

JOÃO FRANCISCO RAMOS MARTINS

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DO FERRO EM
CAVALOS LUSITANOS SUBMETIDOS A UM TESTE DE
SIMULAÇÃO DE DRESSAGE**

Orientador: Professora Doutora Joana Simões
Co-Orientador: Professora Doutora Clárisse Simões Coelho

Universidade Lusófona
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa
2023

JOÃO FRANCISCO RAMOS MARTINS

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DO FERRO EM
CAVALOS LUSITANOS SUBMETIDOS A UM TESTE DE
SIMULAÇÃO DE DRESSAGE**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona, no dia 6 de Novembro de 2023, com o Despacho de nomeação do Júri N.º 434/2023, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Gesiane Ferraz

Orientadora: Professora Doutora Joana Simões

Universidade Lusófona
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa
2023

Resumo

O ferro tem ganho grande destaque na Medicina hospitalar equina nos últimos anos. O seu papel como um excelente marcador inflamatório, traduzido numa alta sensibilidade e especificidade para a mesma, aliada a uma precocidade notória na deteção do estímulo inflamatório, assim como no acompanhamento de todo o processo, concede a este elemento um elevado valor preditivo de diagnóstico e prognóstico clínico. Desta forma, e tendo em conta o papel que a inflamação tem na atividade desportiva, seria insensato não procurar estabelecer um perfil do seu comportamento fisiológico perante a atividade desportiva, por forma a retirar possíveis valências e aplicações que o mesmo poderá ter no ramo da Medicina desportiva.

O presente estudo procurou analisar o seu comportamento, e dos seus demais cofatores, em equinos atletas submetidos a um Teste de simulação de Dressage (TSD) especialmente desenhado para corresponder às exigências físicas impostas em cenário de competição.

Oito jovens equinos, da raça Puro Sangue Lusitano com quatro anos, atletas de *dressage* em início de carreira foram submetidos a um TSD. Todos os animais provieram do mesmo centro de treino e encontravam-se exatamente sobe as mesmas condições de criação, adestramento, manejo e regime de treino pré-competição. Todo o protocolo de TSD durou cerca de 35 minutos, sendo que apenas 5 minutos do mesmo constituiu o pico de atividade física. Os valores do ferro sérico, e demais cofatores, foram processados em três momentos distintos, o de pré TSD (T0), imediatamente após (T1), e pós-TSD contabilizando um período de repouso de cerca de 240 minutos (T2).

Foi possível observar uma diminuição mensurável dos valores do ferro sérico, diretamente condicionada pela atividade e esforço físico imposto, algo que teve o seu início no pico da atividade física (T1) e se prolongou e evoluiu durante todo o período de repouso (T2). Podemos, desta forma, concluir que existe uma relação e impacto nos valores séricos do ferro condicionado pela atividade física, corroborado num cenário prático e real.

Palavras-chave: Ferro sérico; Medicina desportiva; Teste de Simulação de Dressage (TSD); Puro Sangue Lusitanos (PSL);

Abstract

Iron has gained a lot of traction in the past few years in the Hospital setting of Equine Medicine. It's role as an excellent inflammatory marker, mainly due to its high sensibility and specificity for inflammation, allied with its capacity for an early detection setting and signaling throughout the entire inflammatory process, makes it a unique marker able to produce a precise diagnosis and prognosis. And, for that matter, given the key role inflammation plays in sports, it would be wise to consider Iron's potential role as a valuable allied in sports medicine.

The present study aimed to analyze serum iron, and its cofactors, physiological behavior and changes when faced with physical exertion. For this purpose, eight, four-year-old, Lusitano stallions were selected to be part of the study. All horses were active dressage athletes, in their early competitive carrier's, coming from the same training facility and subjected to the same method of upbringing, nutrition, care, handling and training regimen. The horses were subjected to a Dressage Contest Simulation Routine (DCSR), specially designed to replicate the high stakes contest setting, in order to achieve peak physical exertion and work. This routine had the duration of 35 minutes with a five minute peak exertion time frame that constituted the dressage routine itself. Serum Iron, and its cofactors, were then analyzed in separate key moments. One prior to the DCSR (T0), another right after (T1), and the final one already in the resting period, 240 min post-DCSR (T2).

The results showed a drop in serum iron values as a direct response to exercise, starting right on the peak of the DCSR (T1) and gradually progressing all throughout the resting period (T2). This finding confirms the direct correlation between serum iron changes and physical activity in a real-life sports setting scenario.

Key words: Serum Iron; Sports Medicine; Dressage Contest Simulation Routine (DCSR); Lusitano;

GLOSSÁRIO

Fe – Ferro

PSL – Puro Sangue Lusitano

TSD – Teste de Simulação de *Dressage*

min – minutos

h – horas

s – segundos

% - percentagem

Fe²⁺ - Ferro ferroso

Fe³⁺ - Ferro férrico

Fe⁴⁺ - Ferro ferril

FEI – Federação Equestre Internacional

WBFSH – World Breeding Federation of Sport Horses

° - Graus

cm – centímetros

m – metros

Km – Quilómetros

ATP – Adenosina Trifosfato

SAA – Amiloide A sérica

CRP – Proteína C reativa

Kg – Quilogramas

g – gramas

µg – microgramas

FC – Frequência Cardíaca

FR – Frequência Respiratória

TC – Temperatura Corporal

bpm – batimentos por minuto

rpm – respirações por minuto

°C – graus Celsius

V – velocidade

m/s – metros por segundo

dl – decilitro

TIBC – Capacidade de fixação do ferro (do Inglês Total Iron binding capacity)

UIBC – Capacidade de ligação do ferro não saturado (do Inglês Unsaturated Iron binding capacity)

IST – Índice de saturação da transferrina

Hb – Hemoglobina

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	14
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1. DRESSAGE-PERFIL DO ATLETA.....	16
2. O FERRO E O METABOLISMO ENERGÉTICO AERÓBICO.....	20
3 O EXERCÍCIO E A INFLAMAÇÃO.....	21
3.1. O EXERCÍCIO, A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E O FERRO.....	28
4 O PAPEL DO FERRO NA INFLAMAÇÃO EM AMBIENTE HOSPITALAR.....	30
5. O FERRO E OS SEUS COFADORES.....	33
6. AS LIMITAÇÕES DO FERRO.....	34
III. PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.....	36
1.OBJETIVOS.....	36
2.INDIVÍDUOS.....	37
3.TESTE DE SIMULAÇÃO DE DRESSAGE (TSD).....	38
4.MONITORIZAÇÃO CARDÍACA.....	40
5.RECOLHA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	40
6.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
IV. RESULTADOS	42
V. DISCUSSÃO	44
VI. CONCLUSÃO	48
VII. BIBLIOGRAFIA.....	50
VIII. APÊNDICES.....	I

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. PARÂMETROS DE INCLUSÃO NO PRESENTE ESTUDO	38
TABELA 2. SEQUÊNCIA DE EXERCÍCIOS DO TESTE DE SIMULAÇÃO DE <i>DRESSAGE</i>	39
TABELA 3. PARÂMETROS FÍSICOS (MÉDIAS±DESVIOS-PADRÃO) DOS EQUINOS SUBMETIDOS AO TSD.....	42
TABELA 4. DADOS REGISTRADOS PELO SISTEMA POLARSYNC NOS EQUINOS SUBMETIDOS AO TSD.....	43
TABELA 5. PERFIL DO METABOLISMO DO FERRO (MÉDIAS±DESVIOS-PADRÃO) DOS EQUINOS SUBMETIDOS AO TSD.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA.1 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE HORAS DESPENDIDAS POR UNIDADE CLÍNICA (PONTOS 1 A 7).....	9
FIGURA 2. ATIVIDADES COM MAIOR INCIDÊNCIA DENTRO DAS UNIDADES CLÍNICAS MAIS ABORDADAS PELO AUTOR; CIRURGIA.....	11
FIGURA 3. ATIVIDADES COM MAIOR INCIDÊNCIA DENTRO DAS UNIDADES CLÍNICAS MAIS ABORDADAS PELO AUTOR; UNIDADES DE AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO.....	12
FIGURA 4. MAPA DO RECINTO DESPORTIVO E DIRETRIZES QUE REPRESENTAM ESQUEMATICAMENTE O PERCURSO REALIZADO PELOS CAVALOS DURANTE O TESTE DE SIMULAÇÃO DE <i>DRESSAGE</i>	
FIGURA 5. EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS REGISTADOS NO TEMPO.....	I
FIGURA 6. EVOLUÇÃO DAS VARIÁVEIS DO METABOLISMO DO FERRO NO TEMPO.....	I-II
FIGURA 6.1. EVOLUÇÃO DA VARIÁVEL FE (FERRO SÉRICO) AO LONGO DOS PERÍODOS TEMPORAIS (T0-REPOUSO; T1-IMEDIATAMENTE APÓS O EXERCÍCIO; T2-COM 240MIN DE RECUPERAÇÃO).....	I
FIGURA 6.2. EVOLUÇÃO DA VARIÁVEL TIBC (CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DO FERRO) AO LONGO DOS PERÍODOS TEMPORAIS (T0-REPOUSO; T1-IMEDIATAMENTE APÓS O EXERCÍCIO; T2-COM 240MIN DE RECUPERAÇÃO).....	I
FIGURA 6.3. EVOLUÇÃO DA VARIÁVEL IST (ÍNDICE DE SATURAÇÃO DA ERRITINA) AO LONGO DOS PERÍODOS TEMPORAIS (T0-REPOUSO; T1-IMEDIATAMENTE APÓS O EXERCÍCIO; T2-COM 240MIN DE RECUPERAÇÃO).....	II
FIGURA 6.4. EVOLUÇÃO DA VARIÁVEL HB (CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NO SANGUE) AO LONGO DOS PERÍODOS TEMPORAIS (T0-REPOUSO; T1-IMEDIATAMENTE APÓS O EXERCÍCIO; T2-COM 240MIN DE RECUPERAÇÃO).....	II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Detalhes de Estágio Curricular:

Local de Estágio- Hospital Veterinário da Mata de St. Íria

Orientador Interno- Dr. Luís Cruz

Período de Estágio- 17/10/2022 a 12/02/2023

Total de horas perfeitas- 612 horas

Áreas de Intervenção- Medicina Hospitalar e de Emergência em Pequenos Animais

Especialidade Hospitalar da Unidade Empregadora- Cirurgia de tecidos moles e ortopédica

Detalhes de Estágio Extracurricular:

Local de Estágio- Rosssdales Veterinary Surgeons Hospital and Diagnostic Centre, Newmarket, Suffolk, Reino Unido

Orientador Interno- Dr Andrew Bathe

Período de Estágio- 26/02/2023 a 19/03/2023

Total de horas perfeitas- 252 horas

Áreas de Intervenção- Medicina Hospitalar, Diagnóstico, Cirurgia, Emergência e Cuidados Críticos de equinos

Resumo de Estágio Curricular:

O autor fez um total de 612 horas de atividade hospitalar na unidade referenciada, que consistiram na abordagem médica, em meio hospitalar, de rotina, cirúrgica e, emergência e cuidados críticos em pequenos animais de companhia, mais especificamente cães e gatos.

No período decorrido teve a oportunidade de assistir e contribuir ativamente, sempre sob a vigilância e auxílio dos médicos responsáveis, nas seguintes atividades clínicas:

1. Consultas

(Primeira abordagem, Acompanhamento, Emergência, Rotina)

2. Internamento

(Acompanhamento e Cuidados diários, Admissões e Altas, Rondas clínicas e realização de Planos Terapêuticos)

3. Unidades de Auxílio ao Diagnóstico
(Ecografia, Radiografia e Exames laboratoriais)
4. Cirurgia
(Ortopedia, Tecidos moles, Endoscopia e Laparotomia)
5. Unidade de Anestesia e Analgesia de acompanhamento e suporte à cirurgia
6. Reabilitação motora e Medicina integrativa
(Terapias à base de Ultrassom, Laser e Fisioterapia)
7. Reuniões e Rondas Clínicas

Distribuição de Horas por Unidades Clínica

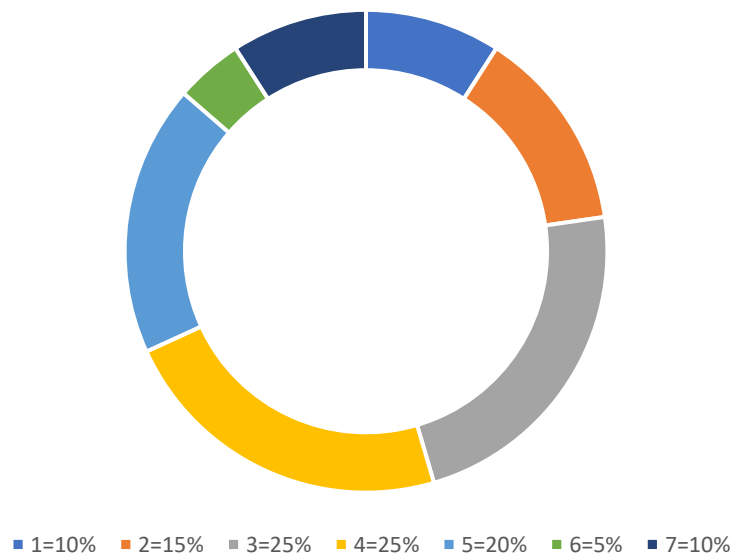


Figura.1 Distribuição percentual de horas despendidas por Unidade Clínica (pontos 1 a 7)

Em suma, após o período total de estágio, o aluno direcionou e contabilizou a grande maioria das suas horas de atividade clínica para as áreas de Cirurgia e Unidades de Diagnóstico, pontos 3 e 4, respetivamente.

Com menor incidência, mas não muito afastadas das duas primeiras, ficaram as áreas de Anestesia e Analgesia de acompanhamento e suporte à cirurgia, e o Internamento, pontos 5 e 2, respetivamente.

Por último e com o menor período de horas despendidas para as mesmas ficaram o acompanhamento às consultas, Protocolos e Terapias de reabilitação e Medicina integrativa, e as reuniões e rondas clínicas, pontos 1,6 e 7, respetivamente.

