



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DOSEAMENTO DE CORTISOL SALIVAR

EM PROVAS DE RESISTÊNCIA

EQUESTRE: STRESS *VERSUS*

PERFORMANCE

Mafalda Raimundo Pardal

Orientador interno: Doutora Elisa Maria Varela
Bettencourt

Orientador externo: Dra. Mónica Alexandra Freire
Cardoso de Mira

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação de natureza científica

Évora, 20 de Abril de 2015

Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

Agradecimentos

Esta tese de mestrado de medicina veterinária representa o cumprir de um grande objetivo da minha vida. Não foi um percurso fácil e não teria sido possível sem a ajuda de várias pessoas. Por isso quero agradecer:

Aos meus Avós, sem eles eu não seria a pessoa que sou hoje e não teria chegado aqui. Deixo aqui "O" meu obrigada. Obrigada por cada momento que passamos juntos.

Aos meus Irmãos, por serem os melhores irmãos que eu podia ter, os melhores amigos de sempre e para sempre. Obrigada pelo carinho, força e coragem que me dão.

À minha Mãe, por me mostrar que a vida apresenta-nos obstáculos para os superarmos. Ao meu Pai e Teresa, por me mostrarem que podemos ser muito mais fortes do que pensamos. Obrigada por me mostrarem que não devemos desistir dos nossos sonhos porque com trabalho e dedicação é possível.

Aos meus Tios, por serem mais do que tios, por serem como irmãos mais velhos.

Ao Pedro Bicó, por toda a compreensão e apoio especialmente nesta última etapa. Obrigada por seres quem és na minha vida.

À Cristina Miradouro por esta amizade de 21 anos, tenho muita sorte porque posso dizer que tenho mais uma irmã.

À Margarida Soares, por estar sempre presente e pronta a ajudar. És uma pessoa muito especial e uma grande grande amiga.

À Liliane Damásio, à Margarida Dias e à Sara Peres por me terem ajudado sempre que precisei. Foram muito mais do que minhas colegas, foram as minhas "madrinhas" e são amigas para a vida.

À Mónica Ribeiro, por me ouvir e transmitir a sua calma. És uma pessoa inspiradora e é um privilégio conviver contigo.

Às minhas amigas Maria Neto, Mariana Duque, Mariana Pedrosa, Cristina Mata e Ana Laura, obrigada pela vossa amizade, por continuarem presentes mesmo quando não

estamos juntas. Obrigada pela vossa compreensão e por todo o vosso apoio nas horas boas e menos boas.

À Dra. Elisa Bettencourt, por ter aceite ser minha orientadora de estágio, por toda a sua ajuda, paciência e disponibilidade.

À Dra. Mónica, por tudo o que me tem ensinado, por todas as oportunidades que me tem proporcionado e pela sua amizade.

Ao Dr. Tomé, por tudo o que me tem ensinado durante os estágios, pela sua disponibilidade, simpatia e boa disposição.

À Dra. Elsa Lamy, pelo grande apoio com o processamento das amostras, pela simpatia e disponibilidade ao longo da tese.

Ao Prof. Alfredo, pela disponibilidade e simpatia com que me transmitiu algum do seu conhecimento acerca deste tema.

Aos cavaleiros, por terem aceite participar neste estudo e me terem recebido nas suas casas sempre com simpatia.

Resumo

A disciplina de resistência equestre tem apresentado uma crescente adesão e rápida evolução. É importante criar um suporte científico capaz de acompanhar esta evolução e de encontrar novos métodos que complementem a avaliação médico-veterinária existente. Este estudo pretendeu avaliar a utilidade do doseamento de cortisol salivar como indicador objetivo de *stress* e de *performance* durante provas de 40 e 80 Km. Realizou-se a colheita de saliva com *Salivette*[®] *Sarstedt*, inserindo o algodão na boca do cavalo com a ajuda de uma pinça hemostática. As amostras foram colhidas em casa, na inspeção pré-raide e após cada grelha médico-veterinária, tendo sido mantidas em refrigeração até à centrifugação e armazenadas a -20°C até à determinação dos níveis de cortisol por ELISA. Observaram-se diferenças significativas entre os níveis de cortisol salivar e os vários momentos em que foram feitas as colheitas de saliva. Concluiu-se que há uma elevada variabilidade individual e portanto são necessárias amostras maiores para estabelecer mais associações entre o cortisol, características individuais dos cavalos, parâmetros fisiológicos e de *performance*.

Palavras-chave: cortisol, *stress*, *performance*, resistência equestre.

Abstract

Salivary cortisol determination in equestrian endurance events: *stress versus performance*

The endurance has had a growing membership and quick evolution as an independent discipline. It is important to create a scientific support able to follow this development and to find new methods that complement the existent medical evaluation. This study is aimed to evaluate the usefulness of the salivary cortisol assay as an objective indicator of *stress* and *performance* along 40 and 80 Km endurance competitions. We have conducted a saliva samples collection with Salivette®Sarstedt by inserting the cotton in the horse's mouth with the help of a hemostat. Samples were taken at home, in the pre-inspection and after each vet gate, having been kept refrigerated until centrifugation and stored at -20°C until determination of cortisol levels by ELISA. Significant differences were observed among salivary cortisol levels and the various moments when saliva collections were made. It was concluded that there is a high individual variability and therefore larger samples are needed to establish more associations between cortisol, individual characteristics of horses, physiological parameters and *performance*.

Keywords: cortisol, *stress*, *performance*, endurance.

