.(Clayton, HM, Ed.) Sport horse publications, Saskatoon, Saskatchewan**, p. 173-180, 1991.

COHEN, M. A.; TAYLOR, J. A. Short-term cardiovascular oscillations in man: measuring and modelling the physiologies. **The Journal of physiology**, v. 542, n. 3, p. 669-683, 2002. ISSN 1469-7793.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. Editora Manole, 1984.

CONNETT, R. J.; GAYESKI, T.; HONIG, C. R. Lactate accumulation in fully aerobic, working, dog gracilis muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 246, n. 1, p. H120-H128, 1984. ISSN 0363-6135.

COTTIN, F. et al. Effect of exercise intensity and repetition on heart rate variability during training in elite trotting horse. **International journal of sports medicine**, v. 26, n. 10, p. 859-867, 2005. ISSN 0172-4622.

DACVECC, T. D. D. D.; DACVO, W. R. D. D. Hypokalemia, Muscle Weakness and Recumbency in Dairy Cattle (17 Cases 1991-1998). 2003.

DAVIES, K. J. et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982. ISSN 0006-291X.

DE CARO, L. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. **Arzneimittel-Forschung**, v. 39, n. 3, p. 382-386, 1989. ISSN 0004-4172.

DE MOFFARTS, B. et al. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 1, p. 65-74, 2005. ISSN 1090-0233.

DE MOFFARTS, B. et al. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 1, n. 03, p. 211-220, 2004. ISSN 1479-070X.

DEKKERS, J. C.; VAN DOORNEN, L. J.; KEMPER, H. C. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. **Sports Medicine**, v. 21, n. 3, p. 213-238, 1996. ISSN 0112-1642.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005. ISSN 0939-4753.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. **Neurosignals**, v. 10, n. 1-2, p. 125-140, 2001. ISSN 1424-8638.

DIAZ-SANDOVAL, L. J.; KOSOWSKY, B. D.; LOSORDO, D. W. Acetylcysteine to prevent angiography-related renal tissue injury (the APART trial). **The American journal of cardiology**, v. 89, n. 3, p. 356-358, 2002. ISSN 0002-9149.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Veterinary laboratory medicine**. Iowa State University Press, 1986. ISBN 0813819164.

DURU, M. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on cyclosporine-A-induced nephrotoxicity. **Renal failure**, v. 30, n. 4, p. 453-459, 2008. ISSN 0886-022X.

ECKBERG, D. L. Sympathovagal balance. **Circulation**, v. 96, n. 9, p. 3224-3232, 1997. ISSN 0009-7322.

ESTANY, S. et al. Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and α -tocopherol on endometrial cells in culture. **Journal of reproductive immunology**, v. 75, n. 1, p. 1-10, 2007. ISSN 0165-0378.

FELDMAN, E. **Animal models of diabetic complications consortium (AMDCC protocols); Thiobarbituric acid reactive substances (TNARS) Assay** 2004.

FERRAZ, G. et al. The workload and plasma ion concentration in a training match session of high-goal (elite) polo ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. s38, p. 191-195, 2010. ISSN 2042-3306.

FINCO, D. R. Kidney function. **Clinical biochemistry of domestic animals**, v. 4, p. 496-542, 1997.

FORJAZ, C. et al. Post-exercise changes in blood pressure, heart rate and rate pressure product at different exercise intensities in normotensive humans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 10, p. 1247-1255, 1998. ISSN 0100-879X.

FRANKIEWICZ-JÓZKO, A.; SZARSKA, E. Anti-oxidant level to exercise in the blood of endurance horses. **Biology of sport**, v. 17, n. 3, p. 217-227, 2000. ISSN 0860-021X.

FUKUNAGA, K.; TAKAMA, K.; SUZUKI, T. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. **Analytical biochemistry**, v. 230, n. 1, p. 20-23, 1995. ISSN 0003-2697.

FURLAN, R. et al. Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. **Circulation**, v. 81, n. 2, p. 537-547, 1990. ISSN 0009-7322.

FURR, M. O.; LESSARD, P.; II, N. A. W. Development of a colic severity score for predicting the outcome of equine colic. **Veterinary Surgery**, v. 24, n. 2, p. 97-101, 1995. ISSN 1532-950X.

GARCÍA, M. et al. Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 31, n. 2, p. 167-176, 1999. ISSN 0301-732X.

GLADDEN, L. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **The Journal of physiology**, v. 558, n. 1, p. 5-30, 2004. ISSN 1469-7793.

GONZÁLEZ, F. H.; SCHEFFER, J. F. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. GONZÁLEZ, FH D et al. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais (sangue, leite e urina). Arquivos do 29º Congresso Nacional de Medicina Veterinária, Gramado, RS, 2002. p.5-17.

GORES-LINDHOLM, A. R. et al. Relationships between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance. **Theriogenology**, v. 80, n. 3, p. 218-227, 2013. ISSN 0093-691X.

GRIFFITHS, S. A. et al. Characterization of a promoter for γ -glutamyl transpeptidase activated in rat liver in response to aflatoxin B1 and ethoxyquin1. **Molecular carcinogenesis**, v. 14, n. 4, p. 251-262, 1995. ISSN 1098-2744.

GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2009. ISSN 0100-4042.

HAGBERG, J. et al. Faster adjustment to and recovery from submaximal exercise in the trained state. **Journal of Applied Physiology**, v. 48, n. 2, p. 218-224, 1980. ISSN 8750-7587.

HALESTRAP, A. P.; MEREDITH, D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. **Pflügers Archiv**, v. 447, n. 5, p. 619-628, 2004. ISSN 0031-6768.

HANIGAN, M. H. γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. **Chemico-biological interactions**, v. 111, p. 333-342, 1998. ISSN 0009-2797.

HARGREAVES, B. J. et al. Antioxidant status of horses during two 80-km endurance races. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1781S-1783S, 2002. ISSN 0022-3166.

HARVEY, J. W. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 1997. (0123963052)

HOFFMANN, W. E. et al. **Clinical enzymology**. 1989.

HOPF, H.-B. et al. Low-frequency spectral power of heart rate variability is not a specific marker of cardiac sympathetic modulation. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 82, n. 3, p. 609-619, 1995. ISSN 0003-3022.

HORTOBAGYI, T.; DENAHAN, T. Variability in creatine kinase: methodological, exercise, and clinically related factors. **International journal of sports medicine**, v. 10, n. 02, p. 69-80, 1989. ISSN 0172-4622.

HOULE, M. S.; BILLMAN, G. E. Low-frequency component of the heart rate variability spectrum: a poor marker of sympathetic activity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 1, p. H215-H223, 1999. ISSN 0363-6135.

HYYPPÄ, S.; PÖSÖ, A. R. Fluid, electrolyte, and acid-base responses to exercise in racehorses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 14, n. 1, p. 121-136, 1998. ISSN 0749-0739.

IMAI, K. et al. Vagally mediated heart rate recovery after exercise is accelerated in athletes but blunted in patients with chronic heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 24, n. 6, p. 1529-1535, 1994. ISSN 0735-1097.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515-540, 1990. ISSN 0891-5849.

JENKINS, R. R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 670s-674s, 2000. ISSN 0002-9165.

Jl, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Experimental Biology and medicine**, v. 222, n. 3, p. 283-292, 1999. ISSN 1535-3702.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. Appendixes. **Clinical biochemistry of domestic animals**, v. 5, p. 885-905, 1997.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008. ISBN 0080568823.

KANNANKERIL, P. J.; GOLDBERGER, J. J. Parasympathetic effects on cardiac electrophysiology during exercise and recovery. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 6, p. H2091-H2098, 2002. ISSN 0363-6135.

KASIELSKI, M.; NOWAK, D. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory medicine**, v. 95, n. 6, p. 448-456, 2001. ISSN 0954-6111.

KELLY, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v. 3, n. 2, p. 114-127, 1998. ISSN 1089-5159.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 38, 2005. ISSN 1550-2783.

KINGWELL, B. A. et al. Heart rate spectral analysis, cardiac norepinephrine spillover, and muscle sympathetic nerve activity during human sympathetic nervous activation and failure. **Circulation**, v. 90, n. 1, p. 234-240, 1994. ISSN 0009-7322.

KINNUNEN, S. et al. Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. **J Sports Sci Med**, v. 4, n. 4, p. 415-21, 2005.

KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 178-191, 2008. ISSN 1090-0233.

KITNEY, R.; ROMPELMAN, O. **The Study of Heart Rate Variability: Clarendon: Oxford** 1980.

KLEIGER, R. E. et al. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **The American journal of cardiology**, v. 59, n. 4, p. 256-262, 1987. ISSN 0002-9149.

- KOH, J. et al. Human autonomic rhythms: vagal cardiac mechanisms in tetraplegic subjects. **The Journal of physiology**, v. 474, n. 3, p. 483-495, 1994. ISSN 1469-7793.
- KOLMAN, B. S.; VERRIER, R. L.; LOWN, B. The effect of vagus nerve stimulation upon vulnerability of the canine ventricle: role of sympathetic-parasympathetic interactions. **Circulation**, v. 52, n. 4, p. 578-585, 1975. ISSN 0009-7322.
- KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical Enzymology-Chapter 12. 1997.
- KUWAHARA, M. et al. Assessment of autonomic nervous function by power spectral analysis of heart rate variability in the horse. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 60, n. 1-2, p. 43-48, 1996. ISSN 0165-1838.
- LASSEN, E.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. **Thrall, MA et al. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. São Paulo: Roca**, p. 03-36, 2007.
- LEE, T.-M.; LAI, P.-Y.; CHANG, N.-C. Effect of N-acetylcysteine on sympathetic hyperinnervation in post-infarcted rat hearts. **Cardiovascular research**, v. 85, n. 1, p. 137-146, 2009. ISSN 1755-3245.
- LEELARUNGRAYUB, D. et al. N-Acetylcysteine Supplementation Controls Total Antioxidant Capacity, Creatine Kinase, Lactate, and Tumor Necrotic Factor-Alpha against Oxidative Stress Induced by Graded Exercise in Sedentary Men. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, p. 1-6, 2011. ISSN 1942-0900 1942-0994.
- LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 829-838, 2001. ISSN 0929-8673.
- LEKEUX, P. et al. Heart rate, hematological and serum biochemical responses to show jumping. **Equine exercise physiology**, v. 3, p. 385-390, 1991.
- LEVEY, A. S.; PERRONE, R. D.; MADIAS, N. E. Serum creatinine and renal function. **Annual review of medicine**, v. 39, n. 1, p. 465-490, 1988. ISSN 0066-4219.
- LINDSAY, W.; MCDONELL, W.; BIGNELL, W. Equine postanesthetic forelimb lameness: intracompartmental muscle pressure changes and biochemical patterns. **American journal of veterinary research**, v. 41, n. 12, p. 1919-1924, 1980. ISSN 0002-9645.
- MALIK, M.; CAMM, A. J. Components of heart rate variability—what they really mean and what we really measure. **The American journal of cardiology**, v. 72, n. 11, p. 821-822, 1993. ISSN 0002-9149.
- MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482-492, 1991. ISSN 0009-7322.

MÅRDH, P.-A.; CEDERLUND, H. Antimicrobial activities of N-acetylcysteine and some non-steroidal antiinflammatory drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 32, n. 6, p. 903-904, 1993. ISSN 0305-7453.

MARLIN, D. J. et al. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1622S-1627S, 2002. ISSN 0022-3166.

MARTINS, J. B.; ZIPES, D. P. Effects of sympathetic and vagal nerves on recovery properties of the endocardium and epicardium of the canine left ventricle. **Circ Res**, v. 46, n. 1, p. 100-110, 1980. ISSN 0009-7330.

MCMENIMAN, N.; HINTZ, H. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 6, p. 482-484, 1992. ISSN 2042-3306.

MEISTER, A. [3] Glutathione biosynthesis and its inhibition. **Methods in enzymology**, v. 252, p. 26-30, 1995. ISSN 0076-6879.

MEYER, D.; COLES, E.; RICH, L. Medicina de Laboratório Veterinária: diagnóstico e interpretação. **Roca, São Paulo. 308p.[Links]**, 1995.

MOORE, J.; OWEN, R. a. R.; LUMSDEN, J. Clinical evaluation of blood lactate levels in equine colic. **Equine Veterinary Journal**, v. 8, n. 2, p. 49-54, 1976. ISSN 2042-3306.

MORAES, R.; FERLIN, E. Variabilidad de la frecuencia cardíaca: utilidad del análisis espectral para evaluar el sistema nervioso autónomo. **Revista Argentina de Cardiología**, v. 60, p. 77-80, 1992.

MORAIS, M. et al. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas aneladas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2000. ISSN 0102-0935.

MORRESEY, P. R. How to deliver respiratory treatments to neonates by nebulization. **Proceedings of american association of equine practitioners**, v. 54, p. 520-526, 2008.

NISHIME, E. O. et al. Heart rate recovery and treadmill exercise score as predictors of mortality in patients referred for exercise ECG. **Jama**, v. 284, n. 11, p. 1392-1398, 2000. ISSN 0098-7484.

PAGANI, M. et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circulation research**, v. 59, n. 2, p. 178-193, 1986. ISSN 0009-7330.

PAGANI, M. et al. Power spectral density of heart rate variability as an index of sympatho-vagal interaction in normal and hypertensive subjects. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 2, n. 3, p. S383-5, 1984. ISSN 0952-1178.

PARATI, G. et al. Point: Counterpoint: Cardiovascular variability is/is not an index of autonomic control of circulation. **Journal of applied physiology**, v. 101, n. 2, p. 676-682, 2006. ISSN 8750-7587.

PARATI, G. et al. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. **Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1276-1286, 1995. ISSN 0194-911X.

PEREZ-GIRALDO, C. et al. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, n. 5, p. 643-646, 1997. ISSN 0305-7453.

PERINI, R. et al. The influence of exercise intensity on the power spectrum of heart rate variability. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 61, n. 1, p. 143-148, 1990. ISSN 0301-5548.

PERRONE, R. D.; MADIAS, N. E.; LEVEY, A. S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. **Clinical chemistry**, v. 38, n. 10, p. 1933-1953, 1992. ISSN 0009-9147.

PHYSICK-SHEARD, P. et al. Frequency domain analysis of heart rate variability in horses at rest and during exercise. **Equine veterinary journal**, v. 32, n. 3, p. 253-262, 2000. ISSN 2042-3306.

PHYSICK-SHEARD, P. W. et al. Frequency domain analysis of heart rate variability in horses at rest and during exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 3, p. 253-262, 2000. ISSN 2042-3306. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.2746/042516400776563572>>.

PITTALUGA, M. et al. Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. **Free radical research**, v. 40, n. 6, p. 607-614, 2006. ISSN 1071-5762.

RANDALL, D. C. et al. SA nodal parasympathectomy delineates autonomic control of heart rate power spectrum. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 260, n. 3, p. H985-H988, 1991. ISSN 0363-6135.

RANDALL, D. C. et al. Heart rate control in awake dog after selective SA-nodal parasympathectomy. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 262, n. 4, p. H1128-H1135, 1992. ISSN 0363-6135.

RANDALL, W. a. W., R. **Vagal control of the heart : experimental basis and clinical implications**. LEVY, M. N. e SCHWARTZ, P. J. Armonk, NY :: Futura Pub. Co. 1994.

REED, S. M. et al. **Medicina interna equina**. Inter-Médica, 2005. ISBN 9505552890.

REYES DEL PASO, G. A. et al. The utility of low frequency heart rate variability as an index of sympathetic cardiac tone: a review with emphasis on a reanalysis of previous studies. **Psychophysiology**, v. 50, n. 5, p. 477-487, 2013. ISSN 1469-8986.

ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 3, p. R502-R516, 2004. ISSN 0363-6119.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. **Manual of Equine Practice**. Saunders, 1993. ISBN 9780721637396. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=RFfkMMYo4jYC> >.

SAUL, J. P. et al. Heart rate and muscle sympathetic nerve variability during reflex changes of autonomic activity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 258, n. 3, p. H713-H721, 1990. ISSN 0363-6135.

SAVABI, F.; GEIGER, P.; BESSMAN, S. Kinetic properties and functional role of creatine phosphokinase in glycerinated muscle fibers—Further evidence for compartmentation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 114, n. 2, p. 785-790, 1983. ISSN 0006-291X.

SAVLUK, O. F. et al. N-acetylcysteine versus Dopamine to Prevent Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery in Patients with Preexisting Moderate Renal Insufficiency. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 32, n. 1, 2017. ISSN 01027638 16789741.

SCHEFFER, J. F.; GONZÁLEZ, F. H. Enzimologia clínica em medicina veterinária. **Monografia Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 23p**, 2003.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, Á. R. d. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte. São Paulo, BR. Vol. 10, n. 4 (jul./ago. 2004), p. 308-313.**, 2004. ISSN 1517-8692.

SEN, C. K.; ATALAY, M.; HANNINEN, O. Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 5, p. 2177-2187, 1994. ISSN 8750-7587.

SEN, C. K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 653s-669s, 2000. ISSN 0002-9165.

SHEMESH, O. et al. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. **Kidney international**, v. 28, n. 5, p. 830-838, 1985. ISSN 0085-2538.

SHEPHARD, R. J. **Exercise physiology**. Toronto; Philadelphia: BC Decker; Saint Louis, Mo.: Sales and distribution CV Mosby Company, 1987. ISBN 094115890X.

SHI, R. et al. N-acetylcysteine amide decreases oxidative stress but not cell death induced by doxorubicin in H9c2 cardiomyocytes. **BMC pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 7, 2009. ISSN 1471-2210.

SHINDOH, C. et al. Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, n. 5, p. 2107-2113, 1990. ISSN 8750-7587.

SHYU, K.-G.; CHENG, J.-J.; KUAN, P. Acetylcysteine protects against acute renal damage in patients with abnormal renal function undergoing a coronary procedure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 8, p. 1383-1388, 2002. ISSN 0735-1097.

SICILIANO, P.; PARKER, A.; LAWRENCE, L. Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. **Journal of animal science**, v. 75, n. 6, p. 1553-1560, 1997. ISSN 0021-8812.

SICILIANO, P. D. et al. Effect of conditioning and exercise type on serum creatine kinase and aspartate aminotransferase activity. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, n. S18, p. 243-247, 1995. ISSN 2042-3306.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986. ISSN 1521-3773.

SOUTTO, W. S. V. I. M. et al. Perfil bioquímico e capacidade antioxidante total em cavalos de polo suplementados com selênio e vitamina-E. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, 2013.

STANLEY, W. C. et al. Systemic lactate kinetics during graded exercise in man. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 249, n. 6, p. E595-E602, 1985. ISSN 0193-1849.

STOCKHAM, S. L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 11, n. 3, p. 391-414, 1995. ISSN 0749-0739.

SYAKALIMA, M. et al. Separation and Quantification of Corticosteroid-induced, Bone and Liver Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Canine Serum. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 44, n. 1-10, p. 603-610, 1997. ISSN 1439-0442.

TADICH, N.; GALLO, C.; ALVARADO, M. Efectos de 36 horas de transporte terrestre con y sin descanso sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en bovinos. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 32, n. 2, p. 171-183, 2000. ISSN 0301-732X.

TAKAHASHI, T. et al. Influence of duration of cool-down exercise on recovery of heart rate in humans. **Therapeutic Research**, v. 21, p. 48-53, 2000.

TAKAHASHI, T. et al. Difference in human cardiovascular response between upright and supine recovery from upright cycle exercise. **European journal of applied physiology**, v. 81, n. 3, p. 233-239, 2000. ISSN 1439-6319.

TASK-FORCE. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **circulation**, v. 93, p. 1043-1065, 1996.

TAYLOR, J. A. et al. Sympathetic restraint of respiratory sinus arrhythmia: implications for vagal-cardiac tone assessment in humans. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2804-H2814, 2001. ISSN 0363-6135.

TEPEL, M. et al. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 3, p. 180-184, 2000. ISSN 0028-4793.

THOMASSIAN, A. et al. Atividades séricas da aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase de equinos submetidos ao teste padrão de exercício progressivo em esteira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**; v. 44, n. 3 (2007), 2007. Disponível em: < <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26637> >.

THOMPSON, J.; PAULI, J. Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in calves. **New Zealand veterinary journal**, v. 29, n. 12, p. 223-226, 1981. ISSN 0048-0169.

TYLER-MCGOWAN, C. M. et al. Haematological and biochemical responses to training and overtraining. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. S30, p. 621-625, 1999. ISSN 2042-3306.

UNVERFERTH, D. V. et al. Usefulness of a free radical scavenger in preventing doxorubicin-induced heart failure in dogs. **The American journal of cardiology**, v. 56, n. 1, p. 157-161, 1985. ISSN 0002-9149.

VALBERG, S. et al. Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. **Equine veterinary journal**, v. 25, n. 1, p. 11-16, 1993. ISSN 2042-3306.

VALBERG, S. J. Muscular causes of exercise intolerance in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 3, p. 495-515, 1996. ISSN 0749-0739.

VANDERLAAN, M.; PHARES, W. γ -Glutamyltranspeptidase: a tumour cell marker with a pharmacological function. **The Histochemical Journal**, v. 13, n. 5, p. 865-877, 1981. ISSN 0018-2214.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 2, p. 205-17, 2009.

VANOLI, E. et al. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. **Circulation research**, v. 68, n. 5, p. 1471-1481, 1991. ISSN 0009-7330.

VILLAS-BOAS, J. D. Behavioural, endocrine and cardiac autonomic responses to a model of startle in horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 174, p. 76-82, 2016. ISSN 01681591.

VON BORELL, E. et al. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals — A review. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 3, p. 293-316, 2007. ISSN 00319384.

WALLIMANN, T.; SCHLÖSSER, T.; EPPENBERGER, H. M. Function of M-line-bound creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 8, p. 5238-5246, 1984. ISSN 0021-9258.

WANNAMETHEE, G.; EBRAHIM, S.; GERALD SHAPER, A. Gamma-glutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes. **American journal of epidemiology**, v. 142, n. 7, p. 699-708, 1995. ISSN 1476-6256.

WESTERBLAD, H.; ALLEN, D. G.; LÄNNERGREN, J. Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? **Physiology**, v. 17, n. 1, p. 17-21, 2002. ISSN 1548-9213.

WHITE, A. et al. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 128, n. 1, p. 99-104, 2001. ISSN 1095-6433.

WHITFIELD, J. Gamma glutamyl transferase. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 38, n. 4, p. 263-355, 2001. ISSN 1040-8363.

WILLARD, M.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. Diagnostico clínico patológico pratico en los animales pequeños. **Buenos Aires: Intermedica**, 1993.

WILLIAMS, C.; CARLUCCI, S. Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. S36, p. 617-621, 2006. ISSN 2042-3306.

WILLIAMS, C. et al. Lipoic acid and vitamin E supplementation to horses diminishes endurance exercise induced oxidative stress, muscle enzyme leakage, and apoptosis. **The Elite Race and Endurance Horse, Oslo**, p. 105-119, 2004b.

WILLIAMS, C. et al. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. **Journal of animal science**, v. 82, n. 2, p. 588-594, 2004a. ISSN 1525-3163.

WILLIAMS, C. et al. Oxidative stress in horses in three 80 km races. **Equine Nutr Phys Soc Proc**, v. 18, p. 47-52, 2003.

WOLFFENBÜTTEL, S. et al. Achados clínico-laboratoriais em sete cães com resposta sorológica à leptospirose. **Medvep. Submetido para publicação**, 2003.

YAGI, K.; MASE, R. Coupled reaction of creatine kinase and myosin A-adenosine triphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 2, p. 397-403, 1962. ISSN 0021-9258.

YU, L. W. et al. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans, trans-muconaldehyde. **Analytical biochemistry**, v. 156, n. 2, p. 326-333, 1986. ISSN 0003-2697.

YU, X.-J. et al. Interaction between AT1 receptor and NF- κ B in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to oxidative stress and sympathoexcitation by modulating neurotransmitters in heart failure. **Cardiovascular toxicology**, v. 13, n. 4, p. 381-390, 2013. ISSN 1530-7905.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. **Biomedicine & pharmacotherapy= Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 42, n. 8, p. 513-519, 1987. ISSN 0753-3322.

ZUIN, R. et al. High-dose N-acetylcysteine in patients with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Clinical drug investigation**, v. 25, n. 6, p. 401-408, 2005. ISSN 1173-2563.