Atividades com maior incidência dentro das unidades clínicas mais abordadas pelo aluno:

Cirurgia – 25%

- a. Cirurgia Ortopédica- Osteotomia circular da tíbia proximal, Luxações da patela, Fraturas ósseas de origem traumática (mandíbula, ossos distais dos membros pélvicos) e de correção à displasia da anca;
- b. Cirurgias de tecidos moles- Orquiectomias e Ovariohisterectomias, Torções gástricas, Esplenectomias, Biópsia e remoção de massas, colocação de sondas nasogástricas e colocação de tubo endotraqueal por traqueostomia, Enterotomias para resolução de torção/impactação grave;
- c. Endoscopia- Retronasofaringeoscopia para resolução de estenoses e remoção de massas, colonoscopia e gastroscopia com remoção de massas e corpos estranhos;
- d. Estomatologia- Remoção de dentes e limpeza;

INCIDÊNCIA DE ATIVIDADE

■ a=20% ■ b=60% ■ c=18% ■ d=2%

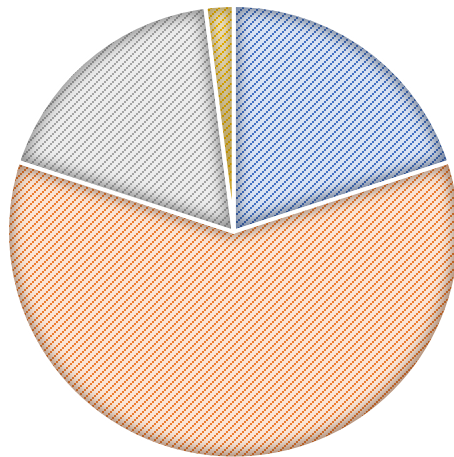


Figura 2. Atividades com maior incidência dentro das unidades clínicas mais abordadas pelo autor; Cirurgia

Unidades de auxílio ao Diagnóstico – 25%

- a. Ecografia- Ecocardiografia, Ecografia abdominal e AFAST, PAAF's com orientação ecográfica;
- b. Radiografia
- c. Análises Sanguíneas- Hemograma, Bioquímicas, Testes rápidos, Citologias de amostras recolhidas, Provas de coagulação, Perfil Sanguíneo;
- d. Análise de Urina – Citologia e Urocultura;
- e. Tricoscopia e análise de amostras dermatológicas ao microscópio óptico;
- f. Endoscopia e Laparotomias exploratórias para recolha de amostras teciduais e/ou de conteúdo exsudativo (Fórum oronasal e gastroduodenal);

INCIDÊNCIA DE ATIVIDADE

■ a=25% ■ b=15% ■ c=50% ■ d=5% ■ e=2% ■ f=3%

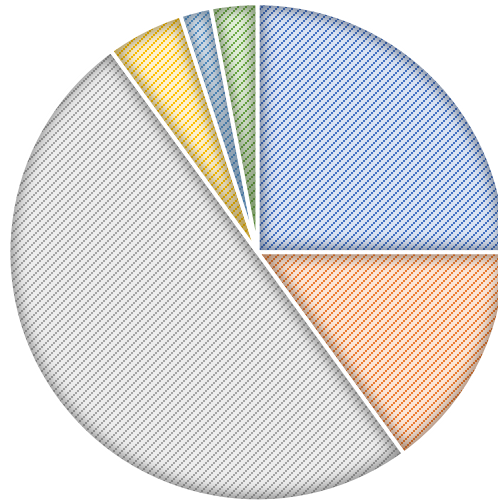


Figura 3. Atividades com maior incidência dentro das unidades clínicas mais abordadas pelo aluno; Unidades de auxílio ao Diagnóstico

Resumo de Estágio Extracurricular:

O autor fez um total de 252 horas no Hospital e Centro de Diagnóstico do Rosssdales Veterinary Surgeons, em Newmarket, Reino Unido, sob a forma de um estágio extracurricular, não mandatório.

O autor teve acesso a toda a casuística do Centro de Diagnóstico, sob a orientação direta dos médicos responsáveis, Andrew Bathe, Sara Boys-Smith e Mariana Martins, onde pôde realizar e observar todos os procedimentos realizados dentro das competências do Centro de Diagnóstico do Rosssdales, incluindo exames de claudicação, raio-x, ultrasonografia, cintigrafia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, entre outros.

O autor teve também acesso ao Hospital e casuística correspondente, sob a orientação direta dos médicos responsáveis Richard Payne, Timothy Barnett e Andrew Bathe, nas unidades de cirurgia. Assim como a toda a casuística de medicina interna e urgências, incluindo a unidade de cuidados intensivos e neonatais, sob a orientação direta da médica responsável Celia Marr.

Todas as atividades realizadas e esquematização do estágio foram organizadas e geridas pela direção do Rosssdales Veterinary Surgeons, sob o seu programa de EMS (do Inglês “Extern Medical Student Program”) especialmente desenhado e dirigido a estudantes e recém graduados, através de concurso prévio internacional.

I. Introdução

O ferro é um elemento químico presente no sistema dos diferentes mamíferos. Este pode ser encontrado sob três formas biológicas no mesmo, tratando-se de três estados redox diferentes - estado ferroso (Fe^{2+}), férrico (Fe^{3+}) e ferril (Fe^{4+}). Devido ao seu comportamento químico o ferro possui um papel essencial nas reações de transferência de eletrões, em reações de oxidação-redução e ponte de ligações químicas reversíveis com outros elementos em circulação (maioritariamente oxigénio, nitrogénio e sulfato) (Beard 2001).

O ferro possui uma relação íntima com o exercício e tem um papel vital na produção de energia de fonte aeróbica, assim como nos mecanismos de adaptação e resposta, aquando do desencadear de um possível processo inflamatório decorrente (Hinton 2014). O papel vital que o ferro possui na resposta adaptativa à inflamação não é exclusivo da medicina desportiva e a sua relevância como um importante marcador de diagnóstico e prognóstico na componente clínica hospitalar tem sido um tema de interesse na comunidade médica e científica. A sua eficácia traduzida pelo um elevado grau de sensibilidade e especificidade em relação aos mecanismos desencadeadores da inflamação tem sido corroborada nos últimos anos, e o resultado direto foi a sua utilização como um biomarcador inflamatório de eleição a nível hospitalar, ficando em muitos casos à frente de outros que, apesar de terem sido vastamente utilizados no passado, simplesmente não conseguem rivalizar o seu nível de eficácia (Corradini *et al.* 2014).

A relação entre o exercício e a inflamação é um tema que gera bastante discussão na comunidade científica, não só na vertente equina. Apesar de não haver dúvidas que o exercício pressupõe o desencadear de uma série de mecanismos inflamatórios decorrentes, a extensão, apresentação e papel que esta inflamação gerada tem na adaptação do organismo a futura exposição não é tão simples de ser caracterizada. Na medicina equina esta discussão acaba por ter um valor acrescido, uma vez que os equinos são atletas natos, com uma fisiologia criada e melhorada para a obtenção de feitos atléticos únicos para determinado desporto, seja este a corrida de galope, o salto de obstáculos, a resistência física (*endurance*) ou a *dressage*. O resultado direto deste mesmo tropismo para a *performance* desportiva de alto rendimento é uma vasta apresentação de condições, síndromes e até mesmo patologias derivadas do *stress* que o desporto causa a nível fisiológico, quando o atleta é levado ao extremo das suas capacidades, sempre com a inflamação no cerne de todo o processo.

A procura de elementos chave, dentro de todos estes mecanismos é uma necessidade primária da medicina desportiva e o resultado direto deste facto foi, e continua a ser, a procura constante de biomarcadores inflamatórios que apresentem uma alta sensibilidade e especificidade. Idealmente, estes biomarcadores deverão acompanhar todos os eventos, desde o despoletar até ao cessar de toda a resposta fisiológica, permitindo ao clínico não só estar um passo à frente do mesmo, mas também compreender todos os cenários possíveis que possam daí advir, conseguindo desta forma adaptar o regime de treino e atividade do atleta, no que diz respeito ao tempo e esforço despendidos em determinada atividade, em prol da promoção do seu bem-estar e rentabilidade desportiva, o que por sua vez é o fator condicionante mais relevante no sucesso desportivo (Moon et al., 2012).

Desta forma, o objetivo deste trabalho passa por analisar as variações que os níveis do ferro fisiológico apresentam num cenário de atividade desportiva prático e real, analisando o seu comportamento, e dos seus demais cofatores, em equinos atletas submetidos a um protocolo de atividade física, desenhado especificamente para mimetizar as condições físicas impostas em competição. Este estudo focou-se especificamente em atletas de *dressage* em início de carreira e sob um programa de treino intensivo pré-competição, sendo que todas as medições e análises foram feitas durante a realização de um Teste de Simulação de *Dressage* (TSD) desenvolvido pela equipa de investigação.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Dressage* – perfil do atleta

A *dressage* é um desporto equestre olímpico praticado em inúmeros países com uma grande variedade de equinos atletas de diferentes raças e características conformacionais. Porém, por forma a seleccionar os melhores atletas, são tidas em conta diferentes características chave como a conformação física, figura e perfil de andamentos base (passo, trote e galope). Todas estas variáveis são intensamente escrutinadas pela Federação Equestre Internacional (FEI), entidade máxima deste desporto, que publica diferentes artigos, notícias e guias de forma regular, assim como disponibiliza um livro de regras concebido originalmente no ano de 1999, mas sujeito a diferentes alterações e novas abordagens com o passar do tempo (Barrey et al., 2002).

A procura pelo atleta perfeito é algo comum em todos os desportos equestres, mas, devido ao carácter especial da *dressage*, no que diz respeito aos detalhes minuciosos, aliado ao quadro subjetivo das avaliações em concurso, esta tarefa torna-se perto de impossível quando chegamos à discussão dos pormenores. Este mesmo facto torna a *dressage* no desporto equestre com maior variabilidade no perfil dos atletas, quando comparada com os restantes e, apesar de existir um *ranking* concebido para definir as raças mais bem desenhadas para o sucesso desportivo, o mesmo não impede que diferentes raças sejam cobiçadas por pequenos detalhes únicos às mesmas, que poderão se tornar numa potencial mais valia na criação do atleta perfeito (Fraipont et al., 2011).

Um dos estudos mais completos e esclarecedores alguma vez realizado sobre este tema, elaborado por Barrey *et al.*, procurou, de uma forma extensiva e altamente detalhada, encontrar qual das raças, dentro das mais utilizadas no desporto, se aproximava mais do que seria considerado o atleta perfeito. Os investigadores utilizaram métodos de marcadores conformacionais e avaliação de movimentos em software específico, aliado a programas de análise e estatística avançada, assim como medições exatas das características anatómicas das raças mais utilizadas em competição para determinar quais as variáveis de interesse em jogo, a diferença nas mesmas para as diferentes raças e quais destas mais se aproximavam da perfeição, segundo as *guidelines* estabelecidas pela FEI. As variáveis dinâmicas em estudo foram a frequência da passada, a velocidade e amplitude do movimento, a simetria, regularidade e ritmo da passada, o deslocamento e atividade do eixo dorsoventral do pélvis, o perfil longitudinal do movimento e o

vetor e duração das forças de propulsão, que foram analisadas para os diferentes andamentos e que, por sua vez, foram correlacionadas com as variáveis estáticas do perfil anatómico da raça, no qual se inseriram as dimensões dos ossos que constituem os membros anterior e posterior, assim como o ângulo conformacional das articulações que os integram. O estudo chegou à conclusão que as raças alemãs (Hanoveriano, Oldenburger e Westphalian) enquadravam-se mais no que é considerado o atleta perfeito pela FEI em comparação com a francesa (Sela Francesa) e espanhola (Raça Pura Espanhola). E, ainda hoje, o panorama mantém-se inalterado, com as raças de origem alemã a serem mais bem sucedidas nas competições internacionais, assim como a ocuparem os primeiros lugares no ranking da FEI para as raças com maior aptidão para a *dressage*. Estas demonstraram uma maior aproximação do perfil anatómico desejado em comparação às restantes, com uma maior altura de ombros e porte físico aliado a um menor ângulo de inclinação das articulações em relação aos membros, sendo a raça espanhola a que apresentou mais diferenças ao desejado. Em relação às variáveis dinâmicas, as raças alemãs, mais uma vez, demonstraram um perfil mais aproximado do estabelecido pela FEI, com uma menor frequência dos movimentos de passada, regularidade e um excelente grau de deslocamento do eixo dorsoventral do pélvis que se traduziu numa maior elasticidade e força de propulsão do movimento, transparecendo uma imagem leve e natural nas transições e perfil dos mesmos. As raças francesas apresentaram uma maior frequência na passada aliada a um baixo grau de deslocamento do eixo dorsoventral do pélvis, traduzindo-se num perfil de movimentos menos fluído. E a raça espanhola, por sua vez, apesar de apresentar um excelente perfil para os movimentos em elevação, ao contrário dos de extensão, e um bom grau de propulsão, apresentou os níveis mais baixos de regularidade, ritmo e simetria dos movimentos (Barrey *et al.* 2002).

Os dados são claros e as variáveis em questão são um excelente indicador do que é esperado de um perfil de atleta de alta competição. Porém, devemos ter em conta que o mesmo é produto da soma de uma lista interminável de variáveis criada pela entidade máxima do desporto ao longo de duas décadas e, ao contrário dos restantes desportos equestres, em que os resultados são medidos de uma forma altamente objetiva e concreta, o mesmo não se pode dizer da *dressage*. Ao contrário das restantes, esta assenta no discernimento e poder de análise de diferentes coatores no processo de avaliação. E, para além do espaço para o erro humano, a subjetividade também possui um papel relevante na escolha dos vencedores sendo que muitas vezes é nestas variáveis de incerteza que o espaço para a criatividade e variedade de atletas entra. Nem sempre os resultados

podem ser medidos sobre a forma de quem cruza a linha de chegada primeiro, ou quem salta o maior número de obstáculos no menor espaço de tempo, e o resultado deste facto foi a imergência de diferentes atletas, com diferentes valências, pontos fracos e pontos fortes na alta competição. Atualmente não chega só possuir o perfil do atleta e, atualmente, um dos principais fatores em jogo assenta no método de criação, temperamento e ensino do cavalo para a *dressage* algo que acaba por ser único de atleta para atleta (Uphaos *et al.* 1992).

No que diz respeito ao cavalo Puro Sangue Lusitano (PSL) este possui um papel bastante ativo no desporto da *dressage*. De forma similar à Pura Raça Espanhola (PRE), o PSL possui conformações anatómicas e perfil de movimentos bastante diferenciados das raças alemãs e, por sua vez, do que é o *standard* esperado de um atleta de alto rendimento. Porém, as suas características conformacionais únicas aliadas ao seu uso intensivo e criação desenhada para os desportos da equitação de trabalho e ensino de alta escola equestre fazem com que este se apresente como um atleta altamente versátil com uma aptidão natural para a *dressage*, uma vez que se tratam de desportos que assentam nos mesmos pilares e perfil de atleta base.

Como já foi mencionado, a *dressage* compreende um atleta com características multivariáveis, sendo as linhas que definem o atleta perfeito não tão bem delineadas como a dos restantes desportos equestres, daí a variedade no perfil de equinos que englobam o desporto de alta competição, apesar do peso que determinadas raças possuem na alta competição, como é o caso das raças alemãs. O PSL, por sua vez, não se enquadra de todo no perfil geral destes atletas, encontrando-se na décima terceira posição do ranking da Federação Mundial de Criação de Equinos de Competição (WBFSH 2012).