Índice geral

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Índice geral.....	V
Índice de gráficos.....	VIII
Índice de tabelas.....	IX
Índice de figuras.....	XI
Índice de siglas e abreviaturas.....	XIII
I. Introdução.....	1
II. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Resistência equestre.....	4
2.1.1. Origem e evolução da prova de resistência equestre.....	9
2.1.2. O cavalo de resistência equestre.....	11
2.2 Bem-estar <i>versus stress</i>	14
2.2.1. Bem-estar animal.....	14
2.2.2. Stress.....	16
2.2.2.1. Stress agudo e crónico.....	17
2.3. Fisiologia do cavalo em exercício.....	18
2.3.1. Energia.....	19
2.3.1.1. Vias metabólicas utilizadas.....	19
2.3.1.2. Fontes de energia.....	19
2.3.2. Fibras musculares.....	20
2.3.3. Termorregulação.....	22
2.3.3.1. Produção de calor.....	22
2.3.3.2. Mecanismos de termorregulação.....	22
2.3.4. Consequências metabólicas do exercício prolongado.....	24
2.3.4.1. Efeitos sobre o equilíbrio hidroeletrolítico.....	24
2.3.4.2. Efeitos sobre o equilíbrio ácido-base.....	26
2.3.4.3. Efeitos sobre a circulação sanguínea.....	27

2.3.4.4. Efeitos sobre o sistema respiratório.....	28
2.3.5. Fisiopatologia de possíveis afeções associadas à prova de resistência	28
2.3.5.1. Fatores de risco de eliminação.....	30
2.4. Metabolismo neuroendócrino durante o exercício	32
2.4.1. O sistema hipotálamo-hipófise-adrenal	32
2.4.2. Catecolaminas.....	33
2.4.4. Cortisol	34
2.4.3.1. Influência de fatores externos e internos	35
2.5. Determinação dos níveis de cortisol.....	38
2.5.1. Meios para análise de cortisol	38
2.5.1.1. Sangue	39
2.5.1.2. Saliva	40
2.5.1.3. Urina	41
2.5.1.4. Fezes	42
2.5.2. Métodos de análise de cortisol salivar	42
2.5.2.1. Técnicas cromatográficas	42
2.5.2.2. Imunoensaios	43
III. Trabalho experimental.....	47
3.1. Introdução	47
3.2. Material e métodos	49
3.2.1. Cavalos	49
3.2.2. Desenho experimental e colheita de amostras.....	50
3.2.3. Análise laboratorial.....	51
3.2.4. Análise estatística	52
3.3 Resultados.....	52
3.3.1. CEP 40 Km.....	52
3.3.1.1. Valores médios e desvio-padrão.....	52
3.3.1.2. Teste T para amostras emparelhadas	54
3.3.1.3. Correlações de Spearman	55
3.3.2. CEP 80 Km.....	60
3.3.2.1. Valores médios e desvio-padrão.....	60

3.3.2.2. Teste T para amostras emparelhadas	62
3.3.2.3. Correlações de Spearman	64
3.4. Discussão	69
IV. Conclusão	74
Bibliografia	76
Anexos	i
Anexo 1: Consentimento informado	i

Índice de gráficos

Gráfico 1: Evolução do número de participantes por disciplina equestre nos Jogos Mundiais Equestres (adaptado de FEI, 2014).....	10
Gráfico 2: Registos da FEI, para provas de 100-160 km que decorreram entre 2008 e 2011, relativos 47 países, quanto à evolução das taxas de sucesso (azul claro) e de eliminação por claudicação (vermelho), razões metabólicas (verde) ou outros motivos (amarelo), retirados (azul escuro) ou desclassificados (preto) (Nagy <i>et al.</i> , 2013a).....	31
Gráfico 3: Perfil da variação da concentração de cortisol salivar durante 24 horas em 20 cavalos no seu ambiente normal (Bohák <i>et al.</i> , 2013).....	36
Gráfico 4: CEP 40 Km - Níveis médios de cortisol salivar (ng/ml).....	55
Gráfico 5: CEP 80 Km - Níveis médios de cortisol salivar (ng/ml).....	63

Índice de tabelas

Tabela 1: Guia de avaliação dos parâmetros médico-veterinários em provas de resistência equestre (FEI, 2014).....	7
Tabela 2: CEP 40 e 80 Km - Ordem cronológica das grelhas médico-veterinárias onde foram realizadas as colheitas de saliva e etapas com o número de quilômetros correspondentes.....	51
Tabela 3: CEP 40 Km - Temperatura (°C) e humidade relativa (%) em cada grelha médico-veterinária.....	53
Tabela 4: CEP 40 Km - Valores médios \pm DP, mínimos, máximos dos parâmetros técnicos - velocidade média (Km/h) e tempo de recuperação (s) (n=5).....	53
Tabela 5: Valores médios \pm DP, mínimos, máximos dos parâmetros médico-veterinários dos cavalos examinados nas grelhas médico-veterinárias - FC (bpm), TRC (s), TRPC (s) (n=5).....	54
Tabela 6: CEP 40 Km - Teste T para comparação de médias de cortisol salivar (ng/ml) em função do momento da recolha (n=5).....	54
Tabela 7: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre as concentrações salivares médias (ng/ml) nos vários momentos (n=5).....	56
Tabela 8: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) no mesmo momento (n=5).....	56
Tabela 9: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) no mesmo momento (n=5).....	57
Tabela 10: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e o tempo de recuperação (s) no mesmo momento (n=5).....	58
Tabela 11: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre as variáveis de <i>performance</i> velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) (n=5).....	59
Tabela 12: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre os níveis de cortisol durante a	

prova (GV1e GV2) e a classificação da prova (n=4).....	60
Tabela 13: CEP 80 Km - Temperatura (°C) e humidade relativa (%) em cada grelha médico-veterinária.....	61
Tabela 14: CEP 80 Km - Valores médios ± DP, mínimos, máximos dos parâmetros técnicos - velocidade média (Km/h) e tempo de recuperação (s) (n=6).....	61
Tabela 15: CEP 80 Km - Valores médios ± DP, mínimos, máximos dos parâmetros médico-veterinários dos cavalos examinados nas grelhas médico-veterinárias - FC (bpm), TRC (s), TRPC (s) (n=6).....	62
Tabela 16: CEP 80 Km - Teste T para comparação de médias de cortisol salivar (ng/ml) em função do momento da recolha (n=6).....	63
Tabela 17: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre as concentrações salivares médias (ng/ml) nos vários momentos (n=6).....	64
Tabela 18: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) (n=6).....	65
Tabela 19: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) no mesmo momento (n=6).....	66
Tabela 20: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e o tempo de recuperação no mesmo momento (s) (n=6).....	67
Tabela 21: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre as variáveis de <i>performance</i> velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) (n=6).....	67
Tabela 22: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre os níveis de cortisol durante a prova (GV1, GV2 e GV3) e a classificação da prova (n=6).....	68

Índice de figuras

Fig. 1: Cavaleira holandesa nos jogos mundiais equestres (fotografia de Sindy Thomas).....	4
Fig. 2: Avaliação veterinária: A - trote; B - frequência cardíaca; C - motilidade intestinal; D - tempo de retração da prega cutânea; E - tempo de repleção capilar e mucosas; F - mucosas; (fotografias originais).....	8
Fig. 3: Verbete médico-veterinário (FEI, 2014).....	8
Fig. 4: Esquema das principais interações entre o indivíduo e os fatores internos e externos, as respostas desencadeadas pelo <i>stress</i> e os impactos sobre o bem-estar (adaptado de Peeters, 2012).....	17
Fig. 5: Esquema das possíveis sucessões de eventos que conduzem a diferentes afeções metabólicas no cavalo de resistência (adaptado de Robert, 2014).....	29
Fig. 6: Esquema de difusão passiva do cortisol ao nível das glândulas salivares (Peeters, 2012).....	40
Fig. 7: Colheita de saliva - Método não invasivo, indolor e rápido, geralmente bem aceite pelo cavalo (fotografia cedida pelo Professor Paulo Fonseca).....	41
Fig. 8: Colheita de amostra salivar (fotografia original).....	50
Fig. 9: Salivette [®] e amostra após centrifugação (fotografia original).....	50
Fig. 10: Análise laboratorial - ELISA(fotografias originais).....	52
Fig. 11: CEP 40 Km - Regressões com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) antes de iniciar a prova (GV0) e nas grelhas veterinárias 1 (GV1) e 2 (GV2).....	57
Fig. 12: CEP 40 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) nas grelhas veterinárias 1 (GV1) e 2 (GV2).....	58

Fig. 13: CEP 40 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) após a 2ª fase da prova (GV2) (n=5).....	59
Fig. 14: CEP 40 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre os níveis de cortisol salivar durante a prova (ng/ml) e a classificação na prova (n=4).....	60
Fig. 15: CEP 80 Km - Regressões com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) antes de iniciar a prova (GV0) e nas grelhas veterinárias 1 (GV1), 2 (GV2) e 3 (GV3).....	65
Fig. 16: CEP 80 Km - Regressões com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) nas grelhas veterinárias 1 (GV1), 2 (GV2) e 3 (GV3).....	66
Fig. 17: CEP 80 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar entre a velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) após a 3ª fase da prova (GV3) (n=6).....	68
Fig. 18: CEP 80 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre os níveis de cortisol salivar durante a prova (ng/ml) e a classificação na prova (n=6).....	69

Índice de siglas e abreviaturas

AA - Anglo-Árabe

ACTH - Adrenocorticotropina

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

CBG - Globulina de ligação aos corticosteróides

CEN - Concursos de Endurance Nacionais

CEN 1* - Concursos de Endurance Nacionais de uma estrela

CEN 2* - Concursos de Endurance Nacionais de duas estrelas

CEN 3* - Concursos de Endurance Nacionais de três estrelas

CEP - Concursos de Endurance de Promoção

CEP 40 Km - Concurso de Endurance de Promoção 40 Km

CEP 80 Km - Concurso de Endurance de Promoção 80 Km

CER - Concursos de Endurance Regionais

CP - Cruzado Português

CPM - Contagens por minuto

CRH - Hormona libertadora de corticotrofina

ECLIA - Imunoensaio electroquimicoluminescente

EIA - Ensaio imunoenzimático

ELISA - *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

ESPG - *Endurance Strategic Planning Group*

FC - Frequência Cardíaca

FEI - Federação Equestre Internacional

FEP - Federação Equestre Portuguesa

GV0 - Grelha médico-veterinária 0

GV1 - Grelha médico-veterinária 1

GV2 - Grelha médico-veterinária 2

GV3 - Grelha médico-veterinária 3

HR - Humidade relativa

ICL - Índice de cortisol livre

I125 - Radioisótopo iodo 125

PSA - Puro Sangue Árabe

T - Temperatura

TR - Tempo de recuperação

TRC - Tempo de repleção capilar

TRPC - Tempo de retração da prega cutânea

VM - Velocidade média

I. Introdução

A *performance* desportiva é o reflexo da atividade coordenada de vários sistemas do organismo, incluindo o músculo-esquelético, cardiovascular, respiratório, nervoso, endócrino, renal, hepático e digestivo. Um animal cujo bem-estar seja preservado tem maior capacidade de se manter em equilíbrio dinâmico com o ambiente. Pelo contrário, uma interrupção da homeostase (*stress*) pode resultar em diminuição do rendimento desportivo ou até mesmo em doença (Peeters, 2012). Atribui-se a designação perda de *performance* aos cavalos que sofrem uma diminuição do nível de desempenho, ou que são incapazes de progredir para o nível esperado com base nas suas características físicas, potencial genético e treino realizado (Couetil, 2009). A resistência equestre é uma competição contra-relógio que testa a resistência e a velocidade dos cavalos em percursos de longa distância com diferentes tipos de solo e condições climáticas (FEI, 2014a). Esta disciplina tem apresentado uma crescente adesão e rápida evolução (Coombs & Fisher, 2012). Uma vez que os resultados desportivos não são apenas o reflexo do desempenho durante a prova mas também de todo um trabalho realizado antes da mesma, para acompanhar a evolução desta disciplina é necessário um contributo significativo da investigação científica, quer para técnicas de treino e métodos de avaliação preventiva, quer em prova, oferecendo métodos complementares para melhorar a avaliação médico-veterinária (Nagy *et al.*, 2012). Portanto será de comum interesse para todos os envolvidos no desporto equestre o desenvolvimento de mais técnicas que permitam testar a aptidão dos cavalos para a competição e identificar precocemente aqueles que tenham resistência inferior ou limitações físicas, no sentido de adaptar o treino e não comprometer desde logo a sua vida desportiva. A existência de mais testes que possam integrar procedimentos de rotina ao longo dos programas de treino para monitorizar a melhoria ou deterioração da condição desportiva, por comparação entre análises consecutivas, também podem possibilitar a melhoria dos planos de treino para maximizar *performances*, reduzir a incidência de lesões e melhorar os resultados desportivos em concordância com o bem-estar do cavalo (Evans *et al.*, 2006).

No que diz respeito à resistência equestre, a avaliação médico-veterinária merece destaque pois é a disciplina com maior acompanhamento veterinário ao longo de cada competição. As avaliações realizadas durante as provas de resistência são subjetivas e têm-se mostrado ineficazes face ao desenvolvimento exponencial da modalidade, sobretudo pelas velocidades praticadas atualmente, com um aumento significativo de relatos de morbidade, pondo em risco a funcionalidade ou mesmo a vida dos cavalos. Assim, torna-se imperativo criar um suporte científico capaz de acompanhar esta evolução (Coombs & Fisher, 2012). No futuro, em conjunto com o exame clínico, a utilização de métodos objetivos não invasivos poderá ajudar os médicos-veterinários oficiais das provas a identificar mais precocemente cavalos em risco e fundamentar a eliminação destes das provas. Por outro lado, um método objetivo não invasivo capaz de inferir sobre a *performance* dos cavalos e a sua evolução também pode ser uma ferramenta de interesse e de fácil acesso para proprietários e treinadores que pretendam avaliar os seus cavalos no processo de treino.

O cortisol é um glucocorticoide que tem sido utilizado como uma medida objetiva para a caracterização do *stress* em pessoas e animais em situações adversas e ultimamente em cavalos sujeitos a atividade física (Peeters *et al.*, 2013). Este tem sido mensurado no sangue, saliva, urina, fezes e pêlos (Kaushik *et al.*, 2014). A saliva representa o meio a partir do qual é possível a sua mensuração por um método não invasivo, simples, prático e cujo método de recolha é, geralmente, bem aceite pelos cavalos (Peeters *et al.*, 2011). Assim, a colheita de saliva para determinação de cortisol é uma técnica promissora para utilização durante provas onde tradicionalmente não são permitidos métodos invasivos e onde é imperativo a utilização de métodos rápidos e eficazes que auxiliem na avaliação do cavalo em exercício e dos fatores ambientais inerentes às competições (Peeters *et al.*, 2013).

Com a presente dissertação procurou-se estudar as variações na concentração de cortisol salivar e a sua possível utilidade como indicador objetivo de *stress* ou de *performance* em cavalos antes, durante e após provas de resistência equestre. Numa primeira parte apresenta-se uma revisão bibliográfica centrada nas especificidades da disciplina em questão, na fisiologia do cavalo em exercício, na problemática do bem-estar e do *stress* e no metabolismo neuroendócrino, destacando as

particularidades do cortisol e as possíveis técnicas para a sua determinação. Na segunda parte apresenta-se um trabalho experimental desenvolvido durante duas provas de resistência com o fim de estabelecer associações entre as informações obtidas a partir das avaliações médico-veterinárias, características individuais, condições ambientais, cronometragem e *performance* desportiva.

O objetivo geral deste estudo é avaliar a utilidade do doseamento de cortisol salivar como indicador objetivo de *stress* e de *performance* durante dois concursos de resistência equestre.

Este trabalho foi desenvolvido durante o estágio curricular realizado na área Clínica de Equinos, na Equimuralha - Medicina Veterinária de Equinos, setor do Hospital Veterinário Muralha de Évora, com a orientação externa da Dra. Mónica Mira e a orientação interna da Doutora Elisa Bettencourt. Este estágio decorreu entre 3 de Fevereiro e 5 de Julho de 2014, sendo a equipa clínica da Equimuralha constituída pela Dra. Mónica Mira e pelo Dr. Tomé Fino. Durante este período foram acompanhadas atividades de clínica ambulatória de equinos o que permitiu contactar com os vários passos do exame clínico e meios complementares de diagnóstico utilizados nesta espécie, possibilitando a aquisição de competências práticas e autonomia na área de clínica.

II. Revisão Bibliográfica

2.1. Resistência equestre

A resistência equestre é uma disciplina equestre onde a resistência e a velocidade dos cavalos são avaliadas em percursos de longa distância num itinerário pré-determinado, com ou sem obstáculos naturais, testando a capacidade do cavaleiro para gerir o esforço do seu cavalo com segurança. É uma competição contra-relógio, em que o conjunto cavalo-cavaleiro (Fig.1) que termina o percurso em menos tempo é classificado como vencedor da competição após completar com sucesso a inspeção médico-veterinária final. Terão que realizar o controlo de *doping*, bem como outros protocolos pela segurança do cavalo e do cavaleiro sob as regras do regulamento geral da Federação Equestre Portuguesa (FEP) ou do regulamento da Federação Equestre Internacional (FEI) (FEP, 2014a).



Fig. 1: Cavaleira holandesa nos jogos equestres mundiais (fotografia de Sindy Thomas).

A resistência equestre destaca-se de outras disciplinas equestres porque cada evento é único, já que se realiza em diferentes terrenos e sob diversas condições climáticas. Esta disciplina representa um enorme desafio para o cavaleiro, que só será bem sucedido se possuir um profundo conhecimento das capacidades do seu cavalo e sensibilidade para decidir efetivamente que ritmo deve seguir nos diferentes tipos de terreno, pois no final da prova a condição física e o estado de saúde

do cavalo é condição necessária para aprovação na inspeção veterinária e classificação na prova.

Os intervenientes numa competição de resistência equestre são os membros da organização, cavaleiros, equipas de apoio, comissão veterinária, veterinário de

tratamentos, equipa de controlo anti-*doping*, delegado técnico, juízes e comissários (FEI, 2014h).

Existem dois tipos de prova, os raides de velocidade controlada, com velocidade obrigatória compreendida entre os 8 e os 16 Km/h, e os raides de velocidade livre, que têm uma velocidade mínima de 12 Km/h. Os raides de velocidade controlada compreendem os Concursos de Endurance Regionais (CER) e os Concursos de Endurance de Promoção (CEP). Os raides de velocidade livre podem realizar-se apenas num dia, sendo estes os Concursos de Endurance Nacionais (CEN), que de acordo com o grau de dificuldade se dividem em CEN de 1, 2 ou 3 estrelas (CEN 1* de 80 a 119 Km, CEN 2* de 120 a 139 Km, CEN 3* de 140 a 160 Km), ou podem realizar-se em dois ou mais dias (CEN 2* de 70 a 89 Km por dia em dois dias, CEN 3* de 90 a 100 Km por dia em dois dias e 70 a 80 Km por dia em 3 dias ou mais) (FEP, 2014b).

Para a realização das diferentes provas, os cavalos têm que cumprir vários requisitos no que diz respeito à idade, a períodos de repouso e ao seguimento criterioso de fases de qualificação. Assim, a elegibilidade dos cavalos varia de acordo com o tipo de prova. Para um CER 20 Km o cavalo tem de ter pelo menos 4 anos de idade, para um CEP tem de ter pelo menos 5 anos, para CEN 1* e 2* tem de ter pelo menos 6 anos e para CEN 3* tem de ter pelo menos 7 anos. Consoante a distância percorrida existem períodos de descanso obrigatórios, variando entre 5 e 33 dias de repouso obrigatório. Se o cavalo for eliminado por razões metabólicas este período pode prolongar-se até 90 dias. O processo de qualificação exige que cada cavalo complete com sucesso pelo menos dois CEP com distância mínima de 40 km e máxima de 60 km e dois CEP com distância mínima de 80 km, pela ordem referida (FEP, 2014c). Para poderem progredir para um CEI 1*, toda esta fase de qualificação deve ser realizada num período máximo de 24 meses e mínimo de 12 meses (FEI, 2014e).

Todas as provas estão divididas em fases, que devem ter entre 20 e 40 Km (FEP, 2014a) e estar identificadas por bandeirolas, fitas, ou placas com diferentes cores (FEI, 2014b). A cada 10-15 km existem pontos de apoio, que são locais pré-estabelecidos pela organização e indicados num *road book*, onde se pode molhar o cavalo e oferecer-lhe água para beber (FEI, 2014c). No final de cada fase os cavaleiros desaparelharam os cavalos e molham-nos ativamente com água fresca com o objetivo de diminuir a temperatura corporal o mais rapidamente possível, e conseguir assim, a redução da

frequência cardíaca até um valor igual ou inferior a sessenta e quatro batimentos por minuto. Quando tal é conseguido, os cavalos dão entrada na grelha médico-veterinária, o cronómetro pára, e são sujeitos a uma inspeção veterinária obrigatória (FEI, 2014g).

Todas as provas apresentam um exigente controlo médico-veterinário com vista a salvaguardar a saúde e o bem-estar do cavalo durante a competição. Os exames médico-veterinários decorrem na grelha médico-veterinária, sendo esta uma zona demarcada com 3 a 5 linhas de trote, com um comprimento de pelo menos 40 metros. A inspeção pré-raide, ocorre logo após a chegada do cavalo ao local da prova e tem como objetivos verificar a identidade dos cavalos (resenho e *microchip*) assim como o seu estado de saúde (estado vacinal e exame físico). Os mesmos exames médico-veterinários ocorrem no final de cada fase até 20 minutos após a chegada, ou 30 minutos caso seja o final da última fase (FEI, 2014h).

A avaliação médico-veterinária (Fig. 2) incide sobre a frequência cardíaca sendo esta analisada através do índice de recuperação cardíaca (IRC), pelo que a frequência cardíaca é medida quando o cavalo entra na grelha médico-veterinária e novamente um minuto após essa medição. O IRC pode ser um indicador de desgaste físico preocupante sempre que o aumento for superior a quatro batimentos por minuto (Ridgeway, 1994). Outros parâmetros incluídos na avaliação médico-veterinária são a frequência respiratória, o tempo de repleção capilar, as mucosas e o tempo de retração da prega cutânea, a motilidade intestinal, a simetria e amplitude dos andamentos (trote), o tónus muscular, a sensibilidade de dorso, a presença de feridas e lacerações (Barnes *et al.*, 2010), observação do estado dos membros e a ferração (FEI, 2014h). A tabela 1 demonstra as escalas determinadas pela FEI para os diferentes parâmetros de avaliação médico-veterinária. Os registos são feitos no verbete médico-veterinário (Fig. 3), documento que acompanha o cavaleiro durante toda a prova (Fielding *et al.*, 2011).

Tabela 1: Guia de avaliação dos parâmetros médico-veterinários em provas de resistência equestre (FEI, 2014).

Parâmetro	Escala	Caracterização
Frequência cardíaca	A - D	A- frequência e ritmo normais B- ritmo variável, com aumento da frequência C- arritmia pronunciada, presença de sopros - Eliminação? D- taquicardia ou bradicardia - eliminação
Tempo de repleção capilar	1 - 4	1- inferior a 1 segundo 2- entre 1 a 2 segundos 3- entre 2 a 3 segundos - eliminação? 4- superior a 3 segundos - eliminação
Mucosas	A - D	A- rosadas e húmidas B- ligeiramente congestionadas e secas C- congestionadas, pálidas e secas - eliminação? D- parâmetro crítico para a avaliação de estado metabólico - eliminação!
Tempo de retração da prega cutânea	1 - 4	1- inferior a 1 segundo 2- entre 1 a 2 segundos 3- entre 3 a 4 segundos 4- superior a 4 segundos
Motilidade intestinal	A - D	A- normal e ativo B- ligeiramente diminuída (↓) C- marcadamente diminuída (↓↓) D- ausente - eliminação
Tónus muscular	A - C	A- maleável, elástico, fluido B- firme, com fasciculações e alteração do tónus - eliminação C- apertado, flácido, com contrações musculares, inchado - eliminação
Garrote, dorso, cilhadouro	A - C	A- sem dor e sem lesões B- sensibilidade - eliminação? C- dor marcada
Andamento/impulsão/ claudicação	A - C	A- com vontade, forte, normal B- com relutância, cansado, com claudicação inconsistente - eliminação? C- sem vontade, com claudicação persistente - eliminação

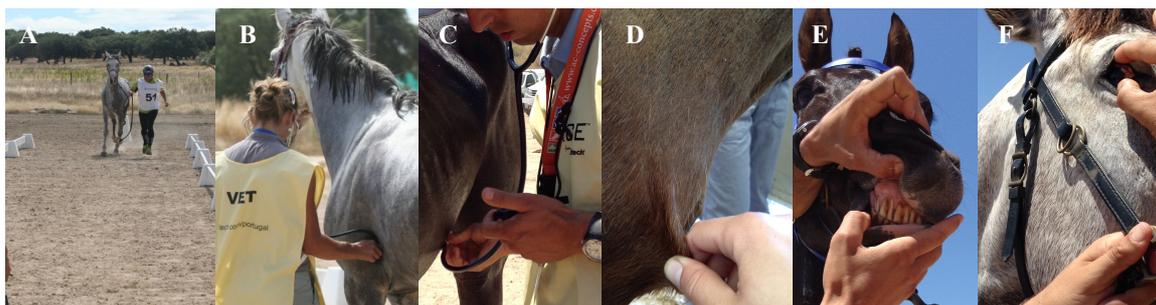


Fig. 2: Avaliação médico-veterinária: A - trote; B - frequência cardíaca; C - motilidade intestinal; D - tempo de retração da prega cutânea; E - tempo de repleção capilar e mucosas; F - mucosas; (fotografias originais).

4803036925 **ENDURANCE VET CARD** to be completed only by FEI Endurance Official Veterinarian page 1/2 **FEI**
Please use **BLOCK LETTERS** only

EVENT CODE	COMPETITION ID	COMPETITOR NO
	2 0 1 3 C	
HORSE NAME	HORSE FEI ID	ATHLETE NAME
TRAINER		
PRIVATE TEAM VET. NAME	FEI ID	
HORSE PREVIOUS TRAINING HISTORY AVAILABLE		Comments
RIDER EMPLOYED BY TRAINING STABLE		
HORSE OWNED BY RIDER		

	HEART RATE BPM	MUCOUS A-D	CAP. REFILL 1-4	SKIN TURGOR 1-4	RESP. RATE	GUT SOUNDS A-D	BACK WITHERS A-C	MUSCLE TONE A-C	GAIT A-C	REMARKS	VET. SIGNATURE
PRE-RIDE EXAMINATION											
<input type="checkbox"/> Accepted <input type="checkbox"/> Held <input type="checkbox"/> Not Accepted											
LOOP 1											
<input type="checkbox"/> Metabolic <input type="checkbox"/> Heart Rate <input type="checkbox"/> Lame <input type="checkbox"/> Other <input checked="" type="checkbox"/> RETIRED <input type="checkbox"/> QUALIFIED	Arrival time: Pres. time:										
LOOP 2											
<input type="checkbox"/> Metabolic <input type="checkbox"/> Heart Rate <input type="checkbox"/> Lame <input type="checkbox"/> Other <input checked="" type="checkbox"/> RETIRED <input type="checkbox"/> QUALIFIED	Arrival time: Pres. time:										
LOOP 3											
<input type="checkbox"/> Metabolic <input type="checkbox"/> Heart Rate <input type="checkbox"/> Lame <input type="checkbox"/> Other <input checked="" type="checkbox"/> RETIRED <input type="checkbox"/> QUALIFIED	Arrival time: Pres. time:										
LOOP 4											
<input type="checkbox"/> Metabolic <input type="checkbox"/> Heart Rate <input type="checkbox"/> Lame <input type="checkbox"/> Other <input checked="" type="checkbox"/> RETIRED <input type="checkbox"/> QUALIFIED	Arrival time: Pres. time:										
LOOP 5											
<input type="checkbox"/> Metabolic <input type="checkbox"/> Heart Rate <input type="checkbox"/> Lame <input type="checkbox"/> Other <input checked="" type="checkbox"/> RETIRED <input type="checkbox"/> QUALIFIED	Arrival time: Pres. time:										
FINAL INSPECTION											
<input type="checkbox"/> Metabolic <input type="checkbox"/> Heart Rate <input type="checkbox"/> Lame <input type="checkbox"/> Other <input checked="" type="checkbox"/> RETIRED <input type="checkbox"/> FINISHED											

FAIL TO QUALIFY YES NO SENT TO CLINIC YES NO FIT TO TRAVEL YES NO SIGNATURE

Fig. 3: Verbete médico-veterinário (FEI, 2014).

Um cavalo com alterações metabólicas, com desigualdade ao nível do sistema locomotor, ou outra condição que comprometa o seu bem-estar, não está apto para prosseguir e é eliminado da competição (Nagy *et al.*, 2012). Caso a eliminação seja devida a alterações metabólicas significativas, o cavalo será encaminhado para as boxes de tratamento, onde encontrará o médico-veterinário de tratamentos. Um cavalo apto

para prosseguir cumpre o descanso obrigatório (30, 40 ou 50 minutos de acordo com a distância e fase que está a realizar), durante o qual lhe é fornecido alimento, feito gelo nos membros e massagens, administrados eletrólitos, entre outros procedimentos. O tempo de saída é igual ao tempo de entrada na grelha médico-veterinária mais o tempo de paragem obrigatória (FEI, 2014d).

Em qualquer momento da competição, o médico-veterinário pode exigir uma segunda observação do cavalo, pelo que após o descanso este deverá ser apresentado na grelha médico-veterinária em regime de reinspeção. As reinspeções obrigatórias são estabelecidas pelo comité médico-veterinário, normalmente no dia anterior à prova, sendo que comumente se realizam no final da penúltima etapa em raides de 2** e no final da antepenúltima e penúltima etapas em raides de 3***, não devendo a apresentação dos cavalos ocorrer mais do que 15 minutos antes do seu tempo de partida. No final do raid, o cronómetro pára quando o cavalo passa a meta e este tem até 30 minutos para ser apresentado na grelha médico-veterinária, onde a decisão será tomada de acordo com um painel de votação constituído por três médicos veterinários que votam secretamente e de forma independente, sendo a decisão final o resultado da maioria dos votantes (FEI, 2014h).

2.1.1. Origem e evolução da prova de resistência equestre

A prova de resistência equestre tem raízes militares com origem nos Estados Unidos e resultou da necessidade de testar a capacidade dos cavalos para percorrer longas distâncias com cargas pesadas (Sena, 2007). Tornou-se uma disciplina equestre de competição na década de 1950, quando Wendell Robie traçou a rota *Pony Express* de Nevada para a Califórnia, que deu origem à *Tevis Cup Ride*, uma das provas de resistência mais importantes até hoje (Virginie, 2013). Na década de 1960 foi introduzida na Europa, sendo reconhecida como uma das disciplinas FEI desde 1982 (Parot, 2011). É uma modalidade relativamente recente com popularidade crescente, encontrando-se em 2º lugar após os concursos de obstáculos (Nagy *et al.*, 2013), tal como é possível verificar através do gráfico 1 construído com base nos registos históricos da FEI. Esta modalidade apresenta uma crescente e rápida evolução, com aumento do número de países participantes em cerca de 50% e do número de eventos

FEI. Os valores registados revelam que o número de provas de resistência equestre FEI sofreu um aumento de 300%, com mais de 900 provas por ano e que o número de cavaleiros registados na FEI em 2009 foi 2661 e em 2014 ultrapassou os 6000; quanto ao número de cavalos inscritos na modalidade registam-se mais de 10 000 (FEI, 2014j). No que diz respeito às velocidades médias praticadas estas sofreram grandes alterações e os recordes têm sido continuamente ultrapassados; se em 2008 a velocidade média era 17 Km/h, atualmente registam-se velocidades médias próximas de 30 Km/h em competições de 120 e de 160 Km (participantes dos Emirados Árabes Unidos), com cavalos a galopar a mais de 35 km/h no final da última etapa, que muitas vezes é de 15-20 Km (Nagy *et al.*, 2012).

Os principais eventos FEI de resistência equestre são: FEI World Equestrian Games, que ocorrem a cada quatro anos; FEI World Endurance Championships, realizada nos anos de Jogos Olímpicos; e FEI European Endurance Championships, que ocorrem bianualmente.

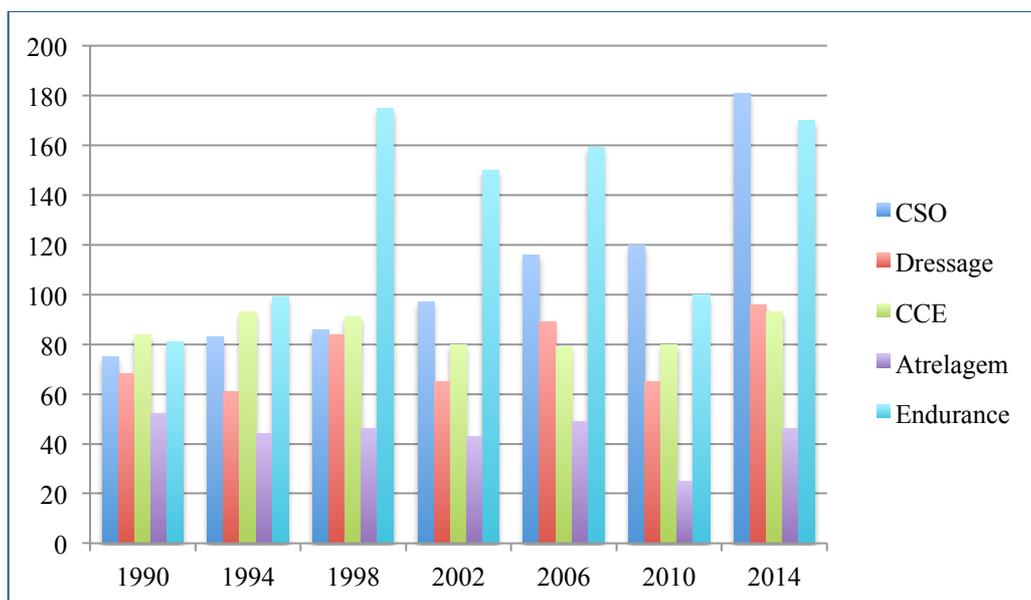


Gráfico 1: Evolução do número de participantes por disciplina equestre nos World Equestrian Games (adaptado de FEI, 2014).

No final da década de 1990, os países árabes aderiram a esta disciplina, e em 2002 já se faziam representar nos FEI World Equestrian Games, onde um dos filhos do Sheikh Mohammed (Emirados Árabes Unidos) conquistou a medalha de Ouro a título

individual (Emirates Equestrian Federation, 2014). Assim, o Médio Oriente ganhou destaque e tornou-se responsável pelo movimento de elevadas quantias monetárias devido a patrocínios, treino, compra e venda de cavalos (Smith, 2002). Deste modo, adquiriram particular influência na resistência equestre, pressionando o crescimento exponencial a nível desportivo, económico e mediático.

Acompanhar esta evolução representa um desafio para cavalos, cavaleiros, treinadores, proprietários e médicos-veterinários que em conjunto devem assegurar o bem-estar do cavalo, melhorar *performances*, minimizar lesões e desequilíbrios metabólicos (Nagy *et al.*, 2012). A disciplina de resistência equestre continua a ter taxas de eliminação elevadas (Nagy *et al.*, 2010). O atual nível de exigência físico tem originado relatos de elevadas taxas de desgaste dos melhores cavalos de resistência em treino, pelo que é necessário um contributo significativo da investigação sobre técnicas de treino que permitam aumentar a aptidão aeróbia e minimizar lesões, proporcionando a melhoria qualitativa da modalidade. No que diz respeito à componente médico-veterinária, surgem dúvidas quanto às diretrizes pelas quais se regem as suas avaliações, tornando-se imperativo perceber se estas estão a acompanhar adequadamente o ritmo evolutivo da disciplina (Coombs & Fisher, 2012). Em Julho de 2013, foi fundado o *Endurance Strategic Planning Group* (ESPG) para criar medidas que acompanhem a evolução da modalidade, entre as quais se encontram medidas com vista a tornar as decisões médico-veterinárias mais consistentes e objetivas, priorizando a proteção dos cavalos, a prática com maior controlo de *doping* e procurando proporcionar condições de concorrência equitativas a nível mundial (Nagy *et al.*, 2012). No entanto, seria também benéfico esclarecer cientificamente com que precisão é que os parâmetros atuais em que se baseiam as avaliações médico-veterinárias refletem o estado metabólico e ortopédico, e se existem novos parâmetros mais adequados, precisos e facilmente mensuráveis (Coombs & Fisher, 2012).

2.1.2. O cavalo de resistência equestre

No passado era comum encontrarem-se diversas raças a realizar provas de resistência equestre, mas atualmente, os Puro Sangue Árabe (PSA) e cruzados de PSA predominam, pois estes são cavalos de porte ligeiro mas robustos, com uma resistência

particular ao esforço (Liesens, 2014), o que lhes confere uma taxa de sucesso superior a outras raças (Fielding *et al.*, 2011).

A aparência e tamanho destes cavalos varia, de acordo com as suas origens, entre 145-160 centímetros de altura (Nagy *et al.*, 2012). Algumas das razões pelas quais os cavalos de linha árabe atingem níveis de desempenho superior prendem-se com o facto de suportarem bem variações de temperatura, apresentarem uma capacidade de arrefecimento mais eficiente, pois possuem uma pele muito fina, próxima do sistema vascular, atribuindo-lhes uma capacidade termorreguladora excepcional (Liesens, 2014), e por possuírem uma proporção maior de fibras musculares de contração lenta com um metabolismo aeróbio eficiente perante esforços moderados de longa duração (Robert, 2014).

Outra particularidade a considerar é a condição corporal, que pode ser avaliada numa escala de 1 a 9, sendo que 1 representa muito magro e 9 obesidade. Ao cavalo de resistência equestre está associada uma grande variedade na condição corporal dependendo do período em que o cavalo se encontra, seja de treino, de provas ou de descanso. É comum apresentarem-se um pouco gordos e pouco musculados no início da temporada e mais magros e musculados ao começarem as provas. Se os cavalos de resistência equestre se encontrarem com excesso de peso, a eliminação de calor fica dificