



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADO À  
AGROPECUÁRIA**

**THIAGO MAUÉS AMARAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs E GENES-ALVO EM SANGUE PERIFÉRICO  
DE EQUINOS QUARTO DE MILHA ANTES E APÓS TREINO**

**BELÉM-PA**

**2022**

THIAGO MAUÉS AMARAL

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs E GENES-ALVO EM SANGUE PERIFÉRICO  
DE EQUINOS QUARTO DE MILHA ANTES E APÓS TREINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Genética Animal.

Orientador: Dr. Ednaldo da Silva Filho

BELÉM

2022

## THIAGO MAUÉS AMARAL

### **Análise da Expressão de miRNAs e Genes-Alvo em Sangue Periférico de Equinos Quarto de Milha Antes e Após Treino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção de título de mestre. Orientador: Dr. Ednaldo da Silva Filho.

Aprovado em 24 de fevereiro de 2022.

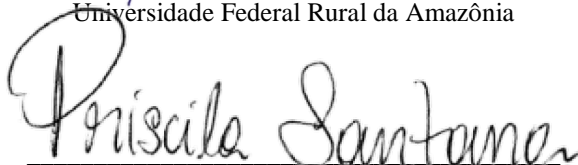
#### **BANCA EXAMINADORA:**



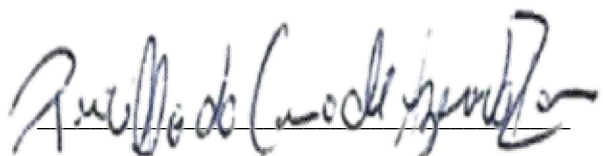
Dr. Ednaldo da Silva Filho - Presidente (Orientador)  
Universidade Federal Rural da Amazônia

  
\_\_\_\_\_

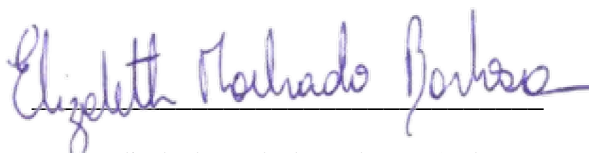
Dr. Igor Guerreiro Hamoy - Membro Interno  
Universidade Federal Rural da Amazônia



Dra. Priscila Di Paula Bessa Santana – Membro Interno  
Universidade Federal Rural da Amazônia



Dra. Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos – Membro Externo  
Universidade Federal Rural da Amazônia



Dra. Elizabeth Machado Barbosa - Suplente  
Universidade Federal do Amapá

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A485a Amaral, Thiago Maués

Análise da Expressão de miRNAS e Genes-Alvo em Sangue Periférico de Equinos Quarto de Milha Antes e Após Treino / Thiago Maués Amaral. - 2022.  
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

1. Desempenho Atlético. 2. Quarto de Milha. 3. Expressão Gênica. 4. MiRNAs. I.

CDD

---

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Manoel de Lima Amaral e Maria de Fátima Maués Amaral, meus amigos, colegas de laboratório e aos que acreditaram em mim nessa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida.

Minha família, em especial aos meus pais que serviram de alicerce para a minha caminhada.

Meu orientador e aos colegas de laboratório pela ajuda durante o percurso do mestrado.

Minha namorada e amigos, que acreditaram e me deram forças para continuar.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte da minha vida e que me ajudaram mesmo que de forma indireta na minha formação.

“A verdade pode ser intrigante. Pode dar algum trabalho lidar com ela. Pode ser contraintuitiva. Ela pode contradizer preconceitos profundamente enraizados. Pode não se coadunar com o que queremos desesperadamente que seja verdade. Mas nossas preferências não determinam o que é verdade”.

Carl Sagan

## RESUMO

No mundo, existem aproximadamente 60 milhões de cavalos, o Brasil é o 4º país com a maior quantidade de equinos em cabeças ( $\leq 6$  milhões). O Agronegócio Brasileiro movimentava anualmente cerca de R\$ 7,5 bilhões e o uso de cavalos em práticas esportivas é o segmento mais lucrativo da equinocultura. No capítulo I, o objetivo foi realizar uma revisão de literatura, buscando compreender a utilização do cavalo Quarto de Milha e suas principais atividades relacionadas, bem como entender a fisiologia animal relacionada ao exercício. Para a revisão, foram utilizados 7 artigos base e 92 artigos para discussão. No capítulo II, o objetivo da pesquisa foi investigar a expressão diferencial de microRNAs e genes-alvo participativos em vias metabólicas do exercício, e verificar alterações hematológicas e clínicas em equinos da raça QM sob diferente condição fisiológica. Para o experimento foram utilizados 10 equinos (*Equus caballus*) da raça quarto de milha. Os animais foram submetidos a esforços físicos com desvio de obstáculos e foram avaliados clinicamente antes e após exercício. Como parâmetros clínicos foi utilizado a Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca e Temperatura Retal, como parâmetros hematológicos foi utilizado 19 parâmetros do sangue total (hemograma completo), para avaliação molecular foram selecionados os genes ALDOA e EGFR e os microRNAs miR-133b e miR-1260b. Como resultados clínicos houve diferença estatística para FR ( $<0.0001$ ), FC ( $<0.0001$ ) e TR ( $<0.0001$ ), esses parâmetros devem ser considerados como importantes no manejo da saúde animal, bem como avaliar o desempenho fisiológico dos cavalos durante os treinos. Os 9 parâmetros hematológicos que mostraram significância ( $p < 0,05$ ) antes e pós-exercício foram: Eritrócito; Hematócrito; Hemoglobina; Volume Corpuscular Médio; Amplitude de distribuição dos eritrócitos; Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, Neutrófilos e Linfócitos. Esses parâmetros estão relacionados com a capacidade aeróbia devido ao aumento do transporte de oxigênio, tornando indicadores da saúde equina. A expressão dos genes ALDOA ( $p < 0.0454$ ) e EGFR ( $p < 0.0198$ ) e os microRNAs -133b ( $p < 0.0240$ ), -1260b ( $p < 0.0066$ ) tiveram significância após o exercício. A regulação do gene ALDOA está associada com a metabolização do oxigênio para a conversão de energia, a regulação do EGFR pode estar mais relacionada com a recuperação pós treino provocada pela resposta inflamatória responsiva ao exercício, devido ao grande estresse fisiológico e gasto energético, o miR-133b e -1260b ainda não tinham sido relatados na literatura associados a modulação de vias metabólicas do exercício, apesar de não regularem os genes dessa pesquisa, estes microRNAs mostraram ser regulados após exercício, o que mostra estarem regulando outros genes-alvos. Esses biomarcadores encontrados podem ser utilizados como referência para atletas da raça QM



criadas na região norte e nordeste do Brasil. As alterações observadas para alguns parâmetros nas variáveis peso e sexo não tiveram relevância clínica ( $p > 0,05$ ). Um futuro exame bioquímico poderá mostrar indícios de outros biomarcadores.

**Palavras-chaves:** Desempenho atlético; Quarto de Milha; Expressão de Genes; MiRNAs.

## ABSTRACT

In the world, there are approximately 60 million horses, Brazil is the 4th country with the largest number of horses in heads ( $\leq 6$  million). Brazilian Agribusiness generates around R\$ 7.5 billion annually and the use of horses in sports is the most profitable segment of equinoculture. In chapter I, the objective was to carry out a literature review, seeking to understand the use of the Quarter Horse and its main related activities, as well as to understand the animal physiology related to exercise. For review, 7 base articles and 92 articles for discussion were used. In chapter II, the objective of the research was to investigate the differential expression of microRNAs and participatory target genes in exercise metabolic pathways, and to verify hematological and clinical alterations in QM horses under different physiological conditions. For the experiment, 10 horses (*Equus caballus*) of the quarter mile breed were used. The animals were submitted to physical efforts with obstacle avoidance and were clinically evaluated before and after exercise. Respiratory Rate, Heart Rate and Rectal Temperature were used as clinical parameters, 19 whole blood parameters were used as hematological parameters (complete blood count), for molecular evaluation the ALDOA and EGFR genes and the miR-133b and miR-1260b microRNAs were selected. . As clinical results, there were statistical differences for FR ( $<0.0001$ ), FC ( $<0.0001$ ) and TR ( $<0.0001$ ), these parameters should be considered as important in the management of animal health, as well as evaluating the physiological performance of horses during training. The 9 hematological parameters that showed significance ( $p<0.05$ ) before and after exercise were: Erythrocyte; hematocrit; Hemoglobin; Mean Corpuscular Volume; Range of distribution of erythrocytes; Mean Corpuscular Hemoglobin, Neutrophils and Lymphocytes. These parameters are related to aerobic capacity due to increased oxygen transport, making equine health indicators. The expression of genes ALDOA ( $p<0.0454$ ) and EGFR ( $p<0.0198$ ) and microRNAs -133b ( $p<0.0240$ ), -1260b ( $p<0.0066$ ) were significant after exercise. The regulation of the ALDOA gene is associated with the metabolism of oxygen for the conversion of energy, the regulation of the EGFR may be more related to the post-training recovery provoked by the inflammatory response responsive to the exercise, due to the great physiological stress and energy expenditure, the miR -133b and -1260b had not yet been reported in the literature associated with modulation of exercise metabolic pathways, despite not regulating the genes of this research, these micros showed to be regulated after exercise, which shows that they regulate other target genes. These biomarkers found can be used as a reference for athletes of the QM race created in the north and northeast of Brazil. The changes observed for some parameters in

the variables weight and sex had no clinical relevance ( $p>0.05$ ). A future biochemical examination may show evidence of other biomarkers.

**Keywords:** Athletic Performance; Quarter Horse; gene expression.; MiRNAs.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1: Delineamento da Pesquisa. ....	26
Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos e miRNAs.....	30
Tabela 2: Parâmetros Clínicos antes e pós exercício.....	31
Tabela 3: Parâmetros hematológicos antes e pós treino. ....	32
Figura 2: Expressão de miRNAs e genes-alvo antes e pós treino .....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS:</b> .....	<b>7</b>
<b>3. CAPÍTULO I</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1 A EQUINOCULTURA NO BRASIL E NO PARÁ</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 RAÇA QUARTO DE MILHA E SEU USO NAS PRÁTICAS ESPORTIVAS</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3 DESEMPENHO FÍSICO E EXIGÊNCIA MUSCULAR</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4 MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA ADAPTAÇÃO AO EXERCÍCIO FÍSICO</b> .....	<b>13</b>
<b>3.5 MICRORNAS (MIRNAS)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.6 MIRNAS NA ADAPTAÇÃO AO EXERCÍCIO FÍSICO</b> .....	<b>17</b>
<b>3.7 METABOLISMO BIOQUÍMICO ENVOLVIDO NA MODULAÇÃO MUSCULAR</b> .....	<b>18</b>
<b>4. CAPÍTULO II</b> .....	<b>22</b>
<b>5. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>6.1 DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>26</b>
<b>6.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS</b> .....	<b>26</b>
<b>6.3 ETAPAS DO EXPERIMENTO</b> .....	<b>27</b>
6.3.1 <i>Parâmetros Clínicos e Hematológicos</i> .....	<i>27</i>
6.3.2 <i>Técnicas de Biologia Molecular</i> .....	<i>28</i>
<b>6.4 SOFTWARES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>30</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>7.1 EXAME CLÍNICO</b> .....	<b>31</b>
<b>7.2 EXAME HEMATOLÓGICO</b> .....	<b>31</b>
<b>7.3 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS MIRNAS E GENES-ALVO</b> .....	<b>32</b>
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>9. CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>10. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>11. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
<b>ANEXO 1 – PARÂMETROS CLÍNICOS</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXO 2 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS</b> .....	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os equinos foram os animais que mais desempenharam um papel direto no desenvolvimento social e político da humanidade, pois este era empregado principalmente em processos agrícolas no século passado e utilizados como meio de transporte e como armas de guerra. Com o avanço tecnológico, grande parte do seu uso prático terminou, ficando restrito às regiões com baixo índice de desenvolvimento econômico. Contudo, os seres humanos mantiveram estreita relação com estes animais, criando-os para a prática de esportes, recreação, ou simplesmente por sua beleza física (MATTOSINHO *et al.*, 2017; PEREIRA, 2015).

O uso de cavalos em práticas esportivas é o segmento mais lucrativo da equinocultura. Além das provas funcionais, as corridas movimentam grande volume de dinheiro devido às apostas, contratações e comércio de animais. Pesquisas utilizando marcadores moleculares têm impulsionado bons resultados no melhoramento genético de espécies comerciais de produção, sendo que em equinos, a utilização desta biotecnologia ainda é pouco explorada. Alguns testes genéticos visam auxiliar o processo de seleção de animais para desempenhos superiores em corridas (PEREIRA, 2015).

O melhoramento genético dos cavalos atletas ainda é pouco investigado, fazendo com que a obtenção de um animal superior para competição seja uma tarefa difícil. A maior causa desta dificuldade é a baixa herdabilidade em relação ao desempenho atlético nesses animais e os valores de correlações genéticas existentes entre as características almejada, sendo que, a alternativa para a resolução desse problema é a utilização de marcadores genéticos e moleculares (WALLIN; STRANDBERG; PHILIPSSON, 2003; BOKOR, 2005; PEREIRA, 2017).

Devido a isso é de suma importância identificar genes e vias metabólicas que participam de forma direta na regulação dos mecanismos relacionados à atividade física. Para isso, pretende-se analisar a expressão diferencial de RNAs não codificadores de proteínas, em especial de microRNAs, em como podem regular genes participativos de vias relacionadas ao exercício, seja na superexpressão ou silenciamento de genes a um programa de treinamento de força de cavalos quarto de milha.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Analisar as diferenças na expressão de RNAs não codificadores de proteínas, em especial os miRNAs, e as expressões de genes em sangue periférico, e verificar alterações hematológicas e clínicas em equinos da raça Quarto de Milha sobre diferente condição fisiológica.

### **2.1 Objetivo específicos:**

- a) Elaborar uma revisão de literatura sobre a raça Quarto de Milha no Brasil e sua utilização pelos produtores, bem como aprofundar sobre a sua fisiologia em adaptação ao exercício físico.
- b) Analisar o perfil hematológico e os parâmetros clínicos como a Frequência Cardíaca (FC), Frequência Respiratória (FR), Temperatura Retal (TR) e Peso (Kg) de equinos da raça Quarto de Milha antes e após esforço físico;
- c) Verificar a expressão de miRNAs e genes-alvo relacionados as vias metabólicas do exercício antes e após o esforço físico;

### 3. CAPÍTULO I

**EXPRESSÃO DE miRNAs EM GENES-ALVO FUNCIONAM COMO FERRAMENTA  
PARA SELEÇÃO DE EQUINOS EM PROVAS DE RESISTÊNCIA?**



**EXPRESSÃO DE miRNAs EM GENES-ALVO FUNCIONAM COMO FERRAMENTA  
PARA SELEÇÃO DE EQUINOS EM PROVAS DE RESISTÊNCIA?**

O artigo será submetido à revista Ciência Animal Brasileira.

Thiago Maués Amaral <sup>a\*</sup>, Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos <sup>b</sup>, Ednaldo da Silva Filho <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Socioambiental e dos Recursos Hídricos, Universidade Federal Rural da Amazônia, PA, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, PA, Brasil.

\*Correspondência: Universidade Federal Rural da Amazônia; Instituto de saúde e Produção Animal, Laboratório de Biologia Molecular, Pa, Brasil. CEP. 66.077-830.

Fone +55 91 99804-4041

Endereço de e-mail: Thiago.maues@outlook.com

## RESUMO

Os equinos desempenharam um papel importante no desenvolvimento social e político da humanidade, ao longo dos anos os seres humanos mantiveram estreita relação com estes animais, criando-os principalmente para a prática esportiva. No mundo, existem aproximadamente 60 milhões de cavalos, o Brasil é o 4º país com a maior quantidade de equinos em cabeças ( $\leq 6$  milhões). O Agronegócio Brasileiro movimenta anualmente cerca de R\$ 7,5 bilhões e o uso de cavalos em práticas esportivas é o segmento mais lucrativo da equinocultura. Embora, as mais diversas características versáteis que o cavalo Quarto de Milha possui, buscas por maiores exigências no desempenho atlético em equinos tem se tornado comum, devido à valorização econômica. Sendo assim, o potencial atlético é influenciado por uma complexa rede entre conjunto de genes e fatores ambientais, o exercício modula a necessidade do uso de todos os sistemas fisiológicos do corpo do cavalo. Processos metabólicos ligados ao ótimo desempenho atlético têm sido demonstrado em alguns estudos em mamíferos, esses estímulos causados pelo estresse fisiológico faz com que ocorra inúmeras reações metabólicas na tentativa de adaptação do organismo. Com isso, vias metabólicas específicas de sinalização regulam a atividade transcricional e de tradução da resposta inflamatória ocorrida após o esforço atlético em cavalos. Estudos recentes apontam um papel significativo na expressão de microRNAs envolvidos em vias de regulação gênica, e essas adaptações moleculares ao exercício, mostram ser uma área promissora na seleção de equinos de alta performance para provas de resistência.