O que torna os cavalos ibéricos, onde o PSL se insere, possíveis atletas de topo, reside em características altamente específicas destes animais, que não são de todo replicáveis nas restantes raças, incluindo o seu perfil único para movimentos em elevação, a sua força de propulsão e movimentos consolidados. Mas um dos principais fatores que também auxiliou a sua introdução exponencial neste desporto é a variabilidade nos resultados que determinado cavalo pode ter em competição. Apesar das normas para atribuição de pontos em concurso serem diretas e altamente específicas, o grau de apreciação e leitura da performance dos atletas nem sempre o é, aliás, estudos indicam que existe um grau de variabilidade considerável na avaliação dos atletas em concurso, mesmo para a alta competição, que tem repercussões diretas na correta apreciação das habilidades naturais de cada cavalo, uma das razões pela qual a taxa de transmissibilidade/heritabilidade de

fatores genéticos que condicionam a aptidão dos cavalos para este desporto ser tão baixa, ao contrário da grande maioria dos outros desportos onde o fator genético da heritabilidade constitui um elemento chave na probabilidade de obtenção de um atleta de topo (Hawson *et al.* 2020).

Um estudo realizado por Solé *et al.* procurou isolar as características únicas do perfil anatómico e movimentos dos cavalos ibéricos, incluindo o PSL, e compará-lo ao da maioria dos cavalos de topo na *dressage* de alta competição. Quatro andamentos específicos foram analisados ao detalhe, utilizando um Sistema 3D semiautomático do movimento em 66 cavalos machos de raça ibérica (22 dos quais PSL). O estudo utilizou 15 marcadores anatómicos, posicionados em regiões chave, para esboçar um perfil analítico e conformacional do movimento dos mesmos. Tendo em conta somente os resultados do PSL, este demonstrou a maior angulação, dos cavalos ibéricos em estudo, ao nível da escápula e quartela, o que é uma característica bastante vantajosa tendo em conta que as angulações e inclinação dos ombros possui um papel vital nos movimentos de retração e protração dos membros anteriores, providenciando uma boa força de propulsão e um perfil de movimentos mais natural e enquadrado. Porém, todas as raças ibéricas demonstraram um fator comum de angulação dos tarsos bastante diminuta ($<155.50^\circ$) o que constitui uma desvantagem relevante no que é esperado de um atleta de topo, uma vez que põe em causa a elasticidade e amplitude dos movimentos traseiros, algo crucial tendo em conta a importância do perfil de movimentos dos membros posteriores na iniciação e suporte de grande parte das passadas chave da *dressage* de alta competição. De todos os cavalos ibéricos, o PSL demonstrou os valores mais baixos para a duração e amplitude de movimentos (0,44s e 235.5cm, respetivamente), algo diretamente influenciado pela baixa angulação formada pelos tarsos. Porém, este também demonstrou os melhores índices de retração dos membros, algo que não pode ser dito em relação aos movimentos de protração, onde obteve os piores resultados (Solé *et al.* 2012).

Em conclusão, desde o perfil esperado de um atleta de topo, discutido inicialmente, até ao enquadramento do PSL no mesmo enquanto atleta de alta competição, podemos concluir que este não se encontra alinhado ao que poderia ser considerado uma raça de eleição, o que é diretamente corroborado pelos resultados pouco convincentes destes cavalos nos *rankings* mundiais. As diferenças conformacionais entre os mesmos e as raças alemãs, que ocupam os primeiros lugares, são astronómicas e, apesar do PSL possuir características únicas que o tornam singular em relação à competição, como a angulação dos ombros, força de propulsão e perfil de retração dos membros, no que diz respeito aos restantes fatores, este fica muito aquém do esperado.

De um ponto de vista puramente científico não é muito difícil concluir que se tratam de cavalos com mais desvantagens do que vantagens se o objetivo passa por chegar aos primeiros lugares das grandes e mais prestigiadas competições mundiais.

Apesar dos dados, a presença do PSL tem vindo a crescer no desporto, passando da décima terceira posição nos registos da WBFSH em 2012 para a oitava em apenas um ano, 2013. Porém, é extremamente difícil encontrar um cavalo PSL nas posições de líder do *ranking* do *International Grand Prix*, algo que não é surpreendente para aqueles que conhecem o desporto um pouco mais afundo. Apesar de tudo, não devemos excluir esta raça no que diz respeito ao seu mérito e capacidades como atleta de alta performance, e devemos ter em conta que se trata de um desporto com *standards* altamente superficiais e subjetivos até certo ponto. O perfil do PSL é algo natural e orgânico, resultado de uma longa história de uso intensivo na alta escola equestre portuguesa, com a obtenção de um perfil altamente característico e único no mundo, que por sua vez é cobiçado por uma grande variedade de cavaleiros para as mais diversas atividades desportivas, onde se insere em grande parte a *dressage* e variações da mesma. O PSL é um atleta diferenciado dos restantes e esperar que o mesmo se consiga inserir num perfil atlético e conformacional que pouco tem haver com o produto criado e aprimorado durante séculos de história é um pedido algo inviável e escusado até certo ponto. O perfil de atleta que o PSL representa não deve ser condicionado a uma imagem que nada tem haver com o mesmo, mas sim aprimorado dentro das capacidades e aptidões naturais que o tornam singular no mundo, algo que provém de uma corrente histórica de ensino equestre de alta escola, e que mais tarde deu origem ao desporto da *dressage*.

2. O ferro e o metabolismo energético aeróbico

O ferro é um elemento que está presente no sistema dos diferentes mamíferos, sob a forma de três estados redox distintos - estado ferroso (Fe^{2+}), o estado férrico (Fe^{3+}) e o estado ferril (Fe^{4+}). Devido ao seu comportamento químico este possui um papel essencial nas reações de transferência de eletrões, em reações de oxidação-redução e enquanto ponte de ligações químicas reversíveis com outros elementos em circulação (maioritariamente oxigénio, nitrogénio e sulfato). Atualmente estão identificadas quatro classes de proteínas funcionais portadoras de ferro que facilitam e proporcionam todas estas reações químicas, tratando-se de (1) proteínas férricas não enzimáticas

(hemoglobulina e mioglobulina), (2) enzimas ferro-sulfúricas, (3) enzimas portadoras do grupo heme e (4) enzimas férricas não heme e não ferro-sulfúricas (Beard 2001).

No que diz respeito à atividade desportiva, o ferro possui um papel crítico em todo o mecanismo sistémico de adaptação e *output* energético, estando intimamente relacionado com o transporte de oxigénio e metabolismo. Qualquer diminuição ou deficiência nos mecanismos que o englobam põe em causa o rendimento desportivo. Desta forma, é essencial para o clínico de medicina desportiva perceber e familiarizar-se com todo o seu ciclo e interações com outros componentes envolvidos no processo (Hinton 2014).

De uma forma geral o ciclo do ferro tem início com a sua presença biológica no sangue como ligante do grupo heme dos eritrócitos em circulação, sendo responsável pela estabilidade do mesmo enquanto molécula, e garantido o transporte de oxigénio (O₂) desde os capilares pulmonares até ao músculo esquelético. Já nos músculos, o O₂ é captado pela mioglobina (via do anel heme da porfirina) que o transporta até à matriz celular onde desencadeia toda uma sequência de reações oxidativas que culminam na produção de adenosina trifosfato (ATP), por forma aeróbica, fazendo uso dos citocromos heme portadores (a, a₃, b, b₅, c, c₁) e das enzimas não heme não ferro-sulfúricas (NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, citocromo-ubiquinona C redutase) (Beard and Tobin 2000).

Do ponto de vista puramente prático qualquer diminuição na disponibilidade de ferro, abaixo dos níveis fisiológicos, e/ou deficiência nos mecanismos envolvidos, contribui para um cessar da via aeróbia e resulta numa resposta alternativa de adaptação que faz uso das vias anaeróbias para a produção de energia cortando, de forma substancial, a capacidade de resistência e resiliência metabólica do atleta, assim como o seu nível de resposta ao esforço implicado pela atividade física em questão (Hinton 2014).

3. O exercício e a inflamação

Até agora foram descritas as funções, os mecanismos e o papel que o ferro tem na produção de energia aeróbica e a sua relação com a atividade desportiva de cerne aeróbico. Mas com igual e talvez maior importância, é o papel que o mesmo possui na resposta de adaptação do organismo quando o mesmo é exposto ao *stress* do exercício de alta intensidade, e a sua relação

na recuperação e adaptação do físico do atleta, que por sua vez possui um papel chave no que é a sua aptidão e rentabilidade desportiva (Sim *et al.*, 2019).

O exercício pressupõe obrigatoriamente a indução de dano ao nível muscular, que por sua vez conduz à necessidade de reparação e adaptação muscular às exigências que lhe são impostas (McMiken, 1983).

Existem diversos fatores que influenciam esta resposta biológica, mas de uma forma geral podemos afirmar que a mesma assenta em três grandes pilares e que esta é tanto maior quanto maior a presença dos mesmos na atividade física em questão. Tratando-se do nível de “esforço físico” (*workload*), do “tempo de esforço” (“*time of exertion*”), e a estes podemos adicionar o estado físico atual em que o atleta se encontra, o “condicionamento” (“*conditioning*”) que por sua vez compreende toda a remodelação e adaptação prévia que este poderá ter sido sujeito até ao momento (Peeling *et al.*, 2009).

Pondo em prática estas noções base da relação exercício-dano-resposta podemos afirmar que:

- ⇒ Um cavalo atleta de corrida sujeito a uma corrida contínua de 20 minutos em pista de areia reta estará a causar maior nível de dano muscular que o mesmo atleta se cortássemos a sua atividade para os 10 minutos (fator tempo de esforço);
- ⇒ Mas, se por sua vez, o mesmo cavalo perfizer um total de 10 km em 20 minutos e numa outra altura, exatamente sob as mesmas condições, perfizer um total de 20 km no mesmo espaço de tempo, podemos concluir sem sombra de dúvidas que o esforço que o mesmo realizou na última é consideravelmente superior ao da primeira corrida (fator esforço físico);
- ⇒ Por último, se considerarmos uma corrida simples de 10 km em pista de areia reta, podemos afirmar com elevado grau de certeza que um Puro Sangue Inglês de dois anos, que corre desde os 6 meses de idade, terá um resultado, ao nível de dano muscular e nível de esforço imposto pela atividade, completamente diferentes em comparação a um cavalo de *dressage* nas mesmas exatas condições e sob variáveis semelhantes. E, podemos também esperar um nível de rentabilidade e aptidão para a tarefa imposta completamente diferentes entre estes dois atletas (fator condicionamento);

Desta forma, é importante perceber que apesar da resposta biológica ao exercício ser a mesma para qualquer individuo, o nível, tolerabilidade e resultado da mesma não o vão ser.

Após ser sujeito ao dano causado pela atividade física, o organismo desencadeia uma série de respostas que, em suma, passam por acionar todas os mecanismos celulares de defesa num estado de alerta até que o dano seja reparado e adaptado para que não volte a suceder, ou seja, um objetivo que começa e acaba com um processo inflamatório (Hale et al., 2023).

O exercício exige ao organismo alterações ao nível nervoso (aumento da atividade simpática), cardiovascular (aumento da frequência e débito cardíacos, assim como da elasticidade da vasculatura periférica e rendimento da distribuição sanguínea nas zonas alvo, ou seja zonas de maior atividade nervosa e metabólica em resposta ao estímulo físico), endócrino (maior produção de energia e *clearance* dos resíduos da mesma) e respiratório (aumento da frequência respiratória e volume de oxigénio nos pulmões), que por sua vez se traduzem numa variação da homeostasia para um estado catabólico contínuo com a finalidade de promover altas concentrações de ATP (energia celular) e oxigénio em circulação (Davidson *et al.*, 1987). Este processo, por sua vez, pressupõe a produção paralela de resíduos desta atividade metabólica acelerada, mais propriamente a produção de calor e de metabolitos de excreção que deverão ser eliminados de forma rentável com o objetivo de restabelecer homeostasia ao organismo. Podemos englobar todos estes mecanismos num só fenómeno e, por questões de simplificação, denominá-lo de *stress* desportivo (Liburt et al., 2010).

Esta resposta de *stress* tem o seu início no Sistema Nervoso Central, mais propriamente no eixo Adrenal-Pituitário-Hipotalâmico que induz a produção e aumento das concentrações de adrenalina e glucocorticoides, que vão ser o combustível que vai alimentar todo este fenómeno de *stress* desportivo, pelo menos na sua fase inicial (Liburt et al., 2010). Por sua vez, este conjunto de adrenalina mais glucocorticoides vai ter influência direta no sistema imunitário, promovendo alterações que não vão, de forma alguma, passar despercebidas pelo mesmo. Células imunitárias e células do tecido muscular (lesadas) vão induzir a produção e libertação de uma série de mediadores inflamatórios para a circulação sistémica, de maior relevância a interleucina (IL)-6, IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , que por sua vez vão desencadear toda a resposta inflamatória decorrente (Holbrook *et al.* 2010).

Para além da libertação de citocinas pró-inflamatórias esta resposta de *stress* desportivo também vai induzir outros fenómenos paralelos e coadjuvantes de todo o processo, como é exemplo o *stress* oxidativo e hemólise intravascular (Macnicol et al., 2018).

Antes de chegar aos elementos sanguíneos e metabolitos que envolvem toda esta resposta é necessário primeiro entender o que as células dizem, mais especificamente o perfil de proteínas que são expressas pelo conteúdo genômico das mesmas em resposta à inflamação e o possível impacto que o mesmo tem na condução deste fenómeno. Os estudos proteômicos têm ganho bastante destaque nos últimos anos na procura de novos biomarcadores para diferentes patologias, especialmente cancerígenas, e na medicina equina também fornecem diferentes informações sobre o perfil de determinadas doenças, uma vez que traduz o que as células expressam, indo à origem dos acontecimentos que acabam por desencadear a resposta (Scoppetta et al., 2012).

Um estudo realizado por Scoppetta *et al.*, procurou esclarecer exatamente este assunto e perceber que perfil proteômico as células de equinos atletas expressam após estes serem sujeitos a um regime intensivo de treino. Os investigadores analisaram e processaram as amostras de sangue com recurso a procedimentos de espectrofotometria de massa combinada. Trinta e oito segmentos genéticos foram identificados em proteínas inflamatórias de fase aguda, produtos associados à expressão de treze genes regulamentares. Estes segmentos demonstraram um aumento significativo na sua expressão, em comparação com outros, após os animais terem sido sujeitos a esforço físico intenso, sob a forma de corridas de endurance de 90 a 120 Km. Estes segmentos, por sua vez, estão diretamente relacionados com proteínas de fase aguda libertadas pelas células e traduzem o perfil proteômico que as mesmas expressam nessas condições. Os resultados obtidos demonstraram que, após atividade física prolongada, houve um aumento significativo da expressão de proteínas relacionadas com a inflamação, coagulação, modulação imunitária, atividade oxidação-redução e de dano vascular e tecidual por parte das células podendo, desta forma, estabelecer um perfil proteômico do exercício e consequentemente perceber o porquê de todos os mecanismos metabólicos que o sucedem (Scoppetta et al., 2012).

Como já foi referido anteriormente, aquando de um processo inflamatório, diferentes citocinas pró-inflamatórias são libertadas para a circulação, que por sua vez promovem e prolongam todo o evento. Algumas delas são de enorme relevância na prática clínica constituindo importantes marcadores biológicos para o diagnóstico e prognóstico da doença.

Um estudo realizado por Liburt *et al.* procurou perceber mais a fundo o papel dos principais marcadores inflamatórios utilizados em clínica e o seu comportamento, não só na componente sistémica, mas também na local (origem do dano) sob a forma das suas concentrações no sangue e músculo, respetivamente. Amostras de sangue e de biópsias musculares foram

recolhidas e processadas após os animais, éguas não atletas saudáveis, serem submetidos a um programa intensivo incremental de exercício, desenvolvido especificamente com o objetivo de promover um estado de *stress* inflamatório máximo. Os marcadores em questão utilizados nesta investigação foram a IL-1, a IL-6, o interferão (IFN)- γ e o TNF- α . As suas concentrações foram recolhidas aos 30min pré-exercício e aos 30min, 1, 2, 6 e 24h pós-exercício por forma a estabelecer uma relação de causalidade e observar a evolução dos mesmos tanto no sangue como no músculo (Liburt et al., 2010).

No que diz respeito ao IFN- γ , desta é uma citocina pró-inflamatória com um papel crítico em todo o processo. É sintetizado pelas células T-helper 1 (Th1) e Natural Killer (NK), atuando nos macrófagos estimulados, células citotóxicas T, células NK, linfócitos B, estando também envolvido no processo de síntese do ácido nítrico, produção de anticorpos e atividade anti-viral (Elenkov 2004). A evolução das concentrações deste marcador no estudo corroboram o seu papel vital na resposta imunitária central, com um aumento inicial mensurável no sangue seguido por um aumento local no músculo. Foi também observado um paralelismo entre a expressão deste marcador e a atividade das células Lymphocyte Activated-Killer's (LAK), o que constitui uma correlação e mutualismo no comportamento das duas (Liburt et al., 2010).

Em relação à IL-1 esta é produzida pelos macrófagos, monócitos e células dendríticas, possuindo dois subtipos distintos, a IL-1 α que atua primariamente no citosol das células e a IL-1 β que apenas é ativada via uma protease regulada pela atividade dos monócitos. Um aumento de IL-1 em circulação está associado a uma variedade de respostas sistémicas à presença do estímulo inflamatório, mais especificamente a pirexia, letargia, modulação da inflamação e estimulação da proliferação celular. A IL-1 β , mais especificamente, autorregula a sua própria expressão ao nível celular, assim como a das IL-2 e IL-6 (citocinas pró-inflamatórias), estando também associada na promoção da atividade enzimática de enzimas que sintetizam os leucotrienos, prostaglandinas e ácido nítrico (Moldoveanu *et al.* 2001). No estudo mencionado houve um aumento registado das concentrações de IL-1 β em circulação após o pico da atividade física, mas o mesmo não foi registado no tecido muscular o que corrobora o seu papel específico na modulação da resposta inflamatória sistémica central (Liburt et al., 2010).

A IL-6 possui um papel documentado no que toca à cascata de eventos que modulam toda a resposta inflamatória, tratando-se de um dos marcadores de inflamação mais relevantes no que toca ao *stress* desportivo, para além que esta citocina pró-inflamatória tem demonstrado uma

importância chave nas funções de sinalização da resposta integrada do controlo das concentrações de glucose ao nível muscular (Pedersen and Hoffman-Goetz 2000). Em medicina humana, estudos evidenciaram um aumento significativo na expressão da mesma ao nível muscular, mas não sanguíneo, quando a intensidade e/ou duração do exercício foram incrementados, possuindo um papel relevante nas alterações metabólicas musculares de forma a promover o equilíbrio homeostático, mesmo antes do desencadear de um processo inflamatório (Nieman *et al.* 1998; Ostrowski *et al.* 2000; Pedersen *et al.* 2001, 2003; Helge *et al.* 2003; Steensberg *et al.* 2003). Liburt e colaboradores, observaram um aumento significativo dos níveis de IL-6 após o exercício, com uma maior expressão a nível muscular em comparação ao sistémico (circulatória). Estes achados, para além de corroborarem o papel vital desta citocina como mediador inflamatório, também sugerem uma ação ativa da mesma no metabolismo muscular aquando da resposta aguda ao *stress* infligido, mesmo antes de ser iniciado qualquer processo inflamatório, o que a torna um marcador extremamente interessante tendo em conta esta sua possível multivalência (Liburt *et al.*, 2010).

Por último, o TNF- α é um marcador inflamatório muito relevante e bastante utilizado na prática clínica. Este possui um papel central na resposta inflamatória aguda que envolve dano muscular, proteólise muscular e impedimento do *uptake* de glucose ao nível do músculo esquelético. No estudo referido, o TNF- α apresentou um aumento significativo tanto nos seus níveis sanguíneos, como nos musculares em resposta ao exercício. Houve um aumento registado ao nível muscular de forma quase imediata após a atividade física. Porém, os seus níveis sanguíneos apenas registaram aumentos na marca das 6h pós-exercício o que permite aos investigadores desenhar diferentes cenários do porquê destas variações. O mais provável será um aumento significativo ao nível muscular que, por sua vez, acaba por ser extravasado para a corrente sanguínea durante a evolução do processo. Outro cenário será uma possível sinalização/estímulo secundário que promove a transição desta molécula de músculo para músculo consoante os rácios de inflamação/recuperação registados nos diferentes tecidos. Independentemente do que seja o seu papel, é claro que a TNF- α constitui um marcador chave da resposta inflamatória por *stress* desportivo (Liburt *et al.*, 2010).

Ao perceber o papel que a expressão celular tem na origem dos comportamentos de defesa, mais especificamente, o perfil proteómico que as mesmas expressam como resposta ao estímulo, e os principais marcadores inflamatórios que descrevem a evolução de todo o processo, devemos também enaltecer o comportamento e prevalência dos subprodutos da mesma e o impacto

que estes têm em todo o processo, mais especificamente os marcadores oxidativos de maior importância, que por sua vez derivam diretamente dos compostos que são produzidos durante a inflamação e que também constituem uma fonte de dano se não forem controlados e inutilizados sobre a forma de uma reação química de redução para posterior excreção.

Nos últimos anos diversos estudos têm corroborado o papel que o estado de *stress* oxidativo, consequente do processo inflamatório, tem no desenvolvimento e perpetuação da mesma e, por sua vez, tratar-se de um elemento-chave na patofisiologia de doenças, especialmente crônicas, de diferentes foros, tais como cardiovascular e neurodegenerativo. Compostos oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) estão presentes em todas as etapas do processo inflamatório, tendo um papel essencial no desencadeamento desta, pela sua libertação por parte das células lesadas por forma a servir de sinalizadores ao sistema imune e promotores da resposta inflamatória inicial, tendo compatibilidade com a família de recetores *Toll-like* (TLR) e *NOD-like* (NLR) presentes nas células da linha branca, estabelecem desta forma uma rede de comunicação bastante eficaz durante todo o processo (Lugrin *et al.* 2014).

Um dos principais marcadores de *stress* oxidativo utilizados para medir a dimensão da resposta inflamatória é o óxido nítrico (NO) e, apesar da resposta oxidativa não ser de todo utilizada ou considerada uma medição tão pertinente quando comparada à das citocinas pró-inflamatórias, possui, contudo, um papel interessante na obtenção de respostas sob o processo inflamatório que se encontra a decorrer. O NO é sintetizado a partir da L-arginina através de uma reação catalisada pela família de enzimas óxido nítrico sintetase (NOS). O NO possui funções reguladoras e modeladoras na inflamação, incluindo a regulação da cascata de sinalização e fatores de transcrição, regulação da *compliance* vascular, regulação da movimentação e migração de leucócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias, proliferação e apoptose celular. Este seu papel vital na inflamação torna-o um alvo terapêutico, extremamente interessante, em patologias que envolvem a inflamação crónica, e a procura de inibidores de produção de NO (iNOS) têm conduzido a diversos estudos com variados graus de sucesso no controlo dos mesmos (Korhonen *et al.* 2005).

Um estudo realizado por MacNicol *et al.* procurou comprovar esta relação íntima entre a resposta inflamatória e a resposta oxidativa. Para isso, analisou o comportamento de dois marcadores, o NO e a prostaglandina E2 (PGE2), avaliando assim a componente oxidativa e inflamatória, respetivamente. Esta avaliação decorreu após um grupo de oito cavalos de origens,

sexo, raças e idades diferentes, ter sido submetido a um programa intensivo de exercício físico por forma a atingirem o intervalo estabelecido para a frequência cardíaca ótima de 180 batimentos por minuto. Os resultados comprovaram um aumento significativo destes dois marcadores na corrente sanguínea imediatamente após o exercício, tendo sido analisados em períodos diferentes às 24h pré-exercício, 30 min, 1, 2, 4, 8 e 24h pós. Assim, foi possível corroborar a relação próxima que o NO e PGE2 têm, atuando como um só na promoção da resposta ao *stress* desportivo. Quanto às curvas de progressão, a resposta inflamatória manteve-se acionada por um período mais regular e longo quando comparada à oxidativa, que por sua vez apresentou um pico marcado desde os 30 min às 2h, diminuindo depois, de uma forma progressiva e gradual, até à marca das 24h pós-exercício, onde já se encontrava dentro dos valores do pré-exercício (Macnicol et al., 2018).

O *stress* desportivo e a resposta inflamatória consequente não são de todo um processo minimalista e simples, a multivalência do mesmo conjugada aos fatores de variação descritos no primeiro parágrafo entre os diferentes indivíduos ilustram um quadro altamente complexo e multifatorial. Toda a informação descrita nestes últimos parágrafos procura caracterizar a cascata de eventos de uma forma muito pragmática e resumida aos pontos essenciais. Tratando-se de uma ciência em constante desenvolvimento é prudente estar recetivo e acompanhar os mais recentes desenvolvimentos que têm acontecido na mesma. Apesar de se tratar de um fenómeno transversal na ciência médica desportiva podemos sem sombra de dúvidas enaltecer as capacidades dos equinos como atletas puros e únicos, em relação a muitas outras espécies, logo este evento fisiológico e a sua contemplação na medicina desportiva equina trará certamente muitas mais valias num futuro próximo, para toda a medicina e biologia do desporto.

3.1.O exercício, a resposta inflamatória e o ferro

Ao provocar dano muscular o exercício induz uma resposta sistémica fisiológica orquestrada que culmina na reparação da matriz muscular e reforço da mesma. Tecido danificado e/ou sob condições de *stress* inflamatório, inicia uma sequência de reações de defesa orgânica denominada de Resposta de Fase Aguda (APR, do inglês *Acute Phase Response*). Nesta, ocorre uma sinalização sistémica induzida pelo tecido danificado que leva o fígado a produzir e libertar para a circulação uma série de proteínas de fase aguda denominadas de proteínas de fase aguda positivas (Positive APP's), como é o exemplo da haptoglobina, proteína C-reativa, amiloide A

sérica (SSA), ceruplasmina, fibrinogénio e glicoproteína ácido- α . Outras proteínas, contrariamente, demonstram uma diminuição da sua concentração em circulação após este estímulo, e estas são denominadas de proteínas de fase aguda negativas (Negative APP's), sendo a mais relevante e importante a albumina (Murata *et al.* 2004).

Estudos indicam que, após atividade física considerável, os cavalos desenvolvem uma resposta sistémica inflamatória de fase aguda marcada pela presença de leucocitose, aumento na expressão celular de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e aumento em circulação de TNF- α e PGF-2 α , e citocinas pró-inflamatórias (Jackson *et al.* 2007).

Um estudo recente realizado por Arfuso *et al.* procurou ir mais longe no que diz respeito ao efeito concreto do exercício e perfil inflamatório que o mesmo produz, ao pesquisar de forma minuciosa as alterações provocadas nas proteínas e moléculas de fase aguda mais relevantes no processo, mais propriamente a SSA, fibrinogénio, haptoglobina, albumina e ferro sérico livre (Fe²⁺). Os resultados obtidos evidenciaram uma correlação positiva entre as concentrações de SSA, haptoglobina, fibrinogénio e ferro, e o tempo e intensidade do estímulo (exercício). O mesmo não se pode dizer para a albumina, que revelou alterações desprezíveis para a questão em estudo (Arfuso *et al.*, 2020).

Observou-se um aumento registado dos níveis de expressão de (IL)-6 a nível sistémico dentro dos 30 a 90 minutos pós-estímulo que corroboraram o desencadear da fase inflamatória de resposta aguda como reação ao estímulo produzido, neste caso regime de treino idealizado pela equipa de investigação, atribuindo veracidade aos resultados obtidos (Arfuso *et al.*, 2020).

Por outro lado, a SAA registou um aumento considerável na sua concentração em circulação que teve início nas 6 a 12 horas pós-estímulo e pico nas 48 horas, com uma grande sensibilidade e especificidade para a questão em estudo, os seus níveis fisiológicos extremamente baixos em cavalos saudáveis acompanhado com a sua biocinética em termos de produção e decomposição extremamente acelerados demonstraram um poder e valor elevados como variável clínica de diagnóstico e prognóstico. O fibrinogénio e haptoglobina, por sua vez, revelaram uma sensibilidade baixa para a mesma, com uma amplitude de resposta diminuta e tempo de alteração sistémica muito demorado, registando-se alterações na marca das 12 a 24 horas pós-estímulo e pico nas 72 a 144 horas. Para além disso, foram as únicas variáveis em estudo que permaneceram inalteradas após o término do processo inflamatório em si, regressando aos valores fisiológicos basais de uma forma muito gradual e não linear, demonstrando uma debilidade considerável como

fatores de diagnóstico e prognóstico no caso específico em estudo, algo com grande relevância tendo em conta o seu uso privilegiado na prática clínica comum. O ferro, tal como a SSA, demonstrou uma especificidade e sensibilidade bastante elevadas, assim como uma cinética bastante acelerada que acompanhou todo o período pós-estímulo e resposta inflamatória de uma forma muito eficiente, desde o início ao cessar do mesmo, resultando numa diminuição considerável nos níveis séricos dentro dos intervalos das 12 a 24h pós-estímulo e regularização dos valores num período não superior às 24h após o cessar da fase inflamatória. Este comportamento biológico está intimamente relacionado com a sua regulação por parte do fígado e mecanismos da hepcidina (enzima hepática responsável pela regulação do ferro sérico consoante as necessidades do organismo; aumentos desta enzima em circulação promovem a captação de ferro por parte dos tecidos e sequestro do mesmo em órgãos como o fígado e baço de forma provisória), este comportamento e evolução na resposta biológica dentro do contexto em estudo revelou um alto valor preditivo de diagnóstico e prognóstico desta variável clínica (Peeling, 2010).

Também pertinente de fazer referência foi o facto de cavalos sujeitos a programas de treino mais intensivos demonstrarem uma alteração igual à de cavalos sujeitos a programas menos intensos no que diz respeito às variáveis em estudo, mas numa ordem de valores significativamente mais pronunciada, especialmente para a SSA e ferro, o que corrobora a relação entre o nível de inflamação e intensidade de exercício para além da sensibilidade e especificidade destas duas variáveis (Arfuso *et al.* 2020).

4. O papel do ferro na inflamação em ambiente hospitalar

No que diz respeito à inflamação sistémica que acompanha processos patológicos em meio hospitalar, também existem diversos marcadores com viabilidade de diagnóstico e prognóstico que são utilizados. E, curiosamente, os métodos não diferem muito dos utilizados na inflamação observada na componente desportiva.

Dos marcadores mais utilizados na prática hospitalar destacam-se a SSA, o fibrinogénio, a proteína c-reativa (CRP) e a mieloperoxidase neutrofílica. Porém, estes não são isentos das suas desvantagens e pontos fracos (Jacobsen *et al.* 2005).

O fibrinogénio, altamente utilizado, apenas regista aumentos mensuráveis dentro das 24 a 72 horas após início do estímulo inflamatório, revelando uma sensibilidade baixa e extremamente tardia para um diagnóstico preciso e precoce (algo vital em casos que envolvem patologia associada). Para além disso, os valores mantêm-se elevados mesmo depois do processo inflamatório ter terminado, até 7 dias em determinados estudos (Crisman et al., 2008).

A SAA apesar de ser um marcador extremamente sensível e confiável, carece de um método de análise e processamento dispendioso, algo que não é acessível para qualquer bolso, especialmente quando estamos perante manifestações crónicas que requerem um acompanhamento e monitorização contantes (Hultén & Demmers, 2002).

A CRP, altamente utilizada em Medicina humana, demonstrou um bom desempenho como marcador de inflamação em equinos. Porém, tal como a SAA, carece de elevados custos de análise e processamento, para além de uma baixa reprodutibilidade (Tugirimana et al., 2011).

Por último, e não menos importante, a mieloperoxidase neutrofílica possui algumas limitações na veracidade de diagnóstico na inflamação aguda, quando utilizada de forma singular como único marcador inflamatório. Porém, este fator é eliminado quando se trata de casos de inflamação crónica grave e sépsis, no qual o seu poder de diagnóstico aumenta exponencialmente, mesmo comparando com os demais marcadores (Pollock *et al.* 2005).

O ferro sérico tem ganho bastante destaque nos últimos anos como marcador inflamatório em processos de fase aguda, demonstrando uma grande sensibilidade e especificidade para os mesmos. A concentração de ferro em circulação diminui na presença de um estímulo inflamatório, algo que é evidenciado em diferentes espécies de mamíferos, e o equino não é exceção. Pensa-se tratar de um mecanismo de defesa natural que previne que agentes patogénicos, como bactérias, façam uso da abundância de ferro em circulação para promoverem o seu crescimento e multiplicação, já que este elemento é essencial no metabolismo dos mesmos. Esta resposta tem como objetivo atrasar a sua replicação por forma a que os sistemas de defesa do organismo (células da linha branca) tenham tempo de os detetar e inviabilizar de forma rápida e eficaz, cessando por completo todos os mecanismos de doença antes que estes provoquem danos consideráveis. Esta estratégia, tal como muitas outras da linha defensiva e de homeostasia, encontram-se sobre a “responsabilidade” do fígado, mais especificamente de uma enzima hepática denominada de hepcidina, que por sua vez integra todo um sistema de sinalização altamente eficiente que incorpora a (IL)-6 (citoquina pró-inflamatória). O seu papel já foi brevemente enaltecido

previamente mas, basicamente, o aumento desta enzima em circulação promove a captação do ferro por parte dos tecidos e sequestro do mesmo em órgãos como o fígado e baço de forma provisória, para além de bloquear a exportação de ferro por parte dos enterócitos e macrófagos para a circulação. A sua diminuição, por sua vez, provoca exatamente o contrário, traduzindo-se na libertação do ferro até que os níveis sanguíneos voltem à linha fisiológica normal, algo que só é desencadeado quando o estímulo inflamatória desaparece por completo. Todo este mecanismo é altamente eficiente e possui uma biocinética extremamente acelerada conferindo ao ferro o seu poder de sensibilidade e especificidade característicos durante todo o processo inflamatório, em comparação com os demais (Peeling, 2010).

Inúmeros estudos têm sido realizados nas mais diferentes espécies que corroboram esta mesma afirmação e os equinos não são exceção ao demonstrarem a diminuição mensurável deste elemento e mecanismos de ação metabólicos aquando de exposição experimental a agentes patogénicos virais e bacterianos (Divers *et al.* 2007).

Um estudo realizado por Borges *et al.* procurou corroborar estas mesmas afirmações. O estudo em questão utilizou o ferro como marcador de inflamação em 131 equinos hospitalizados. Separando-os em três grupos distintos, um grupo portador de inflamação sistémica ativa (n=97), outro por inflamação local (n=22) e um último composto por animais saudáveis (n=12). Ao longo do estudo os investigadores acompanharam toda a evolução da doença (com foco no processo inflamatório), ao mesmo tempo que empregavam a terapêutica recomendada para a resolução da mesma, utilizando durante todo o processo o ferro como indicador de diagnóstico e prognóstico em comparação com o fibrinogénio.

Os resultados foram surpreendentes corroborando não só o poder do ferro como indicador de diagnóstico em comparação ao fibrinogénio, mas também o seu excelente desempenho como indicador de prognóstico, algo que não tinha sido muito explorado em investigações prévias. Aquando da admissão, o ferro demonstrou um poder de sensibilidade para o diagnóstico de inflamação consideravelmente superior ao do fibrinogénio traduzindo-se em 90% para os casos de inflamação sistémica (82% fibrinogénio) e 68% para os de inflamação local (45% fibrinogénio). No que diz respeito ao prognóstico foi possível estabelecer uma relação entre os níveis de ferro sérico e a probabilidade de sobrevivência, uma vez que animais sobreviventes apresentaram níveis de ferro mais elevados ao longo do processo terapêutico, em comparação com os níveis de admissão, enquanto que não sobreviventes apresentaram sempre níveis mais baixos e pouco

responsivos aos esforços da terapêutica. Algo que contrastou com o que foi observado para o fibrinogénio, que apresentou uma grande variabilidade entre grupos nos diferentes seguimentos de doença (Borges et al., 2007).

Este papel do ferro como um marcador inflamatório de referência na medicina hospitalar traz luz ao seu enorme potencial em tudo o que toca a inflamação. E, apesar da mesma se tratar de um processo altamente complexo que pode ser desencadeado pelos mais diversos fatores e tomar diferentes caminhos aquando da sua cronicidade podemos afirmar que o ferro revela-se uma grande ajuda no seu diagnóstico e acompanhamento, seja no ramo da medicina desportiva ou no da hospitalar.

5. O ferro e os seus cofatores

Para compreender o significado das concentrações de ferro no sangue e o impacto que possíveis alterações do mesmo poderão ter na saúde do animal é necessário ter em conta valores hematológicos de outras variáveis que, pela sua relação biológica direta com o ferro, contribuem para compreender e caracterizar estas mesmas alterações numa perspetiva mais geral e enquadrada dos factos. Destas, destacam-se a TIBC (Capacidade de fixação do ferro, do Inglês “Total Iron binding capacity”), o IST (Índice de saturação da transferrina) e a UIBC (Capacidade de ligação do ferro não saturado, do Inglês “Unsaturated Iron binding capacity”).

A TIBC é uma medida definida pela quantidade total de ferro que satura, de forma máxima, toda a transferrina plasmática que, por sua vez, se trata de uma glicoproteína plasmática responsável pelo transporte do ferro em circulação. Esta mesma variável pode ser mensurada fazendo uso dos valores da UIBC ou através dos valores de concentração de transferrina em circulação, traduzindo de forma indireta a quantidade de ferro disponível para utilização e/ou uma incapacidade funcional de fazer uso do mesmo (Elsayed *et al.* 2016).

O IST, por sua vez, define a percentagem de transferrina em circulação que se encontra saturada pelo ferro. São necessárias duas componentes para estimar o seu valor, a TIBC e a concentração de ferro sérico. O principal uso do IST passa pela sua capacidade de caracterizar o estado das reservas de ferro ao nível sistémico, sendo altamente relevante no diagnóstico de estados de hiper ou hipoferremia (Guyatt, 1992). Quando os valores do IST diminuem,

acompanhados de um decréscimo na concentração de ferritina é atingido um estado de deficiência em ferro absoluta e como consequência, a atividade de eritropoiese é prejudicada levando a um decréscimo da hemoglobina em circulação e à instalação de um processo de anemia ferropênica (Camaschella. 2015). Porém, o IST possui uma falha crítica quanto ao seu valor de diagnóstico, que é evidenciada nos casos de inflamação sistêmica onde os pacientes podem apresentar valores diminuídos de IST sem que haja necessariamente uma deficiência nos valores do ferro sérico. A diminuição nos valores do ferro face ao estímulo inflamatório com consequente ativação do mecanismo regulador da hepcidina indicaria para um estado de falsa hipoferremia absoluta. A presença de inflamação contribui para um fenômeno denominado de Hipoferremia funcional que é caracterizado não por uma deficiência em ferro, mas sim por um sequestro e diminuição na disponibilidade sérica do mesmo. Porém, se estivermos cientes que existe uma forte possibilidade de que o estímulo inflamatório está presente, a conjugação dos valores, e variações nos mesmos, do IST e TIBC, podem-nos fortalecer o diagnóstico de deficiência em ferro funcional como resposta a um processo inflamatório sistêmico, em vez de apenas dependermos dos valores do ferro sérico como único meio de diagnóstico para o mesmo (Thomas *et al.* 2013).

6. As limitações do ferro

Talvez mais importante do que mencionar as valências e excelente desempenho do ferro como marcador inflamatório é fazer referência às potenciais falhas e casos onde o mesmo poderá não corresponder às necessidades exigidas.

Tal como qualquer outro marcador, o ferro também possui certas desvantagens que poderão pôr em causa a sua sensibilidade de diagnóstico, mais especificamente variáveis que incutam no mesmo variações na sua concentração que nada têm a ver com um processo inflamatório, incluindo a idade, terapia prolongada à base de corticosteroides, hemólise multifatorial, doença hepática e suplementação de ferro, não devendo ser considerado um marcador de eleição para nenhum destes casos (Theurl *et al.*, 2009).

É importante ter em conta que num regime normal é extremamente raro para um equino adulto apresentar um quadro de hipoferremia. Assume-se que na presença do mesmo o mais provável será uma potencial consequência de um processo inflamatório decorrente. É também sensato estar ciente de que a suplementação em ferro nas dietas ou mesmo por outras formas mais

invasivas não é um fenómeno assim tão raro quando se trata de equinos atletas de alta competição e, apesar de na grande maioria dos casos esta suplementação não ser suficiente para suscitar alterações nos intervalos de referência séricos fisiológicos para intervalos de ordens superiores de concentração, esta possibilidade não deve ser de todo ignorada pelo clínico (Geor, 2006). É imperativo deixar bem claro que equinos adultos saudáveis conseguem aceder de uma forma relativamente fácil e natural às quantidades requeridas de ferro diárias e, que mesmo no caso de atletas, as dietas formuladas comerciais já contabilizam possíveis necessidades extra que possam ser requeridas pelo esforço da competição. Assim sendo, o excesso de ferro constitui um risco sério na saúde do animal e o seu potencial tóxico, especialmente no que toca à componente hepática, não deve ser ofuscado na tentativa da criação de um atleta de topo (Theelen et al., 2019).

III. Projeto de Investigação

O presente trabalho teve a aprovação da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona (FMV-ULusófona), estando registado sob o número 112-2021 (aprovado a 18/11/2021).

1. Objetivos

Este trabalho pretendeu analisar uma possível correlação entre o exercício e o comportamento fisiológico do ferro sérico, e demais cofatores, em equinos atletas. Procurando, desta forma, traçar uma linha direta e consequencial entre a atividade física e as possíveis adaptações fisiológicas do ferro, sobre a forma de alterações na sua concentração impostas pela mesma, num cenário pratico e real.

Este estudo focou-se especificamente em atletas de *dressage*, em início de carreira, e o programa de treino foi protocolizado sobre a forma de um Teste de Simulação de Dressage (TSD) realizado especificamente em época de pré competição.

É um dos objetivos e requerimento necessário deste estudo criar no atleta uma resposta fisiológica de esforço e adaptação física face ao nível de atividade imposta pelo TSD por forma a que os mesmos façam uso pleno das suas capacidades físicas, culminando no desencadear de um estado de stress fisiológico que por sua vez produza uma resposta adaptativa no organismo face ao esforço imposto, mais especificamente no ferro e restantes variáveis em estudo. E, tendo esse fator em vista, é o intuito deste estudo verificar se existe uma relação direta entre possíveis variações observadas nas concentrações do ferro sérico, e demais cofatores, face ao estímulo criado.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Oito equinos Puro Sangue Lusitano foram selecionados para o estudo, considerados saudáveis após exame médico veterinário. Todos os animais eram do sexo masculino, garanhões, nascidos no mesmo ano (idade média de quatro anos) e peso médio de 473,9±44,0 kg.

Os animais selecionados tinham a mesma proveniência e pertenciam a uma coudelaria localizada em Caneças, Portugal (38°49'12.2"N 9°13'16.5"W), estando por isso sujeitos às mesmas condições de manejo aquando da realização do estudo. Assim, a alimentação, o alojamento, as práticas de limpeza e de saneamento, a escola (método de criação e introdução no desporto) e os regimes de treino eram similares. Os animais encontravam-se alojados em boxes individuais (4,0x3,5m) e a sua alimentação consistia em feno de azevém, o qual era fornecido duas vezes ao dia em quantidade adequada às necessidades individuais do equino, com base no seu peso, condição corporal e nível de esforço físico realizado. Adicionalmente era fornecido alimento composto na proporção de 1% do peso corporal, o qual era dividido em três porções diárias (9h, 12h30 e às 18h) e era constituído por 13% de proteína bruta. Todos os animais tinham água *ad libitum*.

Os cavalos encontravam-se em atividade física e realizavam treinos regulares há pelo menos seis meses. Nas seis semanas prévias à realização do presente estudo o treino destes animais consistiu num protocolo de pré-competição com vista ao condicionamento e preparação dos atletas para futuras competições, o qual foi formulado e ajustado às necessidades de cada animal. Os cavalos eram trabalhados seis vezes por semana e o seu treino englobava ações de manejo, trabalho à guia, trabalho “à mão” e trabalho montado, sendo este último realizado sempre pelo mesmo cavaleiro.

Como referido anteriormente, todos os cavalos eram atletas de *dressage* em início de carreira, tendo sido considerados saudáveis após realização de exame físico prévio por um médico veterinário, o qual incluiu um exame músculo-esquelético (Reed *et al.* 2018). Animais que apresentassem sinais de doença seriam excluídos do trabalho. Na tabela 1 encontram-se resumidos os parâmetros de inclusão no estudo.

Tabela 1. Parâmetros de inclusão no presente estudo

Atitude	Alerta e responsivo
Condição corporal	3/5
Mucosas	Rosadas e húmidas
Tempo de repleção capilar	≤2s
Frequência respiratória em repouso	8-16 (rpm)
Frequência cardíaca em repouso	24-44 (bpm)
Temperatura Corporal	37.5-38. 5(°C)
Grau de claudicação (escala AAEP)	0/5

2.2. Teste de simulação de dressage

Os animais foram submetidos a um teste de simulação de exercício a campo específico para a modalidade de *dressage* (TSD), protocolado pela equipa de investigação. O teste foi idealizado tendo em conta o nível de treino dos animais e os regulamentos da Federação Equestre Internacional referentes a esta modalidade equestre. O teste foi executado num picadeiro coberto com as dimensões de 15mx30m. Os animais foram primeiramente submetidos a um período de aquecimento à guia para preparação física prévia (aquecimento) ao TSD durante 20 minutos sem cavaleiro, seguida de 15 minutos montados em regime livre. Assim, o período de aquecimento teve uma duração aproximada de 35 minutos. O TSD, propriamente dito, teve uma duração média de 5 minutos ($\pm 32,6$ seg), tendo os animais sido sujeitos a uma sequência de movimentos desenhado especificamente para simular o regime de competição. A sequência de exercícios e as suas respectivas diretrizes estão descritas na tabela 2 e figura 4.

Tabela 2. Sequência de exercícios do teste de simulação de *dressage*

N	LETRA	EXERCÍCIO	DIRECTRIZES/ IDEIA CENTRAL
1	A	Entrada	Retitude, transição
2	X	Paragem	Estabilidade do conjunto de frente (nuca), a paragem
3	X	Sair a trote de trabalho sentado	Transição, Retitude
4	C	Pista para a direita	Encurvação, equilíbrio
5	M-X-K	Diagonal com algumas passadas a trote médio	Ritmo e cadência
6	K	Trote de trabalho	Transição
7	K-A-F	Trote de trabalho levantado	Ritmo e equilíbrio
8	F-M	Trote de trabalho sentado com algumas passadas concentrando o trote	Transição progressiva, equilíbrio e ritmo
9	C	Linha do meio	Encurvação, equilíbrio
10	C-A	Serpentina de 3 arcos a trote levantado	Regularidade, ritmo e retitude
11	A	trote sentado e Pista para a direita	Manutenção do ritmo e encurvação
12	K-H	trote de trabalho sentado com algumas passadas concentrando o trote	Transição progressiva, equilíbrio e ritmo
13	C	Linha do meio	Encurvação, equilíbrio
14	C-A	Serpentina de 3 arcos a trote sentado	Regularidade, ritmo e retitude
15	A	Pista para a esquerda	Encurvação, equilíbrio
16	F-X-H	Algumas passadas a trote médio	Regularidade, ritmo e retitude
17	C	passo médio	Transição, regularidade (fluidez)
18	C-B	passo médio	Ritmo, regularidade e retitude (transições entre amplitudes)
19	B-K-A-F	passo concentrado	
20	F-H	passo largo	
21	H	passo médio	
22	C	Transição ao trote e círculo de 15m	Retitude, ritmo
23	M-F-A-K	Galope de trabalho	Transição
24	K-M	Algumas passadas a galope médio	Transição, ritmo
25	Antes de M	transição ao trote	Transição, ritmo
26	C-E-A	Passo médio	Transição, ritmo e retitude
27	A	transição ao trote e círculo de 15m	Retitude, ritmo
28	F-M-C-H	Galope de trabalho	Transição
29	H-F	Algumas passadas a galope médio	Transição, ritmo
30	F-A	Galope ao revés	Ritmo, equilíbrio, regularidade
31	A	Paragem e imobilidade 4seg	Paragem, estabilidade, submissão
32	A	Trote sentado e círculo de 15m a direita	Retitude, ritmo
33	K-B	Diagonal a trote de trabalho	Retitude, ritmo
34	C	Círculo de 15 metros a esquerda	Retitude, ritmo
35	H-K-A	Trote de trabalho	Transição, ritmo
36	A	Linha do meio	Encurvação, equilíbrio
37	X	Paragem e finalização	Estabilidade do conjunto de frente (nuca), a paragem

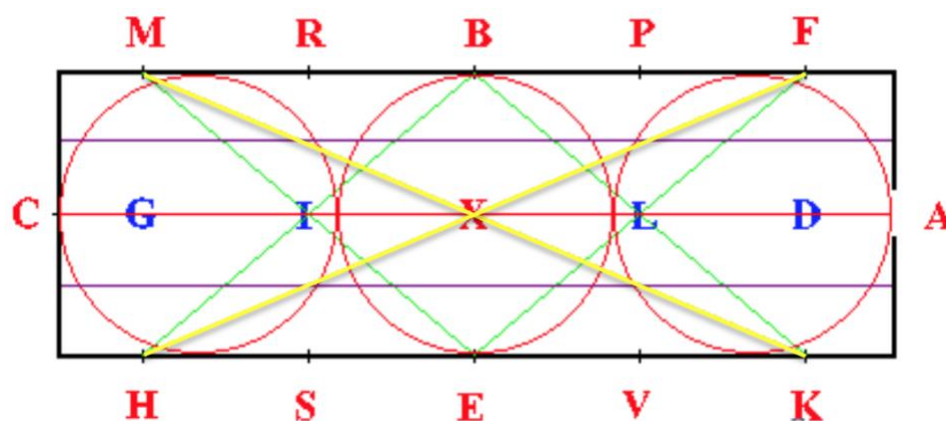


Figura 4. Mapa do recinto desportivo e diretrizes que representam esquematicamente o percurso realizado pelos cavalos durante o teste de simulação de *dressage*

O protocolo de exercício foi realizado no mês de Setembro entre as 7:00 e as 11:00 da manhã, sendo registada uma temperatura média de 19,7°C e uma humidade relativa de 83,8%. Todos os cavalos foram montados pelo mesmo cavaleiro e a pista de areia encontrava-se seca.

2.3. Monitorização cardíaca

Durante o exercício os animais utilizaram um monitor cardíaco (M430/H10, Polar Electro, Lake Success, NY, EUA) com sistema de GPS, que permitiu a recolha de informação sobre a frequência cardíaca e velocidade dos animais durante o TSD.

Após oTSD, os dados recolhidos foram transferidos para o computador e analisados com recurso ao Polar Flow Software para determinação da velocidade (média e máxima), frequência cardíaca (máxima e média) e distância percorrida.

2.4. Recolha de dados e processamento das amostras

As amostras de sangue foram recolhidas em três períodos temporais distintos, em repouso (T0), imediatamente após o exercício (T1) e aos 240 minutos de recuperação pós-TSD (T2), tendo sido obtidas assepticamente através da punção da veia jugular com recurso a agulhas hipodérmicas

descartáveis de 25x0,9 mm, no sistema de pressão negativa em tubos com capacidade de 4 ml com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para a obtenção de plasma, e tubos com capacidade de 9 ml com gel separador para obtenção de soro.

Todas as amostras foram enviadas, sob refrigeração, para o Laboratório Clínico Veterinário da FMV-ULusófona, com um intervalo médio de 2 a 4 horas entre as colheitas de sangue e o processamento laboratorial. As amostras obtidas nos tubos com gel separador foram centrifugadas por 10 minutos a 2.000g (Hettich Universal 320 R) para separação de soro e congeladas em *eppendorfs* a -80°C (PHCbi Ultra-Low Temperature Freezer MDF-DU502VH) para posterior medição do ferro sérico (Fe), da capacidade de fixação do ferro (TIBC) e cálculo do índice de saturação da transferrina. Estas amostras foram utilizadas para a determinação do ferro sérico e da capacidade de fixação do ferro (TIBC), com recurso ao equipamento DxC 700 AU da Beckman Coulter, mas através de técnicas diferentes, o ferro sérico por método colorimétrico e a transferrina por turbidimetria. O percentual de saturação da transferrina sérica (IST) foi calculada seguindo fórmula descrita por Smith (1997):

$$IST = Fe/TIBC \times 100$$

Para a determinação da concentração de hemoglobina, as amostras acondicionadas em tubos de EDTA foram processadas com o analisador hematológico Procyte Dx da IDEXX.

Paralelamente à recolha das amostras, em T0, T1 e T2 procedeu-se, também ao exame físico completo dos animais, de modo a registar a frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal retal, e assim aferir a resposta dos animais ao TSD.

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software PROC MIXED program (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, North Caroline, EUA). A normalidade das variáveis foi avaliada a partir do teste de Kolmogorov-Smirnov, e A influencia do exercício foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, e as médias foram comparadas através do teste de Tuckey.

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ desvios-padrão e a significância estabelecida em $p < 0,05$ em todos os casos. Foram também analisados e constam os dados descritivos das frequências cardíaca média e pico, incluindo os respectivos desvios padrão, assim como das velocidades média e pico, também com os respectivos desvios padrão.

3. Resultados

Os valores registados de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura corporal média (TC) em T0, T1 e T2, encontram-se apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros Físicos (médias $\pm$ desvios-padrão) dos equinos submetidos ao TSD

Parâmetros	Tempos de análise			
	T0	T1	T2	p
FC (bpm)	28,9 $\pm$ 4,5 ^b	71,0 $\pm$ 14,8 ^a	38,1 $\pm$ 11,8 ^b	<0,0001
FR (rpm)	19,1 $\pm$ 9,9 ^b	72,3 $\pm$ 28,7 ^a	21,1 $\pm$ 4,1 ^b	0,0001
TC (°C)	37,2 $\pm$ 0,5	37,6 $\pm$ 0,4	37,1 $\pm$ 0,7	0,2143

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas na análise pelo tempo de coleta, via o Teste de Tukey ($p \leq 0,05$); T0-reposo; T1-imediatamente após o exercício; T2-com 240min de recuperação; FC-Frequência Cardíaca; FR-Frequência Respiratória; TC-Temperatura Corporal.

Pode se verificar uma influência notória do exercício na FC e FR, sendo observável um aumento destes valores imediatamente após o TSD, que corresponde ao pico da atividade física (T1), verificando-se ainda recuperação dos valores basais em T2, onde o organismo procurou restabelecer os valores padrão fisiológicos.

Os dados referentes à monitorização cardíaca e velocidade dos cavalos durante o TSD encontram-se detalhados na tabela 4, onde podem ser observados os valores referentes às frequências cardíaca pico e média, assim como os valores de velocidade pico e média. Algo que traduz de certa forma o pico de esforço físico obtido durante o exercício e comprova a rentabilidade

e objetivo do mesmo em criar uma resposta de stress desportivo ao atleta, procurando criar no mesmo uma necessidade de incremento e adaptação à tarefa física imposta.

Tabela 4. Dados registados pelo sistema PolarSync nos equinos submetidos ao teste de simulação de *dressage*

Parâmetros	Valores
FC pico (bpm)	150,9 ± 39,3
FC média (bpm)	108,6 ± 24,5
V pico (m/s)	7,36 ± 1,15 ^a
V média (m/s)	2,31 ± 0,70

Nota: FC pico-Pico de Frequência Cardíaca; FC média-Frequência Cardíaca média; V pico- Velocidade pico; V média- Velocidade média

Finalmente, na tabela 5, encontram-se os valores obtidos para as variáveis chave, que nos permite entender o comportamento do metabolismo do ferro sérico no quadro de *stress* desportivo imposto pelo exercício realizado.

Tabela 5. Perfil do metabolismo férrico (médias±desvios-padrão) dos equinos submetidos ao teste de simulação de *dressage*

Parâmetros	Tempos de análise			
	T0	T1	T2	p
Fe (µg/dl)	166,0 ± 32,5 ^a	164,1 ± 40,9 ^{ab}	153,3 ± 35,6 ^b	0,0380
TIBC (µg/dl)	358,8 ± 24,3	352,6 ± 34,2	344,6 ± 33,3	0,0577
IST (%)	46,3 ± 8,4	46,3 ± 8,9	44,3 ± 7,9	0,1591
Hb (g/dl)	12,86 ± 0,81	13,08 ± 1,26	12,43 ± 0,87	0,0568

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas na análise pelo tempo de coleta, via o Teste de Tukey ($p \leq 0,05$); T0-reposo; T1-imediatamente após o exercício; T2-com 240min de recuperação; Fe-ferro sérico; TIBC-capacidade de fixação do ferro; IST-Índice de saturação da transferrina; Hb-concentração de hemoglobina no sangue.

Foi possível observar uma diminuição contínua das concentrações do ferro sérico como resposta ao estímulo desportivo, diminuição essa que progrediu de forma gradual, independentemente do cessar da atividade física, prolongando-se durante todo o período de recuperação registado (T2). Os parâmetros TIBC, IST e Hb não apresentaram diferenças significativas nas suas médias em resposta ao exercício físico. No entanto, verificou-se que os valores TIBC seguiram uma evolução paralela e idêntica à do ferro sérico. E, embora não significativo, registou-se um aumento do valor médio de Hb em T1, regressando a valores basais pré-exercício em T2.

4. Discussão

Este trabalho permitiu avaliar no atleta a resposta fisiológica ao esforço e a adaptação física face ao nível de atividade imposta pelo TSD e, desta forma, incutir no seu organismo uma resposta adaptativa que culminasse em possíveis alterações fisiológicas no comportamento do ferro sérico e demais biomarcadores em estudo.

A confirmação de que este mesmo esforço e trabalho foi realizado por parte dos atletas passou por verificar que determinadas metas de parâmetros fisiológicos foram atingidas, mais especificamente os valores de frequência cardíaca média, frequência cardíaca pico e, até certo ponto, a frequência respiratória média e, com menor importância, os valores de velocidade média dos movimentos e velocidade pico.

Um estudo realizado por Williams *et al.*, procurou perceber quais os valores de frequência cardíaca média e pico demonstrados em regime de competição, no desporto de *dressage*, e traçar um intervalo base que pudesse refletir valores esperados dentro de um regime de alta performance, em que os animais se encontram dentro do limiar máximo das suas capacidades física e desportiva. Trinta e cinco cavalos, atletas de *dressage*, com uma idade média de $10 \pm 2,5$ anos, atletas dentro do círculo desportivo da Federação Equestre Britânica foram utilizados neste estudo e os resultados foram obtidos em prova oficial. Os investigadores chegaram à conclusão de que a diferença de valores entre o período de aquecimento e prova não era significativo e que os animais já se encontrariam dentro dos valores ótimos mesmo antes de entrarem em prova, mantendo-os uniformes até à conclusão da mesma. Dentro do regime de prova, e já contabilizando o

aquecimento prévio, os animais foram sujeitos a um período de $31,3 \pm 15,5$ minutos de atividade física. Os valores finais de frequência cardíaca média e pico registados foram de 102 ± 13 bpm e 132 ± 20 bpm respetivamente, para o escalão elementar de competição, e de 107 ± 8 bpm e 132 ± 10 bpm respetivamente, para o escalão médio (Williams & Chandler, 2009).

Desta forma, e utilizando este estudo como referência podemos comprovar que os animais sujeitos ao nosso protocolo de atividade física, sobe a forma do TSD (que possuiu características protocolares muito semelhantes às utilizadas no estudo de Williams *et al.*) atingiram os valores considerados ótimos, no que diz respeito ao pico de esforço e trabalho imposto pela atividade em questão, tendo feito uso máximo das suas capacidades físicas e aptidão atlética para completar o mesmo. Tendo sido registada uma frequência cardíaca média de $108,6 \pm 24,5$ bpm e frequência cardíaca pico de $150,9 \pm 39,3$ bpm, o que os situa ligeiramente acima do considerado expectável dentro do ambiente de competição de nível médio. Contudo, os PSL da população estudada encontravam-se em início de trabalho e preparação para a modalidade de *dressage*, pelo que podemos ainda concluir que estes animais possuíam uma boa preparação física.

Adicionalmente os resultados obtidos demonstraram que os valores de FC e FR foram influenciados pelo exercício físico, o que atesta novamente a preparação física dos animais uma vez que estes valores, aos 240 minutos de recuperação, regressaram a níveis muito semelhantes aos valores medidos em repouso. Por outro lado, o valor da temperatura corporal média não variou significativamente em função do exercício físico, pelo que é possível concluir que os mecanismos de dissipação de calor dos animais foram capazes de compensar o calor gerado durante o TSD, mantendo a homeostasia dos cavalos (Kang et al., 2023), e que as condições climatéricas (temperatura e humidade relativa) não colocaram em causa o bem-estar dos animais.

No que diz respeito aos valores séricos do ferro, observou-se uma diminuição significativa em T1, que se prolongou e evoluiu gradualmente durante todo o período de repouso, tendo sido feita uma última medição na marca dos 240 min. de repouso (T2). Considerando que o nível fisiológico de cada animal, registado no pré-TSD (T0), encontrava-se na marca dos $166,0 \pm 32,5$ µg/dl, observou-se uma diminuição do mesmo em cerca de 8%, encontrando-se na marca dos $153,3 \pm 35,6$ µg/dl no último momento de registo (T2). Este comportamento do ferro poderá ser explicado pelo desencadear de um processo inflamatório induzido pelo exercício, sendo mediado pelo mecanismo da hepcidina, que por sua vez é despoletado pela sinalização de mediadores pró-inflamatórios em circulação (IL-6, de maior interesse) e que se irá manter inalterado até que o

estímulo inflamatório desapareça por completo (Divers *et al.* 2007). Sabendo que o ferro se trata de um marcador altamente precoce nesta mesma sinalização, a sua diminuição ao nível de T1, não só evidencia uma relação direta, a qual é suportada pelos resultados obtidos, entre o exercício realizado e o comportamento do ferro em circulação, mas também poderá levantar a hipótese de um possível mecanismo inflamatório decorrente, que engloba o mecanismo da hepcidina, algo que poderá vir a ser analisado num próximo estudo, em sequência ao presente. Contudo, é importante referir que este estudo apenas visou possíveis alterações fisiológicas no ferro induzidas pela atividade física dentro do período de tempo estabelecido para a mesma, sob a forma do TSD. Assim, tendo este fator em conta, foi possível observar que o exercício físico teve uma influência significativa nas concentrações do ferro sérico medidas na população estudada.

No entanto, para podermos avaliar e corroborar o valor do ferro sérico enquanto biomarcador inflamatório teríamos de avaliar outras variáveis, como por exemplo um leucograma, assim como alargar os momentos temporais de recolha de dados, uma vez que este estudo contemplou um período precoce do processo inflamatório, tendo sido obtido o último registo na marca das 4h de repouso (T2). Por forma a perceber melhor toda a extensão do processo, seria interessante avaliar esta mesma resposta dentro do intervalo das 24-48h pós TSD, com especial atenção para o período das 6 a 8h de recuperação, por forma a traçar uma linha temporal que permitisse caracterizar toda a resposta inflamatória e de recuperação/adaptação a que os animais estiveram sujeitos após o TSD (Plisak *et al.*, 2023), um tema interessante de ser explorado numa possível continuação deste estudo, num futuro próximo.

Para entender as alterações do ferro de uma forma mais sistemática, num panorama fisiológico integrado, foram também avaliadas as alterações concomitantes de outros biomarcadores, nomeadamente da capacidade de fixação do ferro (TIBC) e do índice de saturação da transferrina (IST).

Face a uma diminuição dos níveis de ferro seria de esperar um decréscimo nos valores da TIBC acompanhado por valores de IST normais ou igualmente diminuídos por forma a consolidar a significância desta diminuição observada. No entanto, no presente trabalho não se observaram diferenças significativas entre as médias de ambos os biomarcadores nos distintos períodos temporais. Não obstante, verificou-se que simultaneamente ao decréscimo dos valores do ferro sérico, ocorreu um decréscimo gradual, em cerca de 4%, nos valores da TIBC, que teve o seu início no período imediatamente após o TSD (T1) e que se prolongou até à última medição na marca das

4h de repouso (T2). Por outro lado, no IST o decréscimo registado foi menos pronunciado, tendo este diminuído em cerca de dois valores percentuais.

Apesar de não significativo, o decréscimo observado nos cofatores do ferro sérico em estudo, consolidam a importância e significado das variações observadas na nossa variável de maior relevância (ferro). A tendência observada da diminuição das médias registadas da TIBC e do IST apontam para o despoletar de um mecanismo fisiológico de adaptação a estados de hipoferremia transitória no organismo que, por sua vez, corroboram a hipótese de que o exercício imposto aos atletas pelo nosso protocolo teve uma relação direta na variação dos níveis de ferro sanguíneos fisiológicos dos mesmos (Elsayed *et al.* 2016).

Por último, e não menos importante, foram também analisados os valores de hemoglobina em circulação. Esta variável permite-nos avaliar duas componentes distintas altamente relevantes no estudo, nomeadamente o nível de esforço imposto ao atleta equino e a inexistência de um estado de hipoferremia fisiológico prévio não relacionado com o programa de exercício imposto (Mazan, 2022).

Antes de poder correlacionar um possível fenómeno de hipoferremia transitória condicionada pelo estímulo da atividade física, temos primeiro de verificar que o animal não possui qualquer deficiência em ferro fisiológica prévia à realização do TSD. Desta forma, é importante ter em conta que uma deficiência de ferro absoluta, alheia ao programa de exercício, culminaria no desencadear de uma anemia ferropénica que, por sua vez teria um impacto direto nos valores de hemoglobina em circulação (Walton et al. 2021). Previamente ao TSD, em T0, todos os animais demonstraram valores de hemoglobina fisiologicamente normais (T0; $12,86 \pm 0,81$) o que refuta por completo a veracidade desse mesmo cenário. Por outro lado, é também importante ter em conta que face a um esforço físico intenso, algo que o TSD procurou estimular, seria expectável ocorrer algum tipo de aumento na concentração de hemoglobina em circulação, como mecanismo direto de compensação e adaptação ao mesmo, uma característica única nos equinos, através do fenómeno da contração esplénica que liberta volumes variáveis de eritrócitos do baço para cobrir as necessidades de consumo de oxigénio impostas pelo metabolismo aeróbico exacerbado (McMiken, 1983). Como expectável foi observado um aumento pronunciado nos valores de hemoglobina imediatamente após o TSD (T1), face aos valores basais previamente registados no repouso (T0), contabilizando um acréscimo de cerca de 2% na concentração total de hemoglobina em circulação, que regressou aos valores basais às 4h de recuperação (T2). Assim, esta variação

poderá ser atribuída exclusivamente à componente do esforço físico imposto pelo TSD e consequente da contração esplénica.

Não obstante é importante relembrar que os resultados obtidos representam apenas uma das várias modalidades desportivas equestres existentes. Adicionalmente, o tipo de atividade física desenvolvida pelo atleta equino durante a prática de *dressage* caracteriza-se por movimento amplo, mas concentrado, em que o atleta se tende a manter dentro do limiar aeróbico. Assim, apenas extrapolar o perfil e dimensão das alterações no Fe observadas para o panorama e perfil atlético dos animais que nesta se inserem. Ainda, o tamanho da amostra poderá ter tido influência nos resultados obtidos. Neste sentido será pertinente estudar o comportamento dos biomarcadores avaliados no presente trabalho em populações de atletas de outras modalidades com o número de indivíduos superior.

Este trabalho procurou evidenciar as variações do Fe face ao estímulo providenciado pela prática de *dressage*, com o intuito de demonstrar uma relação direta e consequential perante um cenário desportivo prático e real, algo que foi evidenciado e corroborado pelos resultados obtidos.

5. Conclusão

O estudo realizado trata-se de um evento de caráter académico e científico pioneiro dentro do desporto da *dressage* e especificamente para o cavalo Puro Sangue Lusitano (PSL), enquanto atleta do mesmo. O estudo procurou traçar uma linha direta e consequential entre o exercício e o comportamento fisiológico do Fe, e demais cofatores, através da simulação a campo de uma prova de *dressage*.

Os resultados obtidos demonstraram uma íntima relação entre o Fe e a atividade desportiva, tendo sido observadas diferenças significativas nas suas concentrações séricas em resposta ao exercício. Contudo, não foram observadas diferenças no IST, na TIBC e na Hb. Assim, o Fe poderá ser um biomarcador interessante para de futuro avaliar o desempenho e condicionamento físico de atletas equinos.

Assim, tendo em conta os resultados promissores do presente estudo, seria extremamente interessante procurar verificar se num cenário de alta competição, com um número de animais mais alargado, englobando outras modalidades desportivas equestres, se Fe mantém o comportamento aqui descrito. A variabilidade nas capacidades e aptidões destes mesmos atletas

aliada ao seu perfil fisiológico único que lhes permite vingar no desporto do qual fazem parte com certeza evidenciaria variações interessantes na forma que os mesmos respondem e se adaptam ao dano, inflamação e recuperação desencadeados no seu organismo como resposta que, por sua vez, iria traduzir-se diretamente em perfis fisiológicos únicos no metabolismo e comportamento do ferro e respetivos cofatores, algo que muito provavelmente também contribuirá para o sucesso e aptidão que obtêm enquanto atletas de topo.

IV. Bibliografia

McMiken, D. F. (1983). An energetic basis of equine performance. *Equine Veterinary Journal*, 15, 123–133. doi:10.1111/j.2042-3306.1983.tb01734.

Theelen, M. J. P., Beukers, M., Grinwis, G. C. M., & van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. S. (2019). Chronic iron overload causing haemochromatosis and hepatopathy in 21 horses and one donkey. *Equine Veterinary Journal*, 51, 304–309. doi:10.1111/evj.13029.

Peeling, P. (2010). Exercise as a mediator of hepcidin activity in athletes. *European Journal of Applied Physiology*, Vol. 110, pp. 877–883. doi:10.1007/s00421-010-1594-4.

Peeling, P., Dawson, B., Goodman, C., Landers, G., Wiegerinck, E. T., Swinkels, D. W., & Trinder, D. (2009). Cumulative effects of consecutive running sessions on hemolysis, inflammation and hepcidin activity. *European Journal of Applied Physiology*, 106, 51–59. doi:10.1007/s00421-009-0988-7.

Davidson, R. J. L., Robertson, J. D., Galea, G., & Maughan, R. J. (1987). Hematologicat Changes Associated with Marathon Running. *J. Sports Med*, Vol. 8, pp. 19–25. Georg Thieme Verlag.

Schwarz, B. C., van den Hoven, R., & Schwendenwein, I. (1 2012). Diagnostic value of the neutrophil myeloperoxidase index in horses with systemic inflammation. *Veterinary Journal*, 191, 72–78. doi:10.1016/j.tvjl.2010.12.010.

Moon, M. K., Cho, B. J., Lee, Y. J., Choi, S. H., Lim, S., Park, K. S., ... Jang, H. C. (2012). The effects of chronic exercise on the inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are different with age. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 37, 631–636. doi:10.1139/H2012-039.

Mukai, K., Takahashi, T., Eto, D., Ohmura, H., Tsubone, H., & Hiraga, A. (2007). Heart Rates and Blood Lactate Response in Thoroughbred Horses during a Race. *J. Equine Sci*, Vol. 18, pp. 153–160.

Theurl, I., Aigner, E., Theurl, M., Nairz, M., Seifert, M., Schroll, A., Weiss, G. (2009). Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: Diagnostic and therapeutic implications. *Blood*, 113, 5277–5286. doi:10.1182/blood-2008-12-195651.

Crisman, M. V., Scarratt, W. K., & Zimmerman, K. L. (2008). Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, Vol. 24, pp. 285–297. doi:10.1016/j.cveq.2008.03.004.

Plisak, U., Szczepaniak, J., Żmigrodzka, M., Giercuskiewicz-Hecold, B., & Witkowska-Piłaszewicz, O. (2023). Changes in novel anti-inflammatory cytokine concentration in the blood of endurance and race horses at different levels of training. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 418–424. doi:10.1016/j.csbj.2022.12.016.

Arfuso, F., Giannetto, C., Fazio, F., Panzera, F., & Piccione, G. (2020). Training Program Intensity Induces an Acute Phase Response in Clinically Healthy Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 88. doi:10.1016/j.jevs.2020.102986.

Moreira, A. C., Mesquita, G., & Gomes, M. S. (2020). Ferritin: An inflammatory player keeping iron at the core of pathogen-host interactions. *Microorganisms*, Vol. 8. doi:10.3390/microorganisms8040589.

Hinton, P. S. (2014). Iron and the endurance athlete. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, Vol. 39, pp. 1012–1018. doi:10.1139/apnm-2014-0147.

Cywinska, A., Szarska, E., Kowalska, A., Ostaszewski, P., & Schollenberger, A. (2011). Gender differences in exercise - induced intravascular haemolysis during race training in thoroughbred horses. *Research in Veterinary Science*, 90, 133–137. doi:10.1016/j.rvsc.2010.05.004.

Alkhateeb, A. A., & Connor, J. R. (2013). The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, Vol. 1836, pp. 245–254. doi:10.1016/j.bbcan.2013.07.002.

Corradini, I., Armengou, L., Viu, J., Rodríguez-Pozo, M. L., Cesarini, C., & Jose-Cunilleras, E. (2014). Parallel testing of plasma iron and fibrinogen concentrations to detect systemic inflammation in hospitalized horses. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, 2001)*, 24, 414–420. doi:10.1111/vec.12189.

Kellon, E. M., & Gustafson, K. M. (2019). Possible dysmetabolic hyperferritinemia in hyperinsulinemic horses. *Open Veterinary Journal*, 9, 287–293. doi:10.4314/ovj.v9i4.2.

Liburt, N. R., Adams, A. A., Betancourt, A., Horohov, D. W., & McKeever, K. H. (2010). Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. *Equine Veterinary Journal*, 42, 280–288. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00275.

Borges, A. S., Divers, T. J., Stokol, T., & Mohammed, O. H. (2007). Serum Iron and Plasma Fibrinogen Concentrations as Indicators of Systemic Inflammatory Diseases in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 489–494. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb02995.

Hale, J. N., Hughes, K. J., Hall, S., & Labens, R. (2023). The effect of exercise on cytokine concentration in equine autologous conditioned serum. *Equine Veterinary Journal*, 55, 551–556. doi:10.1111/evj.13586.

Macnicol, J. L., Michael, X., Lindinger, I., & Pearson, W. (2018). A time-course evaluation of inflammatory and oxidative markers following high-intensity exercise in horses: a pilot study. *J Appl Physiol*, 124, 860–865. doi:10.1152/japplphysiol.00461.2017.

Barrey, E., Desliens, F., Poiriel, D., Biau, S., Lemaire, S., Rivero, J. L., & Langlois, B. (2002). Early evaluation of dressage ability in different breeds. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 319–324. doi:10.1111/j.2042-3306.2002.tb05440.

Scoppetta, F., Tartaglia, M., Renzone, G., Avellini, L., Gaiti, A., Scaloni, A., & Chiaradia, E. (2012). Plasma protein changes in horse after prolonged physical exercise: A proteomic study. *Journal of Proteomics*, 75, 4494–4504. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.014.

Williams, R. J., & Chandler, R. E. (2009). Heart rates of horses during competitive dressage. *Comparative Exercise Physiology*, 6, 7–15. doi:10.1017/S1478061509303679.

Bond, S. L., Greco-Otto, P., Sides, R., Kwong, G. P. S., Léguillette, R., & Bayly, W. M. (2019). First published February 14. *J Appl Physiol*, 126, 1390–1398. doi:10.1152/japplphysiol.00983.2018.

Elsayed, M. E., Sharif, M. U., & Stack, A. G. (2016). *Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker*. doi:10.1016/bs.acc.2016.03.002.

Beard, J. L. (2001). *Iron-Deficiency Anemia: Reexamining the Nature and Magnitude of the Public Health Problem Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning* 1,2. Retrieved from <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/131/2/568S/4686826>.

Rubeor, A., Goojha, C., Manning, J., & White, J. (2018). Does Iron Supplementation Improve Performance in Iron-Deficient Nonanemic Athletes? *Sports Health*, Vol. 10, pp. 400–405. doi:10.1177/1941738118777488.

Rowland, T. (2012). Iron Deficiency in Athletes: An Update. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 6, 319–327. doi:10.1177/1559827611431541.

Sim, M., Garvican-Lewis, L. A., Cox, G. R., Govus, A., McKay, A. K. A., Stellingwerff, T., & Peeling, P. (2019). Iron considerations for the athlete: a narrative review. *European Journal of Applied Physiology*, Vol. 119, pp. 1463–1478. doi:10.1007/s00421-019-04157.

George, L. S., Clayton, H. M., Sinclair, J., Richards, J., Roy, S. H., & Hobbs, S. J. (2021). Muscle function and kinematics during submaximal equine jumping: What can objective outcomes tell us about athletic performance indicators? *Animals*, Vol. 11, pp. 1–26. doi:10.3390/ani11020414.

Andriichuk, A., Tkachenko, H., & Tkachova, I. (2016). Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes Before and After Exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*, 36, 32–43. doi:10.1016/j.jevs.2015.09.011.

Chung, C.M., & McKenzie, H. A. (1985). Studies on equine transferrin-i. the isolation and partial characterization of the d and r variants. *Biochemistry and Physiology* Vol. 8011.

Geor, R. J. (2006). The role of nutritional supplements and feeding strategies in equine athletic performance. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 3, 109–119. doi:10.1017/ecp200690.

Burden, R. J., Pollock, N., Whyte, G. P., Richards, T., Moore, B., Busbridge, M., Pedlar, C. R. (2015). Effect of intravenous iron on aerobic capacity and iron metabolism in elite athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 47, 1399–1407. doi:10.1249/MSS.0000000000000568.

Long, A., & Nolen-Walston, R. (2020). Equine Inflammatory Markers in the Twenty-First Century: A Focus on Serum Amyloid A. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, Vol. 36, pp. 147–160. doi:10.1016/j.cveq.2019.12.005.

Crisman, M. V., Scarratt, W. K., & Zimmerman, K. L. (2008). Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, Vol. 24, pp. 285–297. doi:10.1016/j.cveq.2008.03.004.

Tugirimana PL, De Clercq D, Holderbeke AL, Kint JA, De Cooman L, Deprez P, Delanghe JR. A functional turbidimetric method to determine C-reactive protein in horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011 Mar;23(2):308-11. doi: 10.1177/104063871102300217. PMID: 21398452.

Melissa Mazan, Equine exercise physiology—challenges to the respiratory system. *Animal Frontiers*, Volume 12, Issue 3, June 2022, Pages 15–24, <https://doi.org/10.1093/af/vfac035>.

Kang H, Zsoldos RR, Sole-Guitart A, Narayan E, Cawdell-Smith AJ, Gaughan JB. Heat stress in horses: a literature review. *International Journal of Biometeorology*. 2023 Jun;67(6):957-973. doi: 10.1007/s00484-023-02467-7. Epub 2023 Apr 15. PMID: 37060454; PMCID: PMC10267279.

Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *Journal of General Internal Medicine* 1992 Mar-Apr;7(2):145-53. doi: 10.1007/BF02598003. Erratum in: *J Gen Intern Med* 1992 Jul-Aug;7(4):423. PMID: 1487761.

Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *New England Journal of Medicine*. 2015 May 7;372(19):1832-43. doi: 10.1056/NEJMra1401038. PMID: 25946282.

Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I; British Committee for Standards in Haematology. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *British Journal of Haematology*. 2013 Jun;161(5):639-648. doi: 10.1111/bjh.12311. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23573815.

N.M. Alexander, Iron, in: H. Seiler, A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, Taylor & Francis, New York, United States, 1994, pp. 411–421.

Reed S. M. Bayly W. M. & Sellon D. C. (2018). *Equine internal medicine (Fourth)*. Elsevier. Retrieved, September, 19, 2023, from <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=1623808>.

V. Apêndices

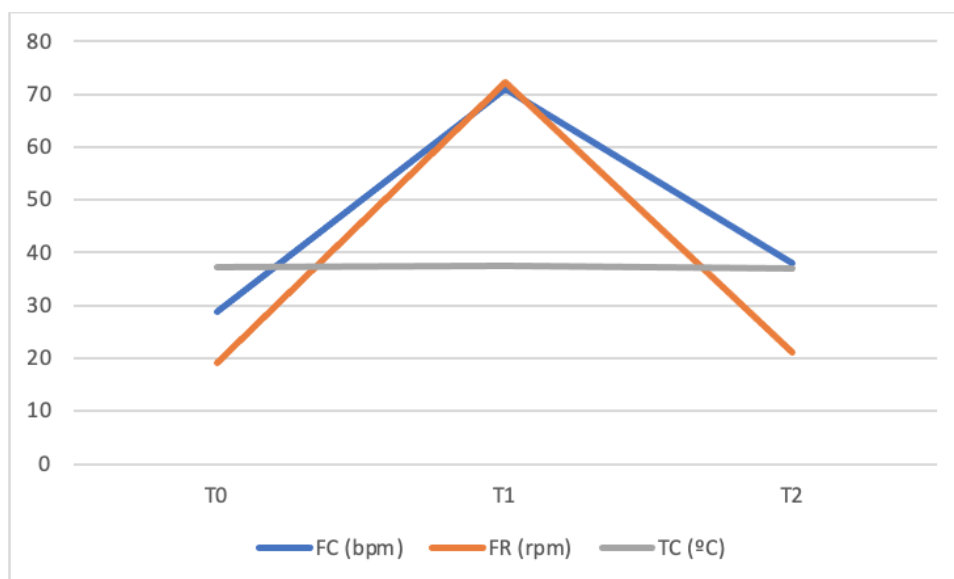


Figura 5. Evolução dos Parâmetros Físicos registados no tempo

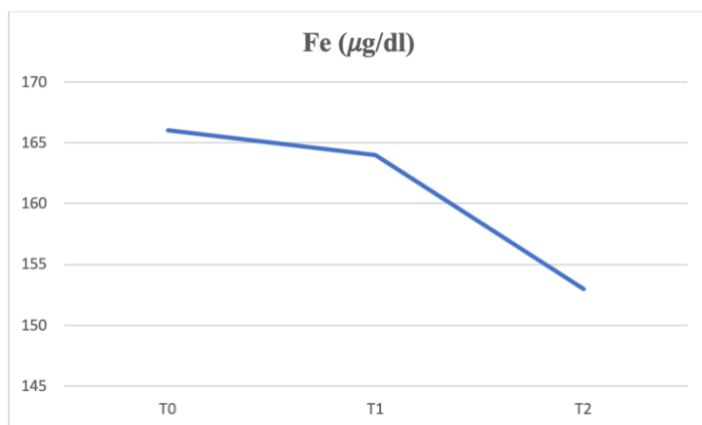


Fig 6.1. Evolução da variável Fe (ferro sérico) ao longo dos períodos temporais (T0-reposou; T1-imediatamente após o exercício; T2-com 240min

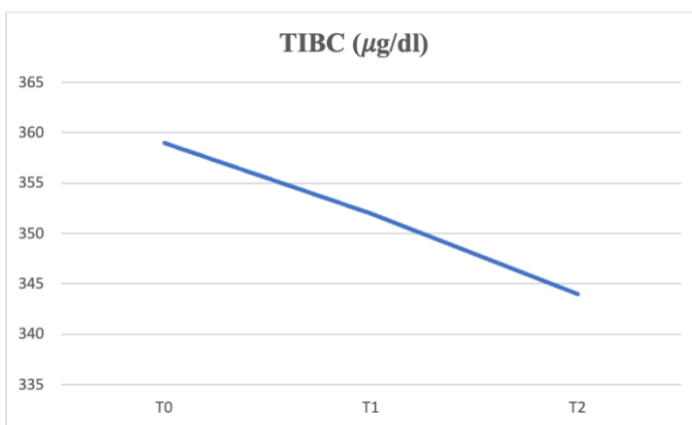


Fig 6.2. Evolução da variável TIBC (Capacidade Total de Ligação do Ferro) ao longo dos períodos temporais (T0-reposou; T1-imediatamente após o

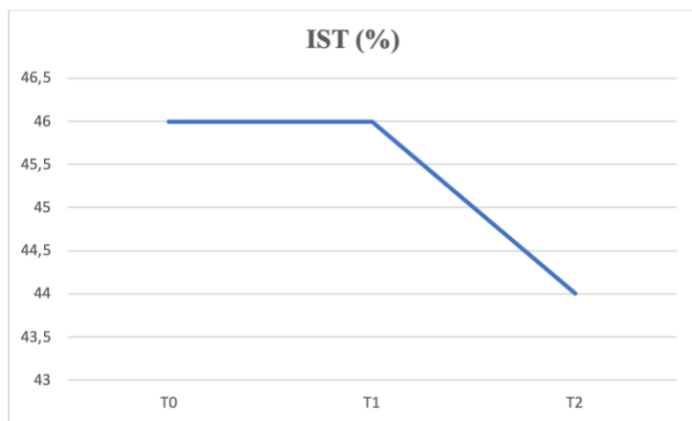


Fig 6.3. Evolução da variável IST (Índice de Saturação da ferritina) ao longo dos períodos temporais (T0-reposou; T1-imediatamente após o exercício; T2-com 240min de recuperação)

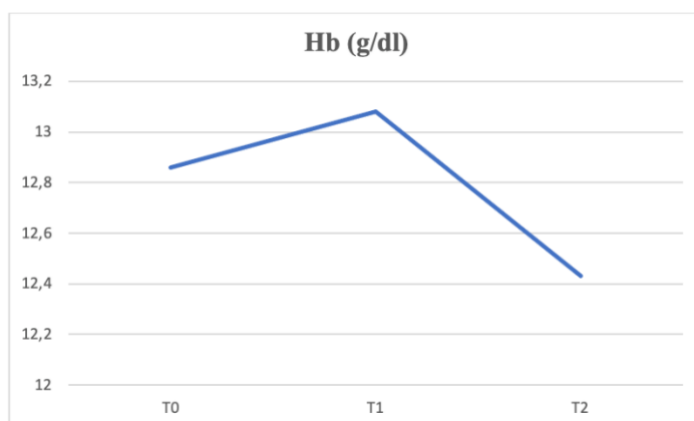


Fig 6.4. Evolução da variável Hb (Hemoglobina) ao longo dos períodos temporais (T0-reposou; T1-imediatamente após o exercício; T2-com 240min de recuperação)

Figura 6. Evolução das variáveis do metabolismo do Ferro no tempo