**Palavras-chaves:** Desempenho Atlético; Quarto de Milha; Expressão Gênica; MiRNAs.

## INTRODUÇÃO

Os equinos foram os animais que mais desempenharam um papel direto no desenvolvimento social e político da humanidade, pois este era empregado principalmente em processos agrícolas no século passado e utilizados como meio de transporte e como armas de guerra. Com o avanço tecnológico, grande parte do seu uso prático terminou, ficando restrito às regiões com baixo índice de desenvolvimento econômico. Contudo, os seres humanos mantiveram estreita relação com estes animais, criando-os para a prática de esportes, recreação, ou simplesmente por sua beleza física (MATTOSINHO *et al.*, 2017; PEREIRA, 2015).

No mundo, existem aproximadamente 60 milhões de cavalos, maioria deles vivendo nas Américas, Ásia e alguns países da Europa. China é o país com maior contingente (aproximadamente 8 milhões), seguindo-se Estados Unidos (7 milhões), México (pouco mais de 6 milhões), e Brasil (pouco menos de 6 milhões). Estes quatro países, conjuntamente, possuem cerca de 45% da população global de cavalos (GHILPA, 2011; IBGE, 2019).

O uso de cavalos em práticas esportivas é o segmento mais lucrativo da equinocultura. Além das provas funcionais, as corridas movimentam grande volume de dinheiro devido às apostas, contratações e comércio de animais. Pesquisas utilizando marcadores moleculares têm impulsionado bons resultados no melhoramento genético de espécies comerciais de produção, sendo que em equinos, a utilização desta biotecnologia ainda é pouco explorada. Alguns testes genéticos visam auxiliar o processo de seleção de animais para desempenhos superiores em corridas (PEREIRA, 2015).

### 3.1 A equinocultura no Brasil e no Pará

A equinocultura no Brasil vem ganhando destaque no mercado nos últimos anos, onde no Brasil existem quase 6 milhões de cavalos (IBGE, 2019). Sustentado por um caráter econômico, político e social, o agronegócio brasileiro possui um faturamento bruto de aproximadamente R\$ 16,15 bilhões de reais por ano, o rebanho envolve mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final e compõe a base do chamado Complexo do Agronegócio Cavalo e é responsável por gerar mais de 3 milhões de empregos diretos e indiretos (LIMA *et al.* 2006; MAPA, 2016).

Esses números convincentes de capital gerado e percentual de empregos estão relacionados ao forte crescimento da criação voltada para o público urbano, tanto para lazer quanto para esporte, ao contrário dos animais utilizados para atividades agropecuárias, pois

estes representam uma pequena parcela de consumo do segmento equestre (VIEIRA, 2015; MAPA, 2016).

O ranking dos cinco primeiros maiores rebanhos de equinos por estados brasileiros (em cabeças) segue na respectiva ordem: Minas Gerais (846.197), Rio Grande do Sul (520.760), Bahia (505.568), Pará (445.603) e Mato Grosso (441.603) e a região que detém a maior presença de rebanho de equinos é a sudeste, seguido da região sul, centro-oeste, nordeste e por fim norte (IBGE, 2019).

O número efetivo de rebanho (cabeças) do ano de 2015 (342.779) ao ano de 2019 (445.603) no Estado do Pará aumentou 29,32%, sendo que o ranking dos cinco primeiros municípios com maior número efetivo do rebanho (Cabeças) são: São Félix do Xingu (32.488), Marabá (20.900), Novo Repartimento (15.765), Água Azul do Norte (12.185) e Pacajá (11.768) (IBGE, 2019).

O Complexo do Agronegócio do Cavalo historicamente possui um estigma de que a atividade produtiva do cavalo era elitista, o que mudou com o passar dos anos, com o crescimento da classe média brasileira, incorporando milhões de brasileiros ao mercado, o que contribui para explicar este forte crescimento da equinocultura. No segmento de esportes no Brasil, o cavalo Crioulo e o Quarto de Milha juntos, possuem uma participação de 60,1% do mercado (MAPA, 2016).

### **3.2 Raça Quarto de Milha e seu uso nas Práticas Esportivas**

A primeira raça de equinos que se desenvolveu na América foi a Quarto de Milha (QM), iniciando-se nos Estados Unidos por volta do ano de 1600 (VULCANO *et al.*, 2006). A raça se caracteriza por extrema docilidade, partida rápida, parada brusca, grande capacidade em alternar a direção e enorme habilidade de girar sobre si mesmo e considerada a mais versátil do mundo, é utilizada em várias modalidades de trabalho e corrida, sendo o cavalo completo segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha – ABQM (2016) (VULCANO *et al.*, 2006; CORRÊA; DA MOTA, 2007; PETERSEN *et al.*, 2014; RIVERO; HILL, 2016; BLUMAN, 2017; AQHA, 2021).

Cavalos da raça Quarto de Milha pertencem a uma das maiores populações de equinos registrados no mundo (AQHA, 2021) e a terceira no Brasil (IBGE, 2019). Como já descrito anteriormente os cavalos QM são conhecidos por sua grande versatilidade, podendo ser utilizados em modalidades equestres de competição, como corridas em curtas distâncias, tambor, baliza, vaquejada, polo e provas de rodeio em geral, preservadas as suas atividades

desde a formação no século 17, devido ao seu grande desempenho físico (CORRÊA; DA MOTA, 2007; CAPELLETO; ANGELI; GRAFF, 2017).

### **3.3 Desempenho Físico e Exigência Muscular**

As exigências por equinos com alto desempenho atlético crescem cada vez mais, devido à cultura do esporte juntamente à valorização econômica de animais de alto desempenho esportivo (RODRIGUES; SPINDOLA; BOTTEON, 2016). Cavalos com bom desempenho nas competições, deve ser preparado adequadamente, através de treinamentos, e deve receber uma alimentação adequada. Quanto ao desempenho, a resistência é um fator importante, tendo influência do condicionamento físico do animal, que inclui eficiência dos sistemas respiratório e circulatório, do solo, das condições climáticas, manejo e o peso vivo (REZENDE *et al.*, 2015; ANTUNES *et al.*, 2018).

O exercício modula a necessidade de uso de todos os sistemas fisiológicos do corpo do cavalo (PICCIONE *et al.*, 2013). Os exercícios físicos que moldam o tecido muscular são geralmente agrupados em duas grandes categorias: aqueles que aumentam a resistência muscular e os que aumentam a força muscular (MARINI; VEICSTEINAS, 2010).

O potencial atlético é influenciado por complexa rede entre conjunto de genes e fatores ambientais (HILL *et al.*, 2010c). Parâmetros físicos de frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) são importantes na observação do desempenho fisiológico do atleta. O primeiro é um importante parâmetro de monitoramento de desempenho atlético em equinos, sendo amplamente estudado no campo da medicina esportiva, com a vantagem da praticidade, mensuração e ser facilmente aplicada mesmo em estudos de campo (EVANS, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2008; MANSO FILHO *et al.*, 2012a; CHAVES, 2016; NUNES, 2018).

A avaliação do desempenho é fundamental para o reconhecimento de suas habilidades e a intensidade do exercício mais adequada em diferentes fases de treinamento, somados a mecanismos moleculares envolvidos na adaptação ao exercício (PATELLI *et al.*, 2016).

### **3.4 Mecanismos Moleculares Envolvidos na Adaptação ao Exercício Físico**

Processos metabólicos ligados ao ótimo desempenho atlético têm mostrado alguns aspectos semelhantes em humanos e equinos (DIAS *et al.*, 2007; SCHRÖDER *et al.*, 2012). O exercício físico é um dos estímulos fisiológicos mais estressantes que um animal pode sofrer;

durante o esforço físico, inúmeras reações metabólicas são mediadas na tentativa de adaptação do organismo (GONDIN *et al.*, 2013).

A modulação muscular provocada pelo exercício físico, induz uma expressão gênica. Adaptações musculares provocada pelo exercício físico, modifica o estado sedentário para o fenótipo exercitado, o que induz a expressão e regulação de genes. Esse mecanismo de modulação muscular envolve um efeito cascata na produção de proteínas e na atividade de enzimas. Vias metabólicas específicas de sinalização regulam a atividade transcricional e de tradução da resposta inflamatória ocorrida no músculo esquelético (PILEGAARD, *et al.*, 2003; BARRÈS *et al.*, 2012).

Assim, respostas agudas e adaptações crônicas do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico promovem crescimento abrupto no conteúdo de mRNA, na atividade de enzimas e no conteúdo de proteínas que resultam em ganho de função contrátil, desencadeando ativação ou repressão de vias moleculares de sinalização que regulam a transcrição e a tradução de proteínas, que após cessação do trabalho mecânico (sessão de exercício), retornam à condição basal cerca de 24h (PILEGAARD, *et al.*, 2003; EGAN, ZIERAT, 2013; ABREU *et al.*, 2017).

Entretanto, as repetidas sessões de exercício caracterizado pelo treinamento físico, desencadeia um gradual e progressivo aumento do conteúdo de mRNA e de proteínas resultando em ganho de performance (ABREU *et al.*, 2017). O treinamento físico promove uma mudança no consumo energético pelo músculo, metabolizando Ácidos Graxos não esterificados para uma mistura de Ácido Graxos, glicose e glicogênio muscular (SIGAL *et al.*, 2004; RIVERO; HILL, 2016).

Durante a fase inicial do exercício, o glicogênio se torna a principal fonte de energia, promovendo um aumento no nível de enzimas de oxidação de ácidos graxos e de transportadores de glicose (GLUT4) estimulado por insulina, e desloca proteínas contráteis e regulatórias para suas isoformas mais eficientes em função do esgotamento gradual do glicogênio (SIGAL *et al.*, 2004; BAAR, 2004).

A glicose funciona como fonte de energia utilizada para contração muscular, principalmente no início de exercícios de longa duração. Em equinos o aumento da glicemia depende do esforço gerado, e os níveis séricos servem como fonte de 20% a 50% de substrato energético utilizado pela musculatura esquelética durante o exercício (TEIXEIRA; PADUA, 2002; MIRANDA *et al.*, 2011; REZENDE *et al.*, 2015).

O músculo esquelético demonstra alto grau de plasticidade e se adapta rapidamente a diferentes exercícios físico regularmente praticado. A resposta molecular causada por uma

única sessão de exercício, destinado a induzir a hipertrofia e ativar mecanismos miogênicos e anabólicos resultando no aumento do nível de oxigênio e principalmente o tamanho da fibra muscular, elevando o nível de expressão de RNA mensageiro (mRNA) dos genes *IGF binding protein-4*, *MyoD*, *myogenin*, *cyclin* e *p21-Waf1* (BICKEL *et al.*, 2005; HILL *et al.*, 2010; SCHRÖDER *et al.*, 2012).

Com a expansão das pesquisas genômicas, estudos mostraram-se promissores aos fatores genéticos associados a resposta ao exercício, porém poucos genes foram relacionados com atuação nos mecanismos ligados à atividade física. Alguns grupos de pesquisa evidenciaram que muitos genes com efeitos pequenos podem contribuir para características complexas, o que leva a necessidade de uma abordagem menos centrada em genes codificadores de proteínas, já que estes são uma pequena parcela do genoma, que apresenta  $> 3 \times 10^9$  nucleotídeos e cuja função ainda não é totalmente compreendida (ROTH, 2011).

Diversos estudos têm revelado um papel significativo na expressão de RNAs não codificadores de proteínas, em especial de microRNAs, cuja principal função resulta em silenciamento gênico pós-transcricional. Em um programa de treinamento de força, humanos e animais tiveram expressão diferencial de miRNAs reguladores da plasticidade do músculo esquelético. Alguns dos miRNAs já descritos na literatura regulam diversos mRNAs-alvo, tornando um dos mais complexos processos da regulação gênica. Esses grupos de estudo mostraram a importância potencial da regulação de miRNA em adaptações ao exercício no músculo esquelético, mostrando ser uma área promissora na investigação de mecanismos moleculares envolvidos na adaptação ao exercício físico (DAVIDSEN *et al.*, 2011; OGASAWARA *et al.*, 2016). Os miRNAs específicos, presentes em músculo esquelético e cardíaco desempenham papel importante no desenvolvimento e adaptação muscular em resposta a atividade física regularmente executada (MCCARTHY; ESSER, 2007; MCCARTHY, 2008; VAN; LIU; OLSON, 2008; NIELSEN *et al.*, 2010). Tanto em mamíferos quanto humanos, os efeitos do exercício físico na modulação muscular, principalmente sobre a expressão de diferentes genes têm sido investigados por meio de técnicas de *microarray* ou pela análise de expressão individual de mRNAs utilizando métodos de PCR quantitativo (qPCR) (BRADBURY, 2003; OGASAWARA *et al.*, 2016).

### 3.5 MicroRNAs (miRNAs)

O primeiro microRNA validado ocorreu em 1993, o RNA não codificador complementar a região 3'UTR do gene LIN-14 foi descoberto em um nematoide *C. elegans*. A

caracterização funcional de LIN-4 tendo um efeito de repressão na tradução do gene LIN-14 abriu um importante campo de investigação (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; RUVKUN, 1993; SHIRDEL *et al.*, 2011).

Posterior diversos experimentos *in vitro* e *in silico* buscaram compreender e revelar o papel do microRNAs e seus alvos na regulação gênica, como resultado a descoberta do segundo miRNA, também em nematoide, o microRNA let-7, que possui como alvo os genes LIN-41 e HBL-1, a partir da descoberta do miR-let-7 o conceito de miRNAs deu o salto de nematoides para espécies mais complexas, uma vez que a sequência de let-7 apresenta homologia conhecida diversos seres vivos (SHIRDEL *et al.*, 2011).

Os microRNAs pertencem a uma classe de pequenos RNAs não-codificantes, que possuem aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (BARTEL, 2004). Os miRNAs estão envolvidos na regulação da expressão gênica pós-transcricional por meio da ligação à região 3' não traduzida (UTR), sequência codificadora ou 5'UTR de RNAs mensageiros (mRNA) alvos e conduzindo à inibição da transcrição ou degradação do mRNA em diversos processos biológicos em organismos (NAKAYA *et al.*, 2007; DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010; ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011; STASZEL *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2017; O'BRIEN *et al.*, 2018).

Nos seres humanos, prevê-se que a expressão de aproximadamente 50% de genes codificadores de proteínas são regulados por miRNAs (ZHOU, *et al.*, 2012). Sabe-se que miRNAs de plantas adquiridos durante a alimentação são capazes de atravessar o trato gastrointestinal e regular mRNAs dentro de tecidos de mamíferos (ZHANG *et al.*, 2012).

Os miRNAs regulam genes envolvidos em várias vias metabólicas, entre eles, apoptose, proliferação, diferenciação, metástase (ALMEIDA *et al.*, 2011) e em células de mamíferos desempenham papéis importantes no desenvolvimento humano, na diferenciação celular, homeostase, na adaptação ao meio ambiente, ontogênese, e nas interações das células hospedeiras com agentes patogênicos (NAKAYA *et al.*, 2007; HA, 2011; MA *et al.*, 2011; PEREIRA, 2017).

A descoberta de miRNAs tem uma grande significância, pois a classe de pequenos RNAs regulatórios possuem um papel mais complexo na biologia (FIRE *et al.*, 1998). Muitos desses RNAs estão conservados em muitos organismos, incluindo humanos, o que mais tarde observou-se participações em vias de silenciamento (FRANÇA *et al.*, 2010).

Subsequentemente, muitos milhares de miRNAs foram descobertos em muitos organismos. Uma vez que cada miRNA pode atingir diversos mRNAs, a regulação da expressão de centenas de genes alvo, e redes inteiras de proteínas torna-se um mecanismo crítico para o



controle da expressão gênica (GRISHOK *et al.*, 2001; BARTEL, 2004; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; OGASAWARA *et al.*, 2016; CORREIA DE SOUSA *et al.*, 2019)

O avanço de miRNAs como biomarcador para diagnóstico em várias doenças humanas tornou-se uma ferramenta potencial na pesquisa de doenças (MITCHELL *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2008; ZENG; ZHANG; ZOU, 2016; CHEN *et al.*, 2019). Novos biomarcadores estão sendo explorados a partir de informações prévias da literatura em relações aos dados de expressão de miRNA-alvo. Essa tecnologia está intimamente ligada à transição da biologia molecular de sua fase clássica para a era pós-genômica, permitindo acelerar drasticamente o trabalho experimental da biologia molecular, e possibilitando uma abordagem experimental totalmente nova (COLOMBO, RAHAL, 2010; BALDASSARRE *et al.*, 2017).

Em vez de investigar a complexidade dos efeitos biológicos analisando genes únicos de suposta importância, um após o outro, muito ou mesmo todos os genes de um organismo podem agora ser testados de uma só vez (COLOMBO, RAHAL, 2010). A tecnologia de microRNAs liderou os estudos das funções biológicas individuais de alguns genes, proteínas, caminhos para investigações mais globais da atividade celular na adaptação ao exercício físico (HOHEISEL, 2006).

### **3.6 MiRNAs na adaptação ao exercício físico**

Os miRNAs de músculo específicos (miR-1, -133a, -133b e -206) foram identificados e demonstrados como importantes na miogênese, no crescimento do músculo embrionário, no crescimento e função do músculo cardíaco (MIYACHI *et al.*, 2010). Juntos respondem por quase 25% de toda a expressão no músculo, por isso são chamados de myomiRs. A expressão diferencial desses miRNAs após exercícios de esforço e em músculo esquelético de diabéticos sugerem que myomiRs desempenham um papel na saúde e doença em humanos. O que pode resultar diferenças na sensibilidade ou sinalização à insulina em resposta ao exercício físico (NIELSEN *et al.*, 2010).

Os myomiRs, são altamente expressos *in vivo*, e podem ser regulados durante alterações no fenótipo muscular. Por exemplo, miR-1 e miR-133a são reprimidos no músculo esquelético de camundongos durante hipertrofia induzida por ablação sinérgica bilateral no músculo plantaris. Uma sessão aguda de exercícios resulta em aproximadamente 50% de repressão em miR-1, enquanto não houve alteração na expressão de miR-133a (DAVIDSEN *et al.*, 2011).

Em mamíferos, especificamente, miR-1, miR-133a, são expressos quase exclusivamente no tecido do músculo estriado (músculo cardíaco e esquelético). Além disso,

miR-133b e miR-206 são exclusivamente expressos no músculo esquelético (RAO *et al.*, 2010). O miR-133b controla o fator de crescimento do tecido conjuntivo (GJYMISHKA *et al.*, 2016) e pode suprimir a remodelação cardíaca (LI; ZHOU; TANG, 2018). Portanto, o exercício físico pode ser uma alternativa excelente para controlar a remodelação cardíaca, possivelmente pela modulação do miR-133b e pela modificação da sinalização celular (IMPROTA-CARIA; ARAS JÚNIOR, 2021).

Os miRNAs da família let-7 são altamente conservadas em todas as espécies animais. Em organismos mais complexos, a expressão let-7 aumenta drasticamente à medida que as células se tornam mais diferenciadas. A sua sequência conservada, expressão e papéis em aspectos biológicos fundamentais em filogenia, faz com que o let-7 esteja intimamente expresso a todo tempo. Além da regulação da expressão let-7 no nível transcricional, também pode ocorrer no nível pós-transcricional, como visto em mamíferos (ROUSH; SLACK, 2008; WANG *et al.*, 2012).

Estudos recentes mostraram que em seres humanos, dezessete miRNAs, especialmente 23b-3p, 26a-5p, 32-5p, 148b-3p e 376a-3p, foram diferencialmente expressos na linha de base e 23 miRNAs, especialmente let-7a-5p, 95, 148a-3p e 376a-3p e 26 miRNAs, especialmente 30d-5p e 376a-3p, foram regulados diferencialmente após o teste de esforço agudo e crônico, respectivamente, no músculo esquelético entre microRNAs suprerexpressos e reprimidos, indicando que os padrões de expressão de vários miRNAs são alterados por exercícios agudos e/ou crônico, e que estes estão envolvidos na adaptação fisiológica do músculo esquelético em resposta molecular ao exercício (OGASAWARA *et al.*, 2016). Alguns estudos têm demonstrado uma maior participação do metabolismo bioquímico em resposta a adaptação pós estresse muscular.

### **3.7 Metabolismo Bioquímico Envolvido na Modulação Muscular**

O exercício físico é considerado um fator estressante, devido as alterações reversíveis em diversas variáveis homeostáticas que são passíveis de quantificação laboratorial (GONDIN *et al.*, 2013). Como consequência do treinamento de esforço, um aumento na capacidade oxidativa do músculo esquelético pode ser observada, e tal adaptação metabólica é o resultado de cascatas bioquímicas que influenciam a expressão gênica desencadeada pelas alterações nos níveis de metabólitos (CAIADO *et al.*, 2011; PEREIRA, 2015).

O aumento na capacidade oxidativa muscular envolve múltiplos caminhos e ocorre através da utilização de ácidos graxos, biogênese mitocondrial e níveis mais elevados de

enzimas, melhoria no transporte de glicose e neoangiogênese (MARINI; VEICSTEINAS, 2010).

O teste de esforço físico representam uma ferramenta para avaliar o condicionamento físico através da análise de alterações fisiológicas que ocorrem em resposta ao exercício realizado. Dependendo da intensidade e duração, o exercício tem efeitos sobre os parâmetros fisiológicos, e mesmo diferentes tipos de atividade atlética realizadas podem afetar as respostas fisiológicas (WANDERLEY *et al.*, 2015).

Há diferentes vias de metabolização dos substratos energéticos para obtenção de energia durante o exercício (GARCIA, 2012). As vias, tanto a aeróbia quanto a anaeróbia, são utilizadas durante o exercício e a contribuição de cada uma delas depende da natureza, intensidade, duração e frequência do exercício, também do tipo de fibra muscular, da disponibilidade de oxigênio e de substratos energéticos, além da presença de metabólitos intermediários para poder ativar ou inibir a atuação de algumas enzimas, em atletas humanos (COSTA *et al.*, 2010).

A utilização aprimorada de lipídios durante um exercício de moderada intensidade nos músculos de indivíduos que realizam treino de esforço obtiveram um aumento seletivo nos níveis de mRNA de enzimas envolvidas na metabolização de ácidos graxos intramusculares e na sua oxidação. Em particular, em atletas de competição, tem sido relatado que o conteúdo de *Medium* e *Very Long Chain-específica Acil-CoA Desidrogenases* (MDAC e VLDAC), envolvidos na beta-oxidação de ácidos graxos e de *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* - (PPAR $\alpha$ ) no músculo esquelético dobrou, apesar de um aumento limitado em todo o corpo e na oxidação de ácidos graxos plasmáticos (RODGERS *et al.*, 2008; MARINI; VEICSTEINAS, 2010).

A mitocôndria parece ser a organela chave envolvida na adaptação metabólica ao treinamento de esforço. Elas hospedam numerosas proteínas envolvidas na beta oxidação, bem como todas as proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa. O conteúdo de DNA mitocondrial aumenta no músculo de atletas de alto desempenho, juntamente com o nível de fatores de transcrição nucleares (NRF-1, NRF-2 e TFAM) que controlam genes mitocondriais codificados no núcleo. Como resultado, RNAs mitocondriais transcritos no núcleo e nas mitocôndrias têm um aumento coordenado em atletas de competição (MARINI; VEICSTEINAS, 2010).

A capacidade atlética dos cavalos é atribuída a adaptações fisiológicas, essa capacidade é atribuível à sua alta capacidade aeróbica, grandes reservas intramusculares de substratos energéticos e em particular glicogênio, alto volume mitocondrial no músculo, a capacidade de aumentar o transporte de oxigênio no sangue no início do exercício através de contração esplênica, eficiência da marcha e eficiência termorregulação (HINCHCLIFF; GEOR, 2008).

Ao início do exercício físico o equino apresenta diversas respostas fisiológicas que visam a melhora na capacidade de transporte do oxigênio (FRANKLIN *et al.*, 2012). O aumento do transporte de oxigênio do ar para o músculo associada à liberação de eritrócitos é um dos fatores para a alta capacidade aeróbia dos equinos, dependendo da intensidade do exercício o transporte de grandes volumes de oxigênio são necessários para suportar a alta taxa metabólica do exercício intenso (HOLCOMBE, 2006; MCGOWAN, 2008; LIMA, 2014).

A grande capacidade aeróbica em cavalos está associada a vários fatores, incluindo um débito cardíaco máximo maior e uma concentração mais alta de hemoglobina (ALONSO, *et al.*, 2013). O débito cardíaco é o produto da frequência cardíaca e do volume sistólico, em que determina a entrega de sangue, e, portanto, oxigena o tecido (MIRIAN, 2008).

Altas taxas de aeróbica no metabolismo muscular de cavalos são favorecidos pela alta densidade capilar no músculo (hipertrofia), favorecendo o oxigênio entrega e alta atividade de enzimas envolvidas na utilização de energia no músculo (CAMERON-SMITH, 2002; POOLE; ERICKSON, 2008; MIRIAN, 2008). A prática regular da atividade física aeróbica é um dos principais componentes para a promoção da saúde, prevenção de um conjunto de doenças crônicas e até no tratamento de algumas delas (MATSUDO, 2009, COELHO, BURINI; 2009).

O treinamento prepara o atleta equino para a competição, induzindo as adaptações fisiológicas necessárias para realizar um alto nível com risco mínimo de lesão e fornecendo os fatores comportamentais e psicológicos apropriados, essenciais para uma competição efetiva e para preparar um cavalo adequadamente para a competição, o cavalo deve executar regularmente o tipo de atividade que realizará na competição em uma intensidade que induza as mudanças fisiológicas necessárias para permitir o desempenho ideal (HINCHCLIFF; GEOR, 2008).

Na modulação da resposta inflamatória pós exercício, as citocinas pró-inflamatórias desempenharem um papel importante, contribuindo na resposta do estresse crônico e depressão (MULLER *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2015). O aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram observadas no sangue de pacientes com depressão (HOWREN *et al.*, 2009). A superexpressão de citocinas também foram encontrados sangue e regiões específicas do cérebro em um modelo de depressão induzida pelo estresse crônico em ratos (BAY-RICHTER *et al.*, 2011; YOU *et al.*, 2011).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso do Complexo do Agronegócio do Cavalo tem sido comprovado na última década com o seu forte crescimento, principalmente nas competições equestres fortemente apoiada pelo caráter econômico, social e político do Brasil. A raça Quarto de Milha possui uma diversidade de aptidões, estas sendo aproveitadas para diversos torneios e modalidades como corridas, provas de tambor, baliza, vaquejada e entre outras.

Contudo, exigências por equinos com alto desempenho atlético crescem cada vez mais, devido à cultura do esporte juntamente à valorização econômica de animais de alto desempenho esportivo. As repetidas sessões de exercício caracterizado pelo treinamento físico, desencadeia um gradual e progressivo aumento do conteúdo de mRNA e de proteínas resultando em ganho de performance.

Desde a sua domesticação equinos Quarto de Milha tem sido selecionados para força, resistência ao exercício físico e velocidade. Dificuldades para o desenvolvimento de pesquisas e suas aplicações, tanto de forma quantitativa (utilizando-se informações fenotípicas e de pedigree) quanto molecular (utilizando-se informações provenientes diretamente do DNA) tem sido relatadas por diversos pesquisadores.

Entretanto, diversos estudos recentes permitiram avanço nas pesquisas até então realizadas, apontando um papel significativo na expressão de microRNAs. Alguns destes, podem regular vários mRNAs alvos, tornando este processo um dos mais complexos reguladores gênicos. Entender a importância potencial da regulação de miRNA em adaptações moleculares ao exercício, mostra ser uma área promissora na seleção de equinos de alta performance para provas de resistência, quando disponibilizados no mercado, possivelmente movimentarão milhões de dólares ao ano.

## 4. CAPÍTULO II

# GENES DIFERENCIALMENTE REGULADOS E miRNAs ENVOLVIDOS NAS VIAS METABÓLICAS DO DESEMPENHO ATLÉTICO EM EQUINOS QUARTO DE MILHA

**GENES DIFERENCIALMENTE REGULADOS E miRNAs ENVOLVIDOS NAS VIAS  
METABÓLICAS DO DESEMPENHO ATLÉTICO EM EQUINOS QUARTO DE  
MILHA**

O artigo será submetido à revista equine veterinary journal

Thiago Maués Amaral <sup>a\*</sup>, Murilo Moura Ferreira<sup>d</sup>, Moises Moreira Lima<sup>b</sup>, Roberta de  
Araújo Silva<sup>b</sup>, Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos<sup>b</sup>, Elizabeth Machado Barbosa<sup>c</sup>,  
Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>d</sup>, Ednaldo da Silva Filho<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Socioambiental e dos Recursos Hídricos, Universidade Federal Rural da Amazônia,  
PA, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, PA, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Agrárias e Biologia, Universidade Federal do Amapá, Campus  
Mazagão - AP, Brasil.

<sup>d</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia PA,  
Brasil.

\*Correspondência: Universidade Federal Rural da Amazônia; Instituto de saúde e Produção  
Animal, Laboratório de Biologia Molecular, Pa, Brasil. CEP. 66.077-830. Fone +55 91  
99804-4041

Endereço de e-mail: Thiago.maués@outlook.com

## RESUMO

A raça Quarto de Milha pertencem a terceira maior população de equinos registados no Brasil. No cenário brasileiro de esporte equestre, a sua participação tem destaque por apresentar inúmeras habilidades em diversas modalidades. O objetivo dessa pesquisa é investigar a expressão diferencial de microRNAs e genes-alvo participativos em vias metabólicas do exercício e verificar alterações hematológicas e clínicas em equinos da raça QM sob diferente condição fisiológica. Selecionou-se 10 equinos (*Equus caballus*) da raça QM, de ambos os sexos e entre 6 anos de idade, com peso de 400 a 513kg, com a mesma condição de manejo hídrico e sanitário durante todo o experimento. Os cavalos foram submetidos a corrida com desvio de obstáculos. Os resultados obtidos mostraram que os parâmetros clínicos a FR ( $<0.0001$ ), FC ( $<0.0001$ ) e TR ( $<0.0001$ ) devem ser considerados como importantes parâmetros no manejo da saúde animal, bem como avaliar o desempenho fisiológicos dos cavalos durante os treinos. Os 9 parâmetros hematológicos que mostraram significância ( $p<0,05$ ) antes e pós-exercício foram: Eritrócito; Hematócrito; Hemoglobina; Volume Corpuscular Médio; Amplitude de distribuição dos eritrócitos; Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, Neutrófilos e Linfócitos. Esses parâmetros estão relacionados com a capacidade aeróbia devido ao aumento do transporte de oxigênio, tornando indicadores da saúde equina. Os genes ALDOA ( $p<0.0454$ ) e EGFR ( $p<0.0198$ ) e os microRNAs -133b ( $p<0.0240$ ), -1260b ( $p<0.0066$ ) tiveram significância após o exercício. A regulação do gene ALDOA está associada com a metabolização do oxigênio para a conversão de energia, a regulação do EGFR pode ter maior relação com a recuperação pós treino provocada pela resposta inflamatória responsiva ao exercício, o miR-133b e -1260b ainda não haviam sido relatados na literatura associados a modulação de vias metabólicas do exercício, apesar de não regularem diretamente os genes-alvo dessa pesquisas, estes micros mostraram ser regulados após exercício, o que podem estarem regulando outros genes. Esses biomarcadores encontrados podem ser utilizados como referência para atletas da raça QM criadas na região norte e nordeste do Brasil. As alterações observadas para alguns parâmetros nas variáveis peso e sexo não tiveram relevância clínica ( $p>0,05$ ). Um futuro exame bioquímico poderá elucidar indícios entre as condições alimentares.

**Palavras-chaves:** Desempenho Atlético, Quarto de Milha, Expressão Gênica; MiRNAs.



## 5. INTRODUÇÃO

No mundo existem aproximadamente 60 milhões de cavalos, sendo que a maioria vive nas Américas, Ásia e em alguns países da Europa. A China é o país com maior contingente (aproximadamente 8 milhões), seguida dos Estados Unidos (7 milhões), México (pouco mais de 6 milhões) e Brasil (pouco menos de 6 milhões). Esses quatro países em conjunto possuem cerca de 45% da população global de equinos (GHILPA, 2011; IBGE, 2019).

Embora o cavalo tenha características versáteis, o seu uso em práticas esportivas é o segmento mais lucrativo da equinocultura. Sustentada por um caráter econômico, político e social, o agronegócio brasileiro possui um faturamento bruto de aproximadamente R\$ 16,15 bilhões de reais, sendo responsável por gerar mais de 3 milhões de empregos diretos e indiretos (LIMA *et al.* 2006; MAPA, 2016).

Alguns testes genéticos visam auxiliar o processo de seleção de animais para desempenhos esportivos superiores. Pesquisas recentes mostraram a importância da regulação de microRNAs em adaptações ao exercício, mostrando ser uma área promissora, visto que, os miRNAs participam no processo de silenciamento gênico pós-transcricional em resposta a programas de treinamento de força (ALMEIDA, 2010, DAVIDSEN *et al.*, 2011).

Alguns dos miRNAs conhecidos podem regular vários genes alvos, tornando este processo um dos mais complexos reguladores gênicos. Aproximadamente 50% dos miRNAs são derivados de transcritos de RNA não codificadores, enquanto 40% estão localizados dentro de íntrons de genes codificadores de proteínas (DAVIS; HATA, 2009).

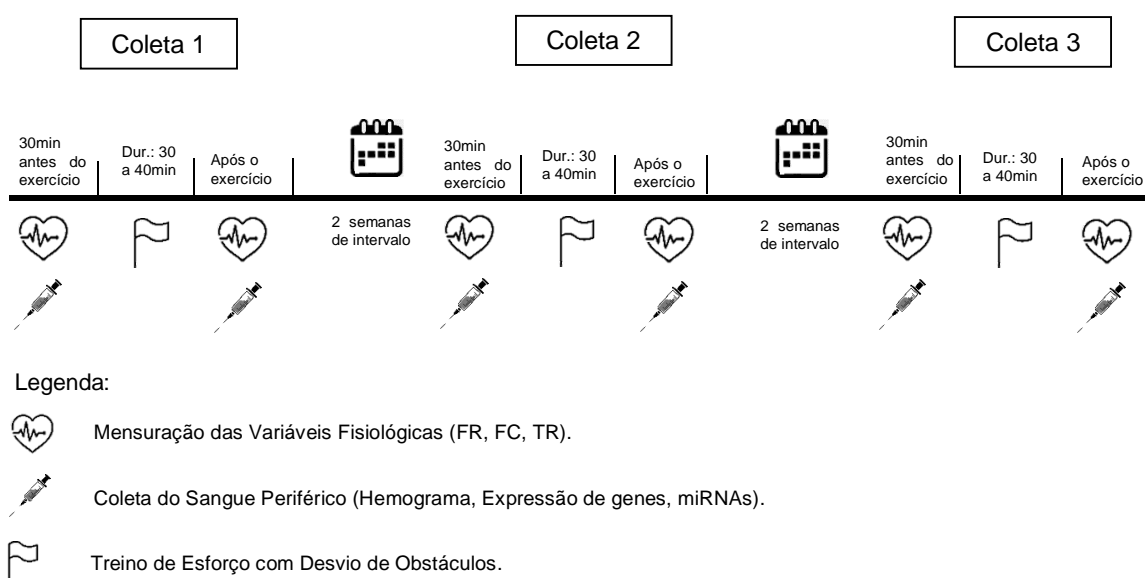
Portanto, estudar como ocorre a regulação do exercício a partir da modulação de miRNAs é de grande importância para se selecionar genes-alvo que participam das vias metabólicas envolvidas no desempenho atlético de equinos quarto de milha.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Desenho Experimental

A figura 1 apresenta a dinâmica proposta para a coleta de amostras de sangue periférico de equinos e obtenção dos dados clínicos de cada animal, durante os três períodos de coleta. No primeiro período, consistiu em coleta das amostras de sangue e mensuração das variáveis fisiológicas (FR, FC, TR) 30 minutos antes dos animais entrarem na pista de exercício, após, os equinos realizaram treinos com desvio de obstáculos com permanência de 30 a 40min. na pista de treino, logo após o término, foram coletados novamente amostras de sangue e a mensuração das variáveis fisiológicas, a mesma metodologia foi empregada para os períodos de coleta 2 e 3.

**Figura 1:** Delineamento da Pesquisa.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

### 6.2 Obtenção das Amostras

Após aprovado sob o CEUA nº 6957170620 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) em 02/09/2020 e seguindo de acordo com os padrões de bem-estar animal determinados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) do Brasil. Foram utilizados 10 equinos (*Equus*

*caballus*) da raça Quarto de Milha (dois machos e oito fêmeas), clinicamente saudáveis, com idades aproximadas de 6 anos, pesando entre 400 e 513kg, sob a mesma condição de manejo hídrico / sanitário e alimentar durante todo o experimento. Foram realizadas três coletas em períodos diferentes (10/06/2021, 24/06/2021 e 15/07/2021), com intervalo de duas semanas entre as coletas.

Os testes de esforço e coleta das amostras de sangue periférico, assim como os parâmetros clínicos de cada animal antes e após exercício, ocorreram no centro de treinamento Gilberto Sampaio no município de Castanhal – PA, à 65 km da capital, com as seguintes coordenadas: 1°18'06.1"S 47°54'10.6"W. As amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia jugular com agulha (21G), trinta minutos antes do exercício (momento basal) e imediatamente após o término do exercício, sendo colocados em tubos com EDTA (4 ml) para posterior análise de hemograma, e em tubos (1,5 ml) com RNA Later (300 µl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para análise de expressão de genes e microRNAs circulantes. As alíquotas do soro e do plasma também foram separadas e mantidas acondicionadas sob refrigeração a -20°C (caixas térmicas com gelo) até o momento das análises laboratoriais.

### **6.3 Etapas do Experimento**

#### **6.3.1 Parâmetros Clínicos e Hematológicos**

Para avaliar o desempenho dos cavalos mediante ao esforço físico, foram realizados parâmetros clínicos de avaliação animal antes e após o exercício físico, como a Frequência Respiratória por minuto (FRM), Frequência Cardíaca por minuto (FCM), avaliando os batimentos cardíacos por minuto (BPM), Temperatura Retal (TR °C) e os dados de Peso (Kg) estimado de cada animal foi coletado por meio de uma fita métrica.

Para avaliação das alterações hematológicas no desempenho atlético, bem como a saúde animal, utilizou-se o analisador hematológico ProCyte Dx (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Estados Unidos) e um chip de perfil equino que compõe 19 parâmetros do sangue total (hemograma completo), sendo os seguintes parâmetros avaliados: Eritrócitos (M/µl), Hemoglobina (g/dL), Hematócrito (%), Volume Corpuscular Médio (VCM) (fL), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (pg), Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (RDW) (%), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) (g/gdl), Leucócitos (µl), Linfócitos (k/µl), Monócitos (µl e %), Eosinófilos (k/µl e %), Neutrófilos (k/µl e %), Basófilos (k/µl e %) e Plaquetas (k/µl).

### 6.3.2 Técnicas de Biologia Molecular

Os testes moleculares foram conduzidos no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular, vinculado ao Instituto de Saúde e Produção Animal – ISPA, da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, no município de Belém-PA.

#### 6.3.2.1 Seleção de Genes e miRNAs

Da seleção de microRNAs e genes-alvo embasou-se na literatura, a partir de autores que realizaram testes prévios, identificando possíveis marcadores para desempenho atlético equino, Pacholewska *et al.* (2016) estudaram miRNAs de tecido equino expressos no soro, e Cappelli *et al.* (2018) avaliaram biomarcadores na adaptação ao exercício em cavalos de resistência. Sendo assim, após a filtragem da literatura foram separados os seguintes genes participantes nas vias metabólicas relacionada ao exercício: ALDOA (PACHOLEWSKA *et al.*, 2016), EGFR (CAPPELLI *et al.*, 2018), ACTB e GAPDH (endógenos).

Para validar a nomenclatura do genes alvos utilizou-se o site HUGO - *Gene Nomenclature Committee* ([genenames.org](http://genenames.org)) e posterior os *webservers* GeneMania (<https://genemania.org/>), GTEEx Portal (<https://gtexportal.org/home/>), avaliando dessa forma as procedências e realizando testes *in silico* que pudessem validar as escolhas dos genes alvos expressos no sangue periférico dos cavalos.

Após a definição dos genes-alvo realizou-se uma busca nos miRNAs circulantes através da biblioteca virtual de microRNAs, mirBase (<http://www.mirbase.org/>) e validando no TargetScan7.1 ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)). Na biblioteca virtual estão cadastrados até o momento da pesquisa no site, 18.226 entradas representando precursores de miRNAs, expressando 38.589 miRNAs maduros em 271 espécies, e em *Equus caballus* estão cadastrados 715 precursores, e 690 miRNAs maduros existentes (<http://www.mirbase.org>, acessado dia 15/06/21). Portanto, os microRNAs escolhidos foram: hsa-miR-1260b que tem como alvo o ALDOA, hsa-miR-133b que tem como alvo o EGFR e o endógeno o Let-7-5p.

### 6.3.2.2 Extração e quantificação de RNA dos equinos

A extração de RNA foi realizada pelo método TRIZOL<sup>®</sup> Reagente da Invitrogen seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, os RNAs extraídos foram sujeitos a quantificação no espectrofotômetro BioDrop Duo<sup>®</sup> (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido). O grau de pureza foi determinado através da razão 260A/280A, sendo considerado ótimo as amostras com razão igual ou superior a 1.9. Após quantificação, foi padronizado a concentração de RNA em 100 ng/uL.

### 6.3.2.3 Amplificação do cDNA

Os RNAs circulantes foram convertidos em cDNA por meio da amplificação de primers específicos, para verificar os níveis de expressão foram utilizados os seguintes primers, ALDOA, EGFR e os endógenos ACTB e GAPDH (**Tabela 1**). Os primers foram desenhados utilizando sequências conhecidas do genoma do EquCab3.0 pelo NCBI, a seleção dos pares de iniciadores ideais para amplificação de produto de PCR foram geradas no *websoftware* Primer3Plus (<https://primer3plus.com>).

Já os microRNAs hsa-miR-1260b, hsa-miR-133b e o endógeno o let-7-5p as sequências foram validados na biblioteca do MIRbase (<https://www.mirbase.org>), os pares de primers dos miRNAs foram gerados por meio do miRprimer V2.0.

A reação da cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) foi feita utilizando pares de primers específicos para cada miRNA e genes-alvo (**Tabela 1**). A reação foi feita por meio da técnica *One Step*, realizando a transcrição reversa, do RNA para cDNA, e à amplificação deste último logo em seguida.

As reações foram realizadas utilizando um termociclador CFX96 (BIO-RAD) com volume final de 10 µL e todas as condições de reagentes, temperatura e tempos foram de acordo com as recomendações do fabricante do kit.

**Tabela 1:** Sequência de oligonucleotídeos e miRNAs.

MicroRNAs	SEQUÊNCIA SINTETIZADA (5' -> 3')
<b>hsa-miR-1260b</b>	CAGATCCCACCACTGC (FOR)
	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTATG (REV)
<b>hsa-miR-133b</b>	GTTTGGTCCCCTTCAACC (FOR)
	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGCTG (REV)
<b>let-7-5p (endógeno)</b>	GCAGTGAGGTAGTAGGTTG (FOR)
	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAACTATAC (REV)
Genes	SEQUÊNCIA SINTETIZADA (5' -> 3')
<b>ALDOA</b>	GCCCTGACCTTCTCCTATGG (FOR)
	CAGGGCTCGCTTGACATATT (REV)
<b>EGFR</b>	CCAAGCCCTACAGACTCCAA (FOR)
	GTGGAGGGACTGTGGAAGAA (REV)
<b>ACTB (endógeno)</b>	GGGACCTGACGGACTACCTC (FOR)
	CTTGATGTCACGCACGATTT (REV)
<b>GAPDH (endógeno)</b>	AGTCCTCCACGATGCCAA (FOR)
	AGTCCCTCCACGATGCAA (REV)

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Os resultados da RT-qPCR foram analisados a fim de verificar a expressão dos genes selecionados na participação da regulação de vias metabólicas relacionadas ao exercício pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de Livak e Schmittgen (2001).

#### 6.4 Softwares e Análises Estatísticas

Após as etapas moleculares, os dados quantitativos foram submetidos no software SAS (versão OnDemand) por meio do teste de análise de variância tendo como efeitos avaliação o período de coletas, o efeito do exercício e a interação. Quando resultava em significância, as médias eram comparadas pelo teste de Tukey para verificar os dados quanto a expressão de genes regulados e miRNAs envolvidos em vias metabólicas do estresse fisiológico, bem como análise hematológica e das variáveis fisiológicas coletadas. O nível de significância foi de 0,05.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Exame clínico

Os parâmetros clínicos dos animais foram aferidos antes e após o treino (**Ver anexo 1**). Os dados obtidos a partir do exame clínico, apontaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas variáveis de Frequência Respiratória por minuto (FRM), Frequência Cardíaca por minuto (FCM) e Temperatura Retal (TR) (**Tabela 2**).

Após o exercício, os animais tiveram a FRM com elevação de 3 a 4 vezes em comparação com a frequência basal, sendo que a FR<sub>máx.</sub> chegou a 176 respirações por minuto após o exercício, a FC duplicou e com a FC<sub>máx.</sub> de 184 batimentos cardíacos por minuto após o exercício, a temperatura retal dos cavalos teve uma elevação de 3 graus após exercício.

**Tabela 2:** Parâmetros Clínicos antes e pós exercício.

Parâmetros Clínicos	Média Antes $\pm$ DP	Média Após $\pm$ DP	Pvalor ( $<0.05$ )
FRM	28,3 $\pm$ 6,06	113,8 $\pm$ 25,44	$<0.0001$
FCM	48,9 $\pm$ 8,12	105,9 $\pm$ 17,19	$<0.0001$
TR	37,2 $\pm$ 0,30	40,5 $\pm$ 0,72	$<0.0001$

Fonte: Arquivo pessoal.

### 7.2 Exame Hematológico

Dos 19 parâmetros submetidos a análise de variância em software, os que tiveram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) antes e pós-treino foram os seguintes: Eritrócito, hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), neutrófilos, linfócitos e plaquetas.

**Tabela 3:** Parâmetros hematológicos antes e pós treino.

Parâmetros Hematológicos	Média Antes $\pm$ DP	Média Após $\pm$ DP	Pvalor (<0.05)
Eritrócito (M/ $\mu$ L)	7,7 $\pm$ 0,86	9,1 $\pm$ 1,02	<0.0001
Hematócrito (%)	34,4 $\pm$ 5,25	41 $\pm$ 5	<0.0001
Hemoglobina (g/dL)	12,6 $\pm$ 1,30	14,7 $\pm$ 1,52	<0.0001
Volume Corpuscular Médio (VCM) (fL)	43,47 $\pm$ 1,91	44,59 $\pm$ 1,74	<0.0289
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (pg)	16,09 $\pm$ 0,65	15,98 $\pm$ 0,61	<0.3075
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) (%)	29,49 $\pm$ 1,59	30,57 $\pm$ 1,92	<0.0205
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) (g/dL)	36,8 $\pm$ 1,12	35,9 $\pm$ 0,74	<0.0009
Neutrófilos (K/ $\mu$ L)	61 $\pm$ 5,31	57,5 $\pm$ 5,70	<0.0167
Leucócitos (K/ $\mu$ L)	8,91 $\pm$ 1,49	9,48 $\pm$ 1,01	<0.1120
Monócitos (K/ $\mu$ L)	0,44 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,08	<0.1084
Eosinófilos (K/ $\mu$ L)	0,22 $\pm$ 0,11	0,20 $\pm$ 0,10	<0.4940
Basófilos (K/ $\mu$ L)	0,04 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	<0.6798
Linfócitos (K/ $\mu$ L)	2,70 $\pm$ 0,69	3,4 $\pm$ 0,67	<0.0002
Plaquetas (K/ $\mu$ L)	118,71 $\pm$ 18,41	135,93 $\pm$ 26,74	<0.0067

**Fonte:** Arquivo pessoal.

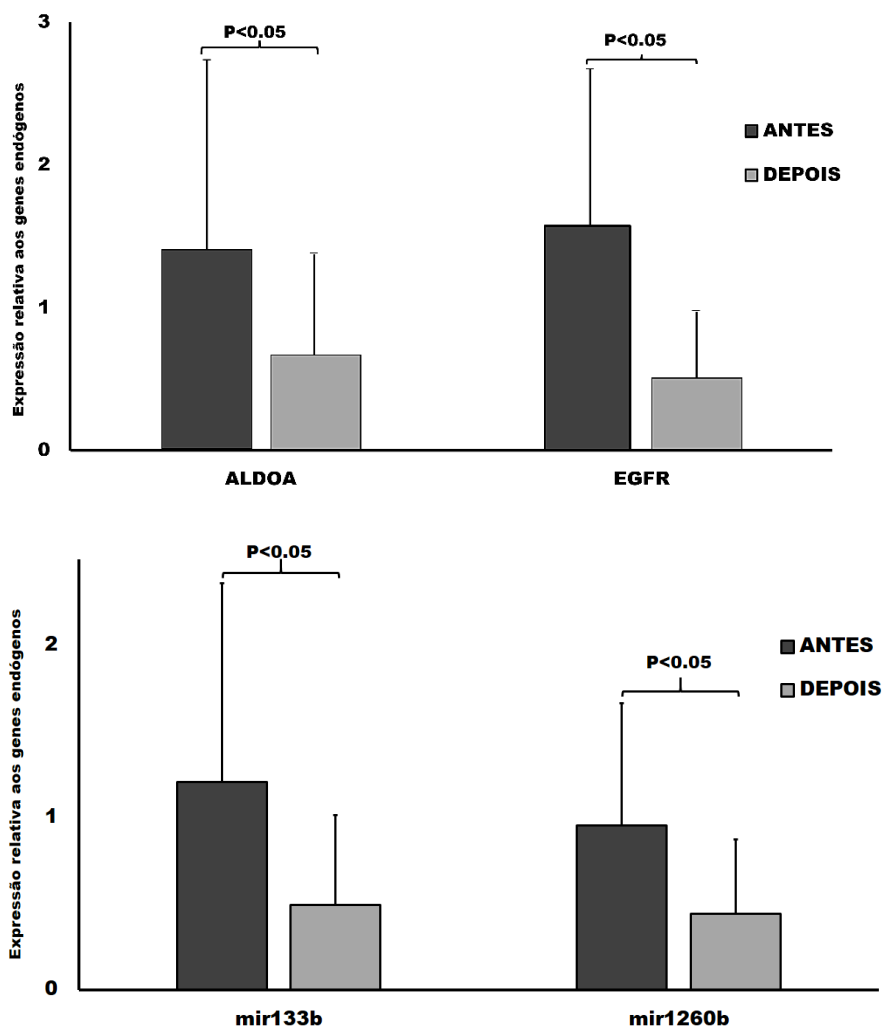
### 7.3 Expressão diferencial dos miRNAs e Genes-alvo

Dos pares de primers desenhados, todos tiveram eficiência de 100% na amplificação, as respectivas temperaturas da curva de *melt* foram: 76°C ALDOA, 82,5°C EGFR, 84°C ACTB, 83°C GAPDH, 77°C miR-133b, 76°C miR-1260b, 71°C miR-Let-7-5b. Dos microRNAs e genes-alvo submetidos a análise de variância no software estatístico, ambos mostraram ser responsivos positivamente ( $p < 0,05$ ) antes e pós-exercício. Os genes ALDOA ( $p < 0,0454$ ) e EGFR ( $p < 0,0198$ ) e os microRNAs -133b ( $p < 0,0240$ ), -1260b ( $p < 0,0066$ ) tiveram sua



expressão atenuadas, porém os miRNAs não mostraram regular diretamente os genes estudados.

**Figura 2:** Expressão de miRNAs e genes-alvo antes e pós-treino



O eixo Y mostra a expressão dos genes-alvo e miRNAs comparada com os endógenos.

\* Os valores da expressão conforme o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de Livak e Schmittgen (2001).

**Fonte:** Arquivo pessoal.

## 8. DISCUSSÃO

As taxas basais dos parâmetros clínicos corroboram com os achados de Binda e colaboradores (2016). A taquicardia pós-exercício como mostra em nossos resultados (**Tabela 2**), pode ser explicada pela intensidade e duração do exercício, e este aumento contribui com a necessidade metabólicas durante o exercício (DE *et al.*, 2009). A elevação da temperatura retal (**Tabela 2**) e conseqüentemente o estresse térmico estão associadas à piora no desempenho de equinos em diversas atividades, sob condições homeotérmicas. A FR é um mecanismo dependente da FC para a termorregulação, onde os cavalos realizam um ajuste na circulação sanguínea, direcionando o calor do músculo para a pele e para os pulmões, fazendo, desta forma, com que o sistema cardiovascular seja o principal executor através da vasodilatação periférica, gerando como consequência o aumento da frequência cardíaca, respiratória e temperatura corporal, sendo estes os principais parâmetros fisiológicos utilizados para avaliação do bem estar equino (FEITOSA, 2014; PEREIRA, 2015). Desta forma, o grau das alterações destas variáveis fisiológicas está relacionado com a intensidade e duração do exercício teste (FERRAZ, 2009).

Embora mesmo sabendo que o exercício físico ocasiona um estresse fisiológico no cavalo, as alterações fisiológicas e metabólicas, somadas com o fator climático pode tornar tal esforço ainda maior, principalmente em condições de estresse calórico, frequentes nas regiões norte e nordeste do Brasil, mesmo que estes elementos interferem no bem-estar animal, o cavalo Quarto de Milha tem mostrado boa adaptabilidade nessas regiões, e esse feito permite que esses cavalos apresentem melhor desempenho de acordo com a expressão de suas características genotípicas (OLIVEIRA, 2008; BALESTRERI, CUZZUOL, 2017; NICOLOFF, 2019)

Sobre os 19 parâmetros hematológicos investigados apenas 9 parâmetros mostraram significância ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 3**) relacionada com a prática do exercício, resultante da contração esplênica esforço-dependente que é proporcional ao exercício e de suma importância para os equinos, pois eleva a capacidade aeróbia devido ao aumento do transporte de oxigênio para o músculo esquelético (TERRA, 2012; MIRANDA *et al.*, 2011), se tornando indicadores da saúde equina.

O exercício físico leva a alterações na hidratação e no conteúdo eletrolítico o que explica o aumento de eritrócitos, mobilizando a redistribuição armazenada no baço para o volume plasmático circulante, com a finalidade de aumentar a capacidade sanguínea de transporte de oxigênio (Kingston, 2004; Muñoz *et al.* 2008). A elevação do hematócrito não é indicativo de

treinamento e sim de saúde. A contração do baço é estimulada pelos níveis de adrenalina liberado durante o exercício (NETO, 2017).

O sangue periférico possui potencial para o monitoramento da saúde do organismo bem como pode ser utilizado para investigação de doenças e alterações sutis de transcritos (MOHR; LIEW, 2007).

O ALDOA codifica uma isoenzima A que é expresso extensivamente em tecidos musculares. Esse gene contribui para várias funções celulares e processos biológicos relacionados à manutenção muscular, regulação da forma e mobilidade celular, contração do músculo estriado, organização do filamento de actina e processo biossintético de Adenosina Trifosfato (ATP) em eritrócitos, que dependem da glicólise para obter energia, a deficiência da isoenzima A é a mais grave, pois é a única que ocorre nos eritrócitos e nos músculos, o que pode acarretar um quadro clínico de fraqueza, dor muscular ou miopatia (YAO *et al.*, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2005).

A regulação da aldolase A pode ser explicada pelo efeito dos sistemas cardiovascular e hematológico, com o aumento da Frequência Cardíaca e conseqüentemente a Frequência Respiratória, os organismos dos equinos priorizam a captação do oxigênio, utilizando-o então para a metabolização de energia, e após os valores de FC e FR se reestabelecerem a aldolase A volta a se expressar e utilizar a metabolização da glicose como fonte de energia.

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está envolvido na remodelação muscular: crescimento e proliferação celular, desenvolvimento cardíaco, respostas cardíacas a cargas fisiológicas e patológicas; resposta inflamatória e modulação da migração celular em células normais e cancerosas (CAPPELLI *et al.*, 2018). O EGFR também modula a tolerância ao estresse de cardiomiócitos através das vias MAP quinase e fosfatidilinositol 3 quinase (REICHELTL *et al.*, 2017).

A regulação do gene EGFR pode ter maior relação com a recuperação pós treino provocada pela resposta inflamatória responsiva ao exercício, devido ao grande estresse e gasto energético, fazendo com que a sua expressão pós exercício volte aos níveis de normalidade para diminuir lesões em músculos, principalmente o cardíaco, visto que o exercício de longa duração exige um esforço maior do músculo.

O microRNA -133 regulam as respostas cardíacas, além disso, é responsivo ao exercício aeróbico e positivamente associados a Velocidade de transporte de oxigênio máxima ( $VO_2$  máx.) (MOOREN *et al.*, 2014; DENHAM; PRESTES, 2016). Diversas pesquisas apontam o microRNA -1260b como um biomarcador oncogênico (LIU *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021; Wang, 2021). Porém, até o momento da realização dessa pesquisa o miR-1260b e

o miR-133b ainda não tinham sido relatados na literatura associados a modulação de vias metabólicas relacionadas ao exercício.

Os miRNAs expressos e circulantes no sangue periférico podem estar associados em microvesículas derivadas de células, visto que estas estão relacionadas na comunicação e fisiologia celular, as vesículas são originadas da membrana lipídica e carregam agentes bioativos, como proteínas, lipídios e miRNAs de sua fonte celular, e são produzidas sob eventos orquestrados em resposta a uma infinidade de estímulos. O exercício físico introduz desafios fisiológicos sistêmicos capazes de romper agudamente a homeostase celular e estimular a liberação de microvesículas na circulação (WILHELM; MOUROT; RAKOBOWCHUK, 2018).

Sendo assim, esta pesquisa possibilitou demonstrar que os genes diferencialmente expressos ALDOA e EGFR, mostraram-se ser significativamente regulados após exercício (**Figura 2**) e podem ser bioindicadores de saúde animal, em que a baixa expressão no momento basal (antes do exercício), podem ajudar elucidar um melhor quadro clínico para recuperação pós treino ou no diagnóstico de doenças metabólicas relacionadas, os dados sugerem que os miRNAs selecionados, miR-133b e miR1260b podem regular outros genes expressos em sangue periférico relacionados a vias metabólicas do exercício e que os genes-alvo selecionados podem estar sendo regulado por outros miRNAs.

## 9. CONCLUSÃO

Esta pesquisa mostrou que os parâmetros clínicos FR, FC e TR devem ser levados como importantes parâmetros no manejo da saúde animal, bem como avaliar o desempenho fisiológicos dos cavalos durante os treinos.

Os valores hematológicos obtidos nesta pesquisa podem ser utilizados como referência para as espécies equinas criadas na região norte e nordeste do Brasil. A expressão dos genes ALDOA, EGFR e dos microRNAs -133b, -1260b ainda não relatados na literatura associados a modulação de vias metabólicas relacionadas ao exercício, funcionam como biomarcadores para avaliar o desempenho atlético de equinos quarto de milha antes e após treino. As alterações observadas para alguns parâmetros nas variáveis peso e sexo não tiveram relevância clínica. Um futuro exame bioquímico poderá mostrar indícios de outros biomarcadores.

## 10. REFERÊNCIAS

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agro 2017**. Inovações e impactos nos sistemas de informações estatísticas e geográficas do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: Centro de Estudo Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), ESALQ/USP, 2006. 251p.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília: MAPA, 2016.

VIEIRA, M. C. **Percepções e práticas de manejo em estabelecimentos equestres quanto à influência dessas práticas para o bem-estar de equinos**. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

VULCANO, L.C., MENDES, R.G., GODOY, C.L.B., MACHADO, V.M.V., BICUDO, A.L.C. Padronização da densidade mineral óssea (DMO) do acessório do carpo em equinos atletas da raça Quarto de Milha. **Ciência Rural**, mar. 2006; v. 36, n. 2, p. 520–524. ISSN 0103-8478

CORRÊA, M. J. M.; DA MOTA, M. D. S. Genetic evaluation of performance traits in Brazilian Quarter Horse. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 2, p. 145–151, 2007.

PETERSEN JL, MICKELSON JR, CLEARY KD, MCCUE ME. **The American Quarter Horse: population structure and relationship to the thoroughbred**. J Hered. Epub 2013 Nov 29. 2014 Mar-Apr;105(2):148-62. <https://doi.org/10.1093/jhered/est079>

RIVERO, J.L.L.; HILL, E.W.; Skeletal muscle adaptations and muscle genomics of performane horses. **The Veterinary Journal**, 2016; v.209, p.5-13, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.11.019>

BLUMAN, S. **The horse industry by the numbers**. Ride With Equo. 2017.

AQHA - AMERICAN QUARTER HORSE ASSOCIATION. **Horse-Breeding History**. 2021. Disponível em: <<https://abqm.com.br>>.

CAPELLETO, E.C.; ANGELI, A.L; GRAFF, H. Respostas Fisiológicas Em Quarto-De-Milha Após Prova De Tambor. Revista Acadêmica: **Ciência Animal**, v. 7, p. 299, 14 jun. 2017. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v7i3.9987>

RODRIGUES, I. M. S. M. DA M.; SPINDOLA, B. F.; BOTTEON, P. DE T. L. Biochemical and oxidative profile of horse used for a simulated barrel racing. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, 2016.

REZENDE, M.P.G., ABREU, U.G.P., SOUZA, J.C. SANTOS, S.A. RAMIRES, G.G. SITORSKI, L.G. Morfologia corporal de equinos Quarto de Milha puros e mestiços utilizados no laço comprido no Mato Grosso do Sul. **Archivos de Zootecnia**, 2015. <https://doi.org/10.21071/az.v64i246.395>

ANTUNES, V.L.C. NERONE, M.C. MOTA, R.R. ANDREAZZI, M.A. CAVALIERI, F.L.B. **Avaliação do Desempenho do Equino Atleta**. UNICESUMAR – Centro Universitário de Maringá 2018.

PICCIONE, G. MESSINA, V. BAZZANO, M. GIANNETTO, C., FAZIO, F. Heart rate, net cost of transport, and metabolic power in horse subjected to different physical exercises. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 33, n. 8, p. 586- 589, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.09.010>

MARINI, M.; VEICSTEINAS, A. The exercised skeletal muscle: a review. **Eur J Translat Myology**, v. 20, n. 3, p. 105-20, 2010. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2010.1807>

HILL, E. W; GU, J; MCGIVENY, B. A. MACHUGH, D.E. Targets of selection in the Thoroughbred genome contain exercise-relevant gene SNPs associated with elite racecourse performance. **Animal Genetics**, v. 41, p. 56-63, 2010c. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02104.x>

EVANS, D.L. Training and fitness in athletic horses. Report for Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC), Sydney, p.7, 2000.

MANSO FILHO, H.C MANSO, H.E. CARDOSO, E.A MELO, R.E SILVA, F.S ABREU, J.M.G. Avaliação da frequência cardíaca e do esforço físico em cavalos atletas pelo uso do frequencímetro. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. v. 15, n. 1/2/3, p. 41- 48, 2012a.

CHAVES, A.A. **Avaliação dos parâmetros físicos vitais, hematológicos e bioquímicos de equinos Quarto de Milha submetidos á prova de três tambores com diferentes frequências de treinamento** / Dissertação mestrado. Araçatuba: [s.n], 2016.

NUNES, L.F.N. **Concentração De Lactato, Frequência Cardíaca E Respiratória Em Equinos Crioulos De Enduro Em Treinamento Em Uma Cabanha No Município De Aceguá**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Pampa. Dom Pedrito, 2018.

PATELLI, T.H.C SOUZA, F.A.A. CARDOSO, M.J.L. FAGNANI, R. SILVA, A.R. NASCIMENTO, A.F. Atividade sérica das enzimas creatina quinase e aspartato aminotransferase em equinos submetidos a duas modalidades esportivas. **PUBVET**. v. 10, n. 8, p. 608-614, 2016.

DIAS, R.G. PEREIRA, A.C. NEGRÃO, C.E. KRIEGER, J.E. Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite. **Rev Bras Med Esp**. 13:211-6; 2007. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922007000300016>

SCHRÖDER, W. KLOSTERMANN, A. STOCK, KF. DISTL, O. A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian Warmblood horses. **Anim Genet**. 43:392-400; 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02265.x>

GONDIN, M. R.; FOZ, N. S. B.; PEREIRA, M. C.; FLAGLIARI, J. J.; OROZCO, C. A. G.; D'ANGELIS, F. H. F.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G. C. Acute phase responses of diferente 25 positions of high goal (Elite) polo ponies. **Journal of Equine Veterinary Science** xxx, p.1-6, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.02.005>



PILEGAARD, H. SALTIN, B. NEUFER, PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. **J Physiol.** 546(Pt 3):851-8. 2003. [10.1113/jphysiol.2002.034850](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.034850)

BARRÈS R, YAN J, EGAN B, TREEBAK JT, RASMUSSEN M, FRITZ T, CAIDAHN, K. KROOK, A. O'GORMAN, D. ZIERATH, J. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. **Cell Metab.** 15(3):405-11. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.001>

EGAN, B. ZIERATH, J.R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab.** 2013 17(2):162-84. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>

ABREU, P. LEAL-CARDOSO, J.H. CECCATTO, V.M. Adaptação do Músculo Esquelético ao Exercício Físico: Considerações Moleculares e Energéticas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** [online]. 2017. v. 23, n. 1, pp. 60-65. ISSN 1806-9940. <https://doi.org/10.1590/1517-869220172301167371>

SIGAL, R. J. KENNY, G.P. WASSERMAN, D.H. CASTANEDA-SCEPPA, C. WHITE, R.D. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 2004; v. 27, n. 10. <https://doi.org/10.2337/dc06-9910>

BAAR, K. Involvement of PPAR $\gamma$  co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR $\alpha$  in the adaptive response to endurance exercise. **Proceedings of the Nutrition Society**, 2004; v. 63, n. 2, p. 269-274. <https://doi.org/10.1079/PNS2004334>

TEIXEIRA, P.P. PADUA, J.T. Avaliação dos níveis de cortisol, tiroxina, triiodotironina e glicose como indicativos de estresse em cavalos Puro Sangue Inglês de corrida, antes e após a competição. **Ciência Animal Brasileira**, 2002 v.3, p.39-48.

MIRANDA, R.L.D. MUNDIM, A.V.; SAQUY, A.C.S.; COSTA, A.S.; GUIMARÃES, E.C.; GONÇALVES, F.C.; CARNEIRO E SILVA, F.O. Perfil hematológico de equinos submetidos à prova de Team Penning. **Pesquisa Veterinária Brasileira** [online]. 2011, v. 31, n. 1 pp. 81-86. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000100013>

BICKEL, C.S. SLADE, J. MAHONEY, E. HADDAD, F. DUDLEY, G.A.; ADAMS, G.R. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol**, 2005; v. 98, n. 2, p. 482-8.

HILL, E.W GU, J. EIVERS, SS. FONSECA, R.G. MCGIVENY, B.A., GOVINDARAJAN, P. NICK, O. KATZ, L.M. MACHUGH, D. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in Thoroughbred Horses. **PLoS One**. 5:1-6; 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008645>

ROTH, S. M. MicroRNAs: playing a big role in explaining skeletal muscle adaptation? **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 2, p. 301-302, 2011.

DAVIDSEN, P. K.; GALLAGHER, I. J.; HARTMAN, J. W.; TARNOPOLSKY, M. A.; DELA, F.; HELGE, J. W.; TIMMONS, J. A.; PHILLIPS, S. M. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. **J Appl Physiol**, 2011; v. 110, n. 2, p. 309-17. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00901.2010>

OGASAWARA, R., AKIMOTO, T., UMENO, T., SAWADA, S., HAMAOKA, T., & FUJITA, S. MicroRNA expression profiling in skeletal muscle reveals different regulatory patterns in high and low responders to resistance training. **Physiological Genomics**, 2016; 48(4), 320–324. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00124.2015>

MCCARTHY, J.J.; ESSER, K.A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **J Appl Physiol**, 2007. v. 102, n. 1. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00932.2006>

MCCARTHY, J.J. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 11, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.03.001>

VAN ROOIJ, E.; LIU, N.; OLSON, E. N. MicroRNAs flex their muscles. **Trends in Genetics**, 2008. v. 24, n. 4, p. 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.01.007>

NIELSEN, S.; SCHEELE, C.; YFANTI, C.; AKERSTROM, T. C.; NIELSEN, A. R.; PEDERSEN, B. K.; LAYE, M. J. Muscle Specific MicroRNAs are regulated by Endurance Exercise in Human Skeletal Muscle. **J Physiol**, 2010. v. 588, n. 20. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.189860>

BRADBURY, J. Human epigenome project--up and running. **PLoS Biol**, 2003; v. 1, n. 3, p. E82. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000082>

LEE, R.C. FEINBAUM, R.L. AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**. 1993. V. 75, n. 5, p 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)

WIGHTMAN, B. HA, I. RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. **Cell**. 1993;75(5):855-862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4

SHIRDEL, E. A.; XIE, W.; MAK, T. W.; JURISICA, I. Navigating the microne--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. **PLoS One**, 2011; v. 6, n. 2, p. e17429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017429>

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, 2004; v. 116, n. 2, p. 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)

NAKAYA, H. L.; AMARAL, P. P.; LOURO, R.; LOPES, A.; FACHEL, A. A.; MOREIRA, Y. B.; EL-JUNDI, T. A.; SILVA, A. M.; REIS, E. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. **Genome Biol** 8, R43 2007. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-3-r43>

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **Journal of biochemistry**, 2010; v. 148, n. 4, p. 381-392. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq096>

ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2011. V. 717, n. 1–2, p. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>

STASZEL, T. ZAPAŁA, B. POLUS, A., SADAKIERSKA-CHUDY, A. KIEĆ-WILK, B. STĘPIEŃ, E. WYBRAŃSKA, I. CHOJNACKA, M. DEMBIŃSKA-KIEĆ, A. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. **Pol Arch Med Wewn.** 2011; 121 (10): 361-367

XIAO, M.; LI, J.; LI, W.; WANG, Y.; WU, F.; XI, Y.; ZHANG, L.; DING, C.; LUO, H.; LI, Y. PENG, L. ZHAO, L. PENG, S. XIAO, Y. DONG, Y. CAO, J. YU, W. MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. **RNA Biol.** 14, 1326–1334, 2017. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1112487>

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. **Science.** 2018; 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

ZHOU, R.; LI, X.; HU, G.; GONG, A. Y.; DRESCHER, K. M.; CHEN, X. M. miR-16 targets transcriptional corepressor SMRT and modulates NF-kappaB-regulated transactivation of interleukin-8 gene. **PLoS One**, 2012; v. 7, n. 1, p. e30772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030772>

ZHANG, L.; HOU, D.; CHEN, X.; LI, D.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; LI, J.; BIAN, Z.; LIANG, X.; CAI, X.; YIN, Y.; WANG, C.; ZHANG, T.; ZHU, D.; ZHANG, D.; XU, J.; CHEN, Q.; BA, Y.; LIU, J.; WANG, Q.; CHEN, J.; WANG, J.; WANG, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. **Cell Res**, 2012; v. 22, n. 1. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.158>

HA, T. Y. MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. **Immune Network**, 2011; v. 11, n. 6, p. 309. <https://doi.org/10.4110/in.2011.11.6.309>

MA, R.; BULLOCK, E.; MAYNARD, P.; REEDY, B.; SHIMMON, R.; LENNARD, C.; ROUX, C.; MCDONAGH, A. Fingerprint detection on non-porous and semi-porous surfaces using NaYF<sub>4</sub>:Er, Yb up-converter particles. **Forensic science international**, 2011; v. 207, n. 1-3, p. 145-9. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.09.020>

PEREIRA, P. AUGUSTO, Q.P. QUEIROZ, J.A. FIGUEIRAS, A.R. SOUSA, F. New insights for therapeutic recombinant human miRNAs heterologous production: *Rhodovulum sulfidophilum* vs *Escherichia coli*, **Bioengenharia**, 2017; 8:5, 670-677, <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1284710>

FIRE, A. XU, S. MONTGOMERY, M.K. KOSTAS, S.A. DRIVER, S.E. MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, **Nature**, 1998; 391 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>

FRANÇA, N.R. MESQUITA JÚNIOR, D. LIMA, A.B. PUCCI, F.V.C. ANDRADE, L.E.C SILVA, N.P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Rev Bras Reumatol** 2010; 50(6):695-709.

GRISHOK, A. PASQUINELLI, A.E. CONTE, D. LI, N. PARRISH, S. HA, I. BAILLIE, D.L. FIRE, A. RUVKUN, G. MELLO, C.C. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing, **Cell**, 106 23-34. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7)

RICARTE FILHO, J.C.M. KIMURA, E.T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** [online]. 2006, v. 50, n. 6, pp. 1102-1107. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000600018>.

CORREIA DE SOUSA, M.; GJORGJIEVA, M.; DOLICKA, D.; SOBOLEWSKI, C.; FOTI, M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 6249. <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>

MITCHELL PS, PARKIN RK, KROH EM. *ET AL.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(30):10513–18; 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>

CHEN X, BA Y, MA L, *ET AL.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*; 2008; 18(10):997-1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>

CHEN X, XIE D, ZHAO Q, YOU ZH. MicroRNAs and complex diseases: from experimental results to computational models. **Brief Bioinform.** 2019;20(2):515-539. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx130>

ZENG X, ZHANG X, ZOU Q. Integrative approaches for predicting microRNA function and prioritizing disease-related microRNA using biological interaction networks. **Brief Bioinform.** 2016;17(2):193-203. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv033>

COLOMBO, J. RAHAL, P. A tecnologia de microarray em câncer de cabeça e pescoço. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, 2010; v. 8, n. 1, p. 64-72.

BALDASSARRE A, FELLI C, PRANTERA G, MASOTTI, A. Circulating microRNAs and bioinformatics tools to discover novel diagnostic biomarkers of pediatric diseases. **Genes** 8(9):234; 2017. doi: [10.3390/genes8090234](https://doi.org/10.3390/genes8090234)

HOHEISEL, J.D. Microarray technology: Beyond transcript profiling and genotype analysis. **Nature Reviews Genetics.** [S.l.]: Nature Publishing Group. 2006. <https://doi.org/10.1038/nrg1809>

MIYACHI, M.; TSUCHIYA, K.; YOSHIDA, H.; YAGYU, S.; KIKUCHI, K.; MISAWA, A.; IEHARA, T.; HOSOI, H. Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. **Biochemical and biophysical research communications**, 2010; v. 400, n. 1, p. 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.015>

RAO, P. K.; MISSIAGLIA, E.; SHIELDS, L.; HYDE, G.; YUAN, B.; SHEPHERD, C. J.; SHIPLEY, J.; LODISH, H. F. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and

differentiation of rhabdomyosarcoma cells. **The FASEB Journal**, 2010; v. 24, n. 9, p. 3427-3437. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150698>

GJYMISHKA A, PI L, OH SH, JORGENSEN M, LIU C, PROTOPAPADAKIS Y, *Et Al.* MiR-133b Regulação do Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo: Um Novo Mecanismo em Patologia do Fígado. **Am J Pathol.** 2016; 186(5):1092-102.

LI N, ZHOU H, TANG Q. miR-133: A Suppressor of Cardiac Remodeling? **Front Pharmacol.** 2018; 9:903. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00903>

IMPROTA-CARIA AC, ARAS JÚNIOR R. PHYSICAL EXERCISE TRAINING AND CHAGAS Disease: Potential Role of MicroRNAs. Treinamento com Exercício Físico e Doença de Chagas: Função Potencial dos MicroRNAs. **Arq Bras Cardiol.** 2021; 117(1):132-141.

ROUSH, S., SLACK, F.J. The let-7 family of microRNAs. **Trends in Cell Biology**, 2008; Vol.18 No.10. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>

WANG, D. J.; LEGESSE-MILLER, A.; JOHNSON, E. L.; COLLER, H. A. Regulation of the let-7a-3 Promoter by NF- $\kappa$ B. **PLoS One**, 2012; v. 7, n. 2, p. e31240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031240>

CAIADO, J. C. C. PISSINATE, G.L. DE SOUZA, V.R.C. DA FONSECA, L.A. CLARISSE S COELHO, C.S. Influence of physical exercise on serum activities of AST and CK and plasma concentration of lactate in Quarter horses submitted to team roping **Pesq. Vet. Bras.** 2011; p. 315-452. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000500014>

PEREIRA, G.L. REGATIERI, I.C. FERRAZ, G.C. QUEIROZ-NETO, A. CURI, R.A. Perspectivas Do Uso De Marcadores Moleculares No Melhoramento Genético De Equinos De Corrida Da Raça Quarto De Milha. **Veterinária e Zootecnia.** 22. 347. 2015.

WANDERLEY, E.K.; BEM, B.S.C.; MELO, S.K.M.; GONZALES, K.C.; MANSO, H.E.C.C.C.; FILHO, H.C.M. Hematological and Biochemical Changes in Mangalarga Marchador Horses After a Four-Beat Gait Challenge in Three Different Distances, **Journal of**

**Equine Veterinary Science**, 2015; N.35, P.259–263.  
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.01.009>

GARCIA, T.R. **Digestibilidade da dieta e desempenho físico de éguas mangalarga marchador suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae* durante treinamento em esteira ergométrica**. 93 f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

COSTA, T. A.; GREGÓRIO, N. P.; MANARIN, B. Y. F.; SILVA, T. M. Influência da maltodextrina sobre a glicemia e o rendimento de atletas juvenis de basquete. **Revista Polidisciplinar Eletrônica da Faculdade Guairacá**, v. 2, n. 2. p. 14-51, 2010.

RODGERS, J. T.; LERIN, C.; GERHART-HINES, Z.; PUIGSERVER, P. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. **FEBS Lett**, 2008; v. 582, n. 1, p. 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.034>

HINCHCLIFF, K. W; GEOR, R. J. Chapter 1.1 - The horse as an athlete: a physiological overview. In: HINCHCLIFF, KENNETH W; GEOR, RAYMOND J; KANEPS, ANDRIS J B T - **EQUINE EXERCISE PHYSIOLOGY** (Org.). Edinburgh: W.B. Saunders, p. 2–11. 2008.

FRANKLIN, S. H.; VAN ERCK-VESTERGREN, E.; BAYLY, W. M. Respiratory responses to exercise in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.44, n.6, 2012.

HOLCOMBE, S. J. Pulmonary function in racehorses. In: **Annual Resort Symposium of American Association of Equine Practitioners 8**, Rome-Italy, Proceedings...AAEP, 2006.

MCGOWAN, C. Clinical Pathology in the Racing Horse: The role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. **Veterinary Clinics – Equine Practice**, v. 24, p. 405-421, 2008.

LIMA, D. J. M. M. **Alterações eritrocitárias induzidas, pelo exercício físico**. **Dissertação, Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental**, UERJ, Rio de Janeiro, 2014.



ALONSO, J.M. WATANABE, M. J., HUSSNI, C. A., MANTOVANI, C. D. F., FERNANDES, V. S., MACHADO, L. P., YONEZAWAI, L.A. KOHAYAGAWAI, A. THOMASSIAN, A. O treinamento nos valores da V200, FC, pico e distância percorrida de cavalos da raça Árabe e Crioula. **Ciência Rural**, v.43, n. 4, 2013.

MIRIAN, M. **Padronização de teste incremental de esforço máximo a campo para cavalos que pratiquem hipismo clássico**. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária, São Paulo, 2008.

CAMERON-SMITH, D. Exercise and skeletal muscle gene expression. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v 29. n3. p 209-213, 2002.

POOLE, DAVID C.; ERICKSON, HOWARD H. Cardiovascular function and oxygen transport: responses to exercise and training. *Equine exercise physiology: the science of exercise in the athletic horse*. Hinchcliff, KW, p. 212-245, 2008.

MATSUDO, S. M. M. Envelhecimento, atividade física e saúde. **BIS. Boletim Do Instituto De Saúde**, 2009. n. 47, p. 76-79.

COELHO, C. F. BURINI, R. C. Atividade física para prevenção e tratamento das doenças crônicas não transmissíveis e da incapacidade funcional. **Revista de Nutrição** [online]. 2009, v. 22, n. 6, pág. 937-946. ISSN 1678-9865. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000600015>

MULLER, N.; MYINT, A.M.; SCHWARZ, M.J. Inflammatory biomarkers and depression. **Neurotox. Res**, v. 19, p. 308–318, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9210-2>

KIM, Y.K.; KIM, K.S.; NA, A.M.; MYINT, B.E.. The role of proinflammatorycytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrinesystem in major depression, *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.008>

HOWREN, M.B.; HOWREN, D.M.; LAMKIN, J. Associations of depression with C-reactiveprotein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Psychosom. Med.** v. 71, 2009. doi: 10.1097/PSY.0b013e3181907c1b

BAY-RICHTER, C.; BAY-RICHTER, S.; JANELIDZE, L.; HALLBERG, L. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge, **Behav. Brain Res.** 222 193–199, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.060>

YOU, Z.; LUO, C.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; HE, J.; ZHAO, Q.; ZUO, R.; WU, Y. Pro-and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression, **Behav. Brain Res.**, v. 225, p. 135–141, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.006>

GHILPA. **The Global Livestock Production and Health Atlas**. 2011.

ALMEIDA FQ, SILVA VP. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Rev Bras Zootec.** 39:119-29. 2010.

DAVIS, B. N.; HATA, A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. **Cell Commun Signal**, v. 7, n. 1, p. 18, 2009.

PACHOLEWSKA, A., MACH, N., MATA, X. ET AL. Novel equine tissue miRNAs and breed-related miRNA expressed in serum. **BMC Genomics** 17, 831. 2016.

CAPPELLI K, CAPOMACCIO S, VIGLINO A, SILVESTRELLI M, BECCATI F, MOSCATI L AND CHIARADIA E Circulating miRNAs as Putative Biomarkers of Exercise Adaptation in Endurance Horses. **Front. Physiol.** 9:429. 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.00429

LIVAK, KJ, & SCHMITTGEN, TD Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. **Methods**, 25(4), 402-408. 2001.

BINDA, M. B., TEIXEIRA, F. A., CARVALHO, R. S., MACEDO, L. P., CONTI, L. M. C., MANSO FILHO, H. C., & COELHO, C. S. Effects of 3-Barrel Racing Exercise on Electrocardiographic and on Blood Parameters of Quarter Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2016; 47, 71–76.

DE, GUILHERME *ET AL.* Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 431–437, 2009.

FEITOSA, F.L.F. Exame Físico Geral ou de Rotina. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. Ed. Guanabara Koogan, 2014; p. 77-102.

PEREIRA, M.A.D.A.J. **Avaliação das concentrações séricas de lactato, creatina quinase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, parâmetros clínicos e hematológicos de equinos Quarto de Milha submetidos à prova de laço em dupla**. 2015.

FERRAZ G.C., TEIXEIRA-NETO A.R., D'ANGELIS F.H.F., LACERDA NETO J.C., QUEIROZ NETO A. Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 2009; 46(6):431-437.

OLIVEIRA, L. A. DE; CAMPELO, J. E. G.; AZEVEDO, D. M. M. R.; COSTA, A. P. R.; TURCO, S. H. N.; MOURA, J. W. DA S. Estudo De Respostas Fisiológicas De Equinos Sem Raça Definida E Da Raça Quarto De Milha Às Condições Climáticas De Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 827-838, 2008.

NICOLOFF, ANA LUIZA BEZERRA DE MELO. **Termografia como parâmetro de análise fisiológica de cavalos durante a competição de vaquejada**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Zootecnia, Recife, 2019.

BALESTRERI, C., CUZZUOL, L. B. Adaptabilidade de diferentes raças de equinos atletas submetidas ao ambiente físico do município de Paragominas-PA. (Trabalho de Conclusão de Curso) Graduação em Agronomia - Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Paragominas, PA, 2017.,66 f.

TERRA, R.A. **Avaliação do treinamento de éguas Mangalarga Marchador submetidas a testes de esforço incremental realizados em esteira e a campo**. dissertação (mestrado), UFMG-Belo Horizonte, 2012.

KINGSTON, J.K. Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. IN: HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, R. J. **Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and Clinical Sciences of the Equine Athlete**, Philadelphia: W.B.Saunders. 2004; p.940-948.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN F. Erythrocyte indices in relation to hydration and electrolytes in horses performing exercises of different intensity. **Compendium on Clinical Pathology**. 2008; 17(4):213-220.

NETO, P. J. R. **Desempenho Atlético de Cavalos de Vaquejada: Parâmetros Fisiológicos, Bioquímicos E Hematológicos**. Trabalho de Conclusão de Curso. AREIA – PB, 2017.

MOHR S, LIEW CC. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. **Trends Mol Med**. 13(10):422-432. 2007.

YAO, DAVID C., DEAN R. TOLAN, MICHAEL F. MURRAY, DAVID J. HARRIS, BASIL T. DARRAS, ALON GEVA, ELLIS J. Neufeld; Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA<sup>(Arg303X/Cys338Tyr)</sup>. **Blood** 103 (6): 2401–2403. 2004. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3160>

ESPOSITO, G.; VITAGLIANO, L.; CEVENINI, A.; AMELIO, T.; ZAGARI, A.; SALVATORE, F.; Unraveling the structural and functional features of an aldolase A mutant involved in the hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis reported in a child. **Blood** 105 (2): 905–906. 2005. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3558>

REICHEL, ME, O'BRIEN, S., THOMAS, WG E HEADRICK, Jp Transativação do receptor do fator de crescimento epidérmico em respostas ao estresse miocárdico e cardioproteção. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2017; 83, 97-110.

MOOREN, FC, VIREECK, J., KRÜGER, K., E THUM, T. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2014; 306(4):H557-H563. doi:10.1152/ajpheart.00711.2013

DENHAM, J., PRESTES, P.R Muscle-enriched microRNAs isolated from whole blood are regulated by exercise and are potential biomarkers of cardiorespiratory fitness. **Frontiers in genetics**, 2016. 7:196. doi: 10.3389/fgene.2016.00196

LIU, D.R. GUAN, Q.L. GAO, M.T. JIANG, L. KANG, H.X. miR-1260b is a Potential Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. **Med Sci Monit.** 2016. <https://doi.org/10.12659/msm.898733>

XIA, Y, WEI, K, HU, L-Q, *ET AL.* Exosome-mediated transfer of miR-1260b promotes cell invasion through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in lung adenocarcinoma. **J Cell Physiol.** 2020; 235: 6843– 6853. <https://doi.org/10.1002/jcp.29578>

KIM, D.H., PARK, H., CHOI, Y.J. *et al.* Exosomal miR-1260b derived from non-small cell lung cancer promotes tumor metastasis through the inhibition of HIPK2. **Cell Death Dis** 12, 747; 2021. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04024-9>

WANG, F., YANG, Y., GUO, X., LI, F., YANG, R., LI, X., GUO, S. WANG, C. O perfil de microRNA do plasma destaca o miR-1260b e o miR-720 como novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos do carcinoma de células escamosas do esôfago. **Blood & Genomics**, 2021; 5 (2), 128-134.

WILHELM, E.N., MOUROT, L. & RAKOBOWCHUK, M. Exercise-Derived Microvesicles: A Review of the Literature. **Sports Med** 48, 2018; 2025–2039(18). <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0943-z>

MATTOSINHO, R. DE O., SAMPAIO, A. J. S. DE A., BALARIN, M. R. S., FIORATO, C. A., VASQUES, G. M. B., DA SILVA, A. L. Y. MARCUSSO, P. F. Alterações hematológicas e bioquímica sérica de equinos atletas. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 2017. 4(1), 082-091. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v4i1.35706>

WALLIN, L. STRANDBERG, E. PHILIPSSON, J. Genetic correlations between field test results of Swedish Warmblood Riding Horses as 4-year-olds and lifetime performance results

in dressage and show jumping. **Liv Prod Sci.** 82:61-71. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00307-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00307-X)

BOKOR, A. BLOUIN, C. LANGLOIS, B. STEFLER, J. Genetic parameters of racing merit of Thoroughbred horses in steeplechase races. **Ital J Anim Sci.** 4:43-5. 2005. <https://doi.org/10.4081/ijas.2005.3s.43>

## 11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

a) A revisão de literatura acerca do assunto abordado no capítulo I, “Expressão de miRNAs em genes-alvo funcionam como ferramenta para seleção de equinos em provas de resistência?”, foi de suma importância para o entendimento da utilização do cavalo Quarto de Milha e suas principais atividades relacionadas, bem como compreender como funciona a fisiologia animal relacionada o exercício, e como microRNAs podem regular genes-alvos associados a vias do desempenho atlético.

b) No capítulo II: “Expressão de genes regulados por miRNAs envolvidos nas vias metabólicas do desempenho atlético em equinos quarto de milha. Os exames clínicos, hematológicos e moleculares mostraram variações significativas ( $p < 0,05$ ) relacionadas ao exercício, e que os microRNAs -133b e -1260b funcionaram como biomarcadores para avaliar o desempenho atlético de equinos quarto de milha, futuros experimentos serão implementados para investigar biomarcadores entre cavalos suplementados e não suplementados.

## ANEXO 1 – Parâmetros Clínicos

1º coleta antes do exercício (10/06/2021)								
ID Campo	ID Laboratório	Sexo	Suplementado	FR 20 - 44 rpm	FC 32 - 72bpm	TR 36 - 39°C	Peso (Kg)	Informações adicionais
Rosa	MQ 01a	F	não	24	55	37,5	400	Mais suor
Apolo	MQ 02a	M	não	20	50	37,1	513	
Cake Lew	MQ 03a	F	não	20	50	37	420	
Daria Moon	MQ 04a	F	Hemo + Glicol	20	45	37,4	465	
Lajolas	MQ 05a	F	não	24	58	36,4	500	
Belissa	MQ 06a	F	Hemo + Glicol	36	70	36,2	440	
Bela	MQ 07a	F	Hemo + Glicol	44	68	37,1	445	Muito ofegante, menos suor
Midle Nigth	MQ 08a	F	não	44	44	37,6	400	
Aragon	MQ 09a	M	Hemo + Glicol + Muscle	32	44	37,9	425	Histórico de babesiose
Nina	MQ 10a	F	Hemo + Glicol + Muscle	44	59	37,9	415	
<b>Média</b>				30,8	54,3	37,21	442,3	
<b>Desvio Padrão</b>				10,507	9,464	0,574	39,407	

1º coleta depois do exercício (10/06/2021)								
ID Campo	ID Laboratório	Sexo	Suplementado	FR 72 - 160 rpm	FC 72 - 164bpm	TR 39 - 42°C	Peso (Kg)	Informações adicionais
Rosa	MQ 01b	F	não	96	88	40,8	-	Muito suada
Apolo	MQ 02b	M	não	90	96	39,5	-	muito suado
Cake Lew	MQ 03b	F	não	100	114	40,2	-	pouco suada
Daria Moon	MQ 04b	F	Hemo + Glicol	128	122	40,5	-	mais ou menos suado
Lajolas	MQ 05b	F	não	76	108	39,9	-	mais ou menos suado, demora para estancar
Belissa	MQ 06b	F	Hemo + Glicol	164	140	42	-	mais ou menos suado, muito ofegante



<b>Bela</b>	MQ 07b	F	Hemo + Glicol	140	154	40,8	-	Muito ofegante, menos suor
<b>Midle Nigth</b>	MQ 08b	F	não	96	90	41,4	-	mais ou menos suado
<b>Aragon</b>	MQ 09b	M	Hemo + Glicol + Muscle	160	148	41,4	-	Histórico de babesiose
<b>Nina</b>	MQ10b	F	Hemo + Glicol + Muscle	136	128	39,7	-	mais ou menos suado
<b>Média</b>				118,6	118,8	40,62	-	
<b>Desvio Padrão</b>				30,956	23,743	0,816	-	

2º coleta antes do exercício (24/06/2021)								
ID Campo	ID Laboratório	Sexo	Suplementado	FR 20 - 44 rpm	FC 32 - 72bpm	TR 36 - 39°C	Peso (Kg)	Informações adicionais
Rosa	MQ 11a	F	não	24	51	37,5	436	
Apolo	MQ 16a	M	não	24	43	37,2	513	
Cake Lew	MQ 15a	F	não	24	34	37,2	430	
Mister San	MQ 20a	M	Hemo + Glicol + Muscle	44	50	37,4	486	
Lajolas	MQ 14a	F	não	32	41	36,8	513	
Belissa	MQ 13a	F	Hemo + Glicol	44	44	37,6	455	
Bela	MQ 12a	F	Hemo + Glicol	40	81	37,6	465	
Midle Nigth	MQ 19a	F	não	28	46	37,6	430	
Aragon	MQ 18a	M	Hemo + Glicol + Muscle	28	55	38,3	430	
Nina	MQ 17a	F	Hemo + Glicol + Muscle	40	46	37,3	436	
Média				32,8	49,1	37,45	459,4	
Desvio Padrão				8,390	12,618	0,389	33,652	

2º coleta depois do exercício (24/06/2021)								
ID Campo	ID Laboratório	Sexo	Suplementado	FR 72 - 160 rpm	FC 72 - 164bpm	TR 39 - 42°C	Peso (Kg)	Informações adicionais
Rosa	MQ 11a	F	não	72	70	39,7	-	muito suada
Apolo	MQ 16a	M	não	112	108	40,9	-	muito suado
Cake Lew	MQ 15a	F	não	132	138	40,6	-	pouco suada
Mister San	MQ 20a	M	Hemo + Glicol + Muscle	152	120	40,8	-	mais ou menos suado mais ou menos suado, demora para estancar
Lajolas	MQ 14a	F	não	92	71	39,8	-	
Belissa	MQ 13a	F	Hemo + Glicol	80	120	41,9	-	mais ou menos suado, muito ofegante
Bela	MQ 12a	F	Hemo + Glicol	120	108	41,3	-	muito suada
Midle Nigth	MQ 19a	F	não	108	184	40,6	-	mais ou menos suado
Aragon	MQ 18a	M	Hemo + Glicol + Muscle	148	130	41,4	-	mais ou menos suado
Nina	MQ 17a	F	Hemo + Glicol + Muscle	100	130	40,6	-	mais ou menos suado
Média				111,6	117,9	40,76	-	
Desvio Padrão				26,962	32,939	0,679	-	

3º coleta antes do exercício (15/07/2021)								
ID Campo	ID Laboratório	Sexo	Suplementado	FR 20 - 44 rpm	FC 32 - 72bpm	TR 36 - 39°C	Peso (Kg)	Informações adicionais
Rosa	MQ 30a	F	não	16	44	37,4	400	
Apolo	MQ 21a	M	não	16	40	37	513	
Cake Lew	MQ 29a	F	não	16	32	37	400	
Mister San	MQ 28a	M	Hemo + Glicol	20	46	37,5	461	
Lajolas	MQ 23a	F	não	32	34	36,6	490	
Belissa	MQ 26a	F	Hemo + Glicol	28	52	36,9	440	
Bela	MQ 27a	F	Hemo + Glicol	30	60	36,9	440	
Midle Nigth	MQ 22a	F	não	16	42	37,1	413	

Aragon	MQ 24a	M	Hemo + Glicol + Muscle	24	38	36,9	436
Nina	MQ 25a	F	Hemo + Glicol + Muscle	16	46	37,1	430
Média				21,4	43,4	37,04	442,3
Desvio Padrão				6,535	8,329	0,259	36,911

3º coleta depois do exercício (15/07/2021)								
ID Campo	ID Laboratório	Sexo	Suplementado	FR 72 - 160 rpm	FC 72 - 164bpm	TR 39 - 42°C	Peso (Kg)	Informações adicionais
Rosa	MQ 30b	F	não	64	72	39,6	-	muito suada
Apolo	MQ 21b	M	não	88	68	39,3	-	muito suado
Cake Lew	MQ 29b	F	não	60	72	39,2	-	mais ou menos suado
Mister San	MQ 28b	M	Hemo + Glicol	140	88	40,9	-	muito suado
Lajolas	MQ 23b	F	não	80	58	39	-	mais ou menos suado (pouco treinado), demora para estancar
Belissa	MQ 26b	F	Hemo + Glicol	176	124	41,3	-	menos suado
Bela	MQ 27b	F	Hemo + Glicol	140	110	42,2	-	muito suada e ofegante
Midle Nigth	MQ 22b	F	não	84	62	40,1	-	mais ou menos suado (pouco treinado)
Aragon	MQ 24b	M	Hemo + Glicol + Muscle	148	88	41,7	-	mais ou menos suado
Nina	MQ 25b	F	Hemo + Glicol + Muscle	132	70	40,4	-	muito suada
Média				111,2	81,2	40,37	-	
Desvio Padrão				40,477	21,421	1,122	-	

## ANEXO 2 – Parâmetros Hematológicos

1º coleta antes do exercício

ID Campo	Rosa	Apolo	Cake Lew	Daria Moon	Lajolas	Belissa	Bela	Midle Nigth	Aragon	Nina		
ID Laboratório	MQ 01a	MQ 02a	MQ 03a	MQ 04a	MQ 05a	MQ 06a	MQ 07a	MQ 08a	MQ 09a	MQ 10a	Média	Desvio Padrão
Sexo	F	M	F	F	F	F	F	F	M	F		
Eritrócitos (M/ $\mu$ l)	7,49	7,49	7,22	7,30	8,05	7,35	9,23	7,87	5,88	9,19	7,71	0,979
Hemoglobina (g/dL)	12,80	12,10	11,50	11,00	12,50	13,80	14,40	12,80	8,90	14,50	12,43	1,693
Hematócrito (%)	34,70	32,60	31,10	30,30	34,10	38,20	40,40	34,30	23,00	42,00	34,07	5,459
Volume corpuscular médio (VCM) (fL)	46,30	44,50	43,10	41,50	42,40	52,00	43,80	43,60	39,30	45,70	44,22	3,397
Hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg)	17,10	16,50	15,90	15,10	15,50	18,80	35,60	37,30	15,10	34,50	22,14	9,512
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) (%)	28,40	27,40	30,10	32,40	29,50	29,00	32,30	30,00	31,00	28,30	29,84	1,675
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (g/gdl)	36,90	37,10	37,00	36,30	36,70	36,10	35,60	37,30	38,50	34,50	36,60	1,073
Neutrófilos (%)	64,20	61,70	54,20	68,90	58,90	59,10	65,20	53,60	53,40	54,90	59,41	5,472
Linfócitos (%)	30,20	30,50	29,00	26,00	31,70	27,50	27,40	38,20	39,70	38,70	31,89	5,104
Monócitos (%)	4,00	4,90	4,10	3,40	5,00	5,90	6,10	5,40	4,70	4,80	4,83	0,843
Eosinófilos (%)	1,30	2,60	10,50	1,30	4,00	7,20	0,80	2,60	4,70	1,40	3,64	3,112
Basófilos (%)	0,30	0,30	1,30	0,40	0,40	0,30	0,50	0,20	2,00	0,20	0,59	0,590
Plaquetas (k/ $\mu$ l)	117,00	129,00	89,00	40,00	149,00	139,00	133,00	146,00	0,20	121,00	106,32	49,418
Leucócitos ( $\mu$ l)	9,98	8,92	11,95	11,71	8,07	8,76	8,40	9,85	5,97	10,57	9,42	1,792
Linfócitos (k/ $\mu$ l)	3,01	2,72	3,57	3,05	2,56	2,41	2,30	3,76	2,37	4,09	2,98	0,632
Monócitos (k/ $\mu$ l)	0,40	0,44	0,49	0,40	0,40	0,52	0,51	0,53	0,28	0,51	0,45	0,079
Eosinófilos (k/ $\mu$ l)	0,13	0,23	1,26	0,15	0,32	0,63	0,07	0,26	0,12	0,15	0,33	0,363
Basófilos (k/ $\mu$ l)	0,03	0,03	0,16	0,05	0,03	0,03	0,04	0,02	0,01	0,02	0,04	0,043

## 1º coleta depois do exercício

ID Campo	Rosa	Apolo	Cake Lew	Daria Moon	Lajolas	Belissa	Bela	Midle Nigth	Aragon	Nina		
ID Laboratório	MQ 01b	MQ 02b	MQ 03b	MQ 04b	MQ 05b	MQ 06b	MQ 07b	MQ 08b	MQ 09b	MQ10b	Média	Desvio Padrão
Sexo	F	M	F	F	F	F	F	F	M	F		
Eritrócitos (M/ $\mu$ l)	10,24	10,15	8,88	9,37	10,11	7,42	10,11	9,19	8,18	11,22	9,49	1,117
Hemoglobina (g/dL)	17,20	16,70	13,90	14,30	15,80	14,00	15,70	14,80	12,20	17,70	15,23	1,706
Hematócrito (%)	49,40	46,90	39,10	40,50	44,10	38,90	44,90	41,00	33,60	52,40	43,08	5,577
Volume corpuscular médio (VCM) (fI)	48,20	46,20	44,00	43,20	43,60	52,40	44,40	44,60	41,10	46,70	45,44	3,150
Hemoglobina corpuscular média (HCM) (PG)	16,80	16,50	15,70	15,30	15,60	18,90	15,50	16,10	14,90	15,80	16,11	1,127
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) (%)	30,20	29,20	31,10	34,20	31,20	28,90	33,20	31,00	32,40	30,00	31,14	1,706
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (g/gdl)	34,80	35,60	35,50	35,30	35,80	36,00	35,00	36,10	36,30	33,80	35,42	0,742
Neutrófilos (%)	58,30	61,80	51,80	67,70	63,10	50,60	58,20	46,90	46,90	53,40	55,87	7,072
Linfócitos (%)	36,70	30,90	35,60	38,20	30,20	39,90	35,40	46,30	46,10	40,90	38,02	5,498
Monócitos (%)	3,70	5,00	4,10	2,80	3,10	4,40	5,40	4,60	4,90	4,10	4,21	0,831
Eosinófilos (%)	0,80	1,90	8,30	0,90	3,10	4,50	0,80	1,90	1,80	1,20	2,52	2,339
Basófilos (%)	0,50	0,40	0,20	0,40	0,50	0,60	0,20	0,30	0,30	0,40	0,38	0,132
Plaquetas (k/ $\mu$ l)	102,00	139,00	108,00	58,00	175,00	151,00	138,00	161,00	110,00	130,00	127,2	33,904
Leucócitos ( $\mu$ l)	10,59	10,05	12,95	13,81	8,81	8,95	8,92	9,78	7,78	11,25	10,29	1,914
Linfócitos (k/ $\mu$ l)	3,89	3,11	4,61	3,90	2,66	3,57	3,16	4,53	3,59	4,60	3,76	0,676
Monócitos (k/ $\mu$ l)	0,39	0,50	0,53	0,39	0,27	0,39	0,48	0,45	0,38	0,46	0,42	0,075
Eosinófilos (k/ $\mu$ l)	0,09	0,19	1,08	0,12	0,27	0,40	0,07	0,19	0,14	0,13	0,27	0,301
Basófilos (k/ $\mu$ l)	0,05	0,04	0,02	0,06	0,04	0,05	0,02	0,03	0,02	0,05	0,04	0,015

## 2º coleta antes do exercício

ID Campo	Rosa	Apolo	Cake Lew	Mister San	Lajolas	Belissa	Bela	Midle Nigth	Aragon	Nina		
ID Laboratório	MQ 11a	MQ 16a	MQ 15a	MQ 20a	MQ 14a	MQ 13a	MQ 12a	MQ 19a	MQ 18a	MQ 17a	Média	Desvio Padrão
Sexo	F	F	F	F	F	M	F	M	F	M		
Eritrócitos (M/ $\mu$ l)	8,22	12,99	8,97	7,48	8,03	7,11	8,58	6,38	8,82	7,57	8,42	1,797
Hemoglobina (g/dL)	13,90	20,50	17,00	11,70	12,60	11,70	13,70	9,70	14,30	13,00	13,81	3,039
Hematócrito (%)	38,30	58,80	48,10	30,80	34,60	31,30	38,40	25,90	38,70	34,00	37,89	9,463
Volume corpuscular médio (VCM) (fI)	46,60	44,00	43,10	44,9	41,20	53,60	45,30	43,10	40,60	44,80	44,72	3,619
Hemoglobina corpuscular média (HCM) (PG)	16,90	16,50	15,70	17,2	15,60	19,00	15,80	16,30	15,20	16,00	16,42	1,093
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) (%)	28,20	27,80	30,90	28,5	38,90	30,50	36,10	29,40	30,90	27,80	30,90	3,737
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (g/gdl)	36,30	37,40	36,40	38,2	38,00	35,30	34,90	37,80	37,50	35,70	36,75	1,188
Neutrófilos (%)	64,80	58,70	63,70	69,8	58,50	69,70	69,60	53,40	56,80	53,90	61,89	6,483
Linfócitos (%)	29,20	31,80	25,50	22,6	31,80	19,60	22,80	39,00	34,60	39,40	29,63	6,922
Monócitos (%)	3,90	5,60	4,50	4,8	5,10	5,60	5,40	5,80	5,30	5,10	5,11	0,578
Eosinófilos (%)	1,60	3,40	5,40	2,2	4,10	4,40	1,80	1,60	2,70	1,20	2,84	1,421
Basófilos (%)	0,50	0,50	0,90	0,6	0,50	0,70	0,40	0,20	0,60	0,40	0,53	0,189
Plaquetas (k/ $\mu$ l)	81,00	118,00	127,00	109,00	100,00	152,00	124,00	120,00	131,00	97,00	115,90	20,047
Leucócitos ( $\mu$ l)	8,30	8,47	8,45	8,11	11,43	7,89	9,70	6,77	9,91	8,15	8,72	1,300
Linfócitos (k/ $\mu$ l)	2,42	1,93	1,66	2,58	2,92	2,51	3,82	2,34	4,04	1,84	2,61	0,795
Monócitos (k/ $\mu$ l)	0,32	0,46	0,47	0,41	0,52	0,44	0,49	0,36	0,56	0,39	0,44	0,074
Eosinófilos (k/ $\mu$ l)	0,13	0,15	0,37	0,33	0,62	0,27	0,12	0,18	0,13	0,18	0,25	0,158
Basófilos (k/ $\mu$ l)	0,04	0,03	0,06	0,04	0,10	0,04	0,04	0,04	0,03	0,05	0,05	0,021

## 2º coleta depois do exercício

ID Campo	Rosa	Apolo	Cake Lew	Mister San	Lajolas	Belissa	Bela	Midle Nigth	Aragon	Nina		
ID Laboratório	MQ 11b	MQ 16b	MQ 15b	MQ 20b	MQ 14b	MQ 13b	MQ 12b	MQ 19b	MQ 18b	MQ 17b	Média	Desvio Padrão
Sexo	F	F	F	F	F	M	F	M	F	M		
Eritrócitos (M/ $\mu$ l)	8,42	10,15	6,88	8,73	13,92	9,70	10,49	8,53	8,18	8,50	9,35	1,917
Hemoglobina (g/dL)	14,20	16,70	13,30	13,60	21,80	15,90	16,70	13,00	12,20	14,50	15,19	2,790
Hematócrito (%)	39,50	46,90	36,40	37,00	64,20	44,00	48,40	36,10	33,60	38,80	42,49	9,053
Volume corpuscular médio (VCM) (fI)	46,90	45,40	46,10	45,60	42,40	52,90	43,90	43,90	42,30	46,10	45,55	3,026
Hemoglobina corpuscular média (HCM) (PG)	16,90	16,40	15,70	17,10	15,60	19,30	15,70	37,00	15,20	15,90	18,48	6,613
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) (%)	28,30	29,10	36,00	29,40	30,20	29,20	32,90	30,80	32,40	29,50	30,78	2,350
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (g/gdl)	35,90	36,10	34,00	37,40	36,80	36,50	35,70	37,00	36,00	34,50	35,99	1,065
Neutrófilos (%)	63,70	56,00	61,90	67,90	58,80	65,00	62,10	51,50	52,60	52,70	59,22	5,781
Linfócitos (%)	31,20	35,50	29,00	25,50	32,80	27,30	31,30	41,50	40,30	42,40	33,68	6,023
Monócitos (%)	3,60	4,80	4,20	4,40	4,70	4,40	5,00	41,20	4,40	3,50	8,02	11,668
Eosinófilos (%)	1,10	3,10	4,30	2,00	3,30	2,60	1,40	5,70	2,30	0,80	2,66	1,512
Basófilos (%)	0,40	0,60	0,60	0,20	0,40	0,70	0,20	1,30	0,40	0,60	0,54	0,317
Plaquetas (k/ $\mu$ l)	85,00	139,00	199,00	129,00	154,00	169,00	148,00	131,00	110,00	120,00	125,33	54,153
Leucócitos ( $\mu$ l)	9,83	10,05	12,00	9,12	9,53	10,09	10,08	9,45	7,78	10,12	9,81	1,049
Linfócitos (k/ $\mu$ l)	3,07	3,11	3,27	2,99	2,76	3,58	4,27	3,81	3,59	2,58	3,30	0,512
Monócitos (k/ $\mu$ l)	0,35	0,50	0,53	0,43	0,40	0,48	0,35	0,42	0,38	0,45	0,43	0,062
Eosinófilos (k/ $\mu$ l)	0,11	0,19	0,31	0,30	0,41	0,31	0,08	0,22	0,14	0,20	0,23	0,104
Basófilos (k/ $\mu$ l)	0,04	0,04	0,08	0,04	0,06	0,06	0,06	0,04	0,02	0,02	0,05	0,019

## 3º coleta antes do exercício

ID Campo	Rosa	Apolo	Cake Lew	Mister San	Lajolas	Belissa	Bela	Midle Nigth	Aragon	Nina		
ID Laboratório	MQ 30a	MQ 21a	MQ 29a	MQ 28a	MQ 23a	MQ 26a	MQ 27a	MQ 22a	MQ 24a	MQ 25a	Média	Desvio Padrão
Sexo	F	F	F	M	F	M	F	M	F	M		
Eritrócitos (M/ $\mu$ l)	8,16	6,88	7,38	7,55	8,06	6,82	8,75	7,45	6,41	8,78	7,62	0,806
Hemoglobina (g/dL)	13,80	11,50	11,50	12,80	12,70	13,20	14,00	12,20	9,90	14,00	12,56	1,318
Hematócrito (%)	37,90	29,80	31,10	33,70	33,90	36,50	37,90	31,60	25,90	39,70	33,80	4,298
Volume corpuscular médio (VCM) (fI)	46,40	43,30	45,20	44,60	42,10	53,50	43,30	42,40	40,40	42,10	44,33	3,658
Hemoglobina corpuscular média (HCM) (PG)	16,90	16,70	15,90	17,00	15,80	19,40	16,00	16,40	15,40	15,60	16,51	1,154
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) (%)	27,30	27,70	28,00	28,80	29,90	28,00	33,10	29,90	31,00	29,70	29,34	1,776
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (g/gdl)	36,40	38,60	35,30	38,00	37,50	36,20	36,90	38,60	38,20	37,00	37,27	1,105
Neutrófilos (%)	59,20	62,80	55,20	64,90	57,30	66,20	65,90	59,00	64,10	62,60	61,72	3,816
Linfócitos (%)	34,00	28,00	36,00	23,90	32,30	22,60	24,90	34,30	29,10	26,10	29,12	4,785
Monócitos (%)	4,70	4,50	5,70	5,10	3,70	6,30	7,30	4,00	4,60	4,40	5,03	1,107
Eosinófilos (%)	1,80	3,90	2,40	5,50	6,30	4,10	1,20	2,00	1,30	6,40	3,49	2,034
Basófilos (%)	0,30	0,80	0,70	0,60	0,40	0,80	0,70	0,70	0,90	0,50	0,64	0,190
Plaquetas (k/ $\mu$ l)	105,00	132,00	102,00	100,00	128,00	182,00	132,00	95,00	131,00	108,00	121,50	25,847
Leucócitos ( $\mu$ l)	10,56	8,61	10,14	7,07	7,25	9,90	8,10	8,95	6,71	8,61	8,59	1,334
Linfócitos (k/ $\mu$ l)	3,59	2,41	2,65	1,69	2,34	2,24	2,02	3,07	1,95	3,10	2,51	0,595
Monócitos (k/ $\mu$ l)	0,50	0,39	0,45	0,36	0,27	0,62	0,59	0,36	0,31	0,49	0,43	0,116
Eosinófilos (k/ $\mu$ l)	0,19	0,34	0,65	0,39	0,46	0,41	0,10	0,18	0,09	0,21	0,30	0,179
Basófilos (k/ $\mu$ l)	0,03	0,07	0,05	0,04	0,03	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,016



## 3º coleta depois do exercício

ID Campo	Rosa	Apolo	Cake Lew	Mister San	Lajolas	Belissa	Bela	Midle Nigth	Aragon	Nina		
ID Laboratório	MQ 30b	MQ 21b	MQ 29b	MQ 28b	MQ 23b	MQ 26b	MQ 27b	MQ 22b	MQ 24b	MQ 25b	Média	Desvio Padrão
Sexo	F	F	F	M	F	M	F	M	F	M		
Eritrócitos (M/ $\mu$ l)	7,61	8,83	9,86	9,23	8,31	9,69	9,69	7,89	9,01	9,44	8,96	0,788
Hemoglobina (g/dL)	12,90	14,30	15,40	15,70	12,90	15,50	15,50	12,90	13,90	15,00	14,4	1,178
Hematócrito (%)	35,20	40,10	43,40	42,20	35,00	43,60	43,60	33,80	38,20	43,00	39,81	3,954
Volume corpuscular médio (VCM) (fI)	46,30	45,40	44,00	45,70	42,10	53,80	45,00	42,80	42,40	45,60	45,31	3,336
Hemoglobina corpuscular média (HCM) (PG)	17,00	16,20	15,60	17,00	15,50	19,60	16,00	16,30	15,40	15,90	16,45	1,240
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) (%)	27,10	29,40	32,90	29,90	29,40	28,50	34,50	29,80	33,30	28,40	30,32	2,416
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (g/gdl)	36,60	35,70	35,50	37,20	36,90	36,40	35,60	38,20	36,40	34,90	36,34	0,962
Neutrófilos (%)	58,50	60,10	58,00	63,60	55,40	62,80	57,50	51,60	55,30	53,20	57,6	3,884
Linfócitos (%)	36,00	33,00	32,00	28,00	36,40	28,20	36,20	40,70	39,40	39,70	34,96	4,553
Monócitos (%)	3,60	3,90	4,60	4,00	3,60	5,50	4,00	5,50	3,50	4,40	4,26	0,740
Eosinófilos (%)	1,50	2,40	4,90	3,70	4,50	3,10	1,20	2,00	1,30	2,20	2,68	1,321
Basófilos (%)	0,40	0,60	0,50	0,70	0,10	0,40	1,10	0,20	0,50	0,50	0,5	0,275
Plaquetas (k/ $\mu$ l)	92,00	176,00	132,00	130,00	112,00	179,00	179,00	109,00	158,00	140,00	140,7	31,394
Leucócitos ( $\mu$ l)	9,44	8,93	11,62	7,31	8,24	6,44	6,44	9,70	9,95	9,51	8,76	1,656
Linfócitos (k/ $\mu$ l)	3,40	2,95	3,72	2,05	3,00	2,33	2,33	3,95	3,92	3,78	3,14	0,718
Monócitos (k/ $\mu$ l)	0,34	0,35	0,53	0,29	0,30	0,26	0,26	0,53	0,35	0,42	0,36	0,100
Eosinófilos (k/ $\mu$ l)	0,14	0,21	0,57	0,27	0,37	0,08	0,08	0,19	0,13	0,21	0,23	0,150
Basófilos (k/ $\mu$ l)	0,04	0,05	0,06	0,05	0,01	0,07	0,07	0,02	0,05	0,05	0,05	0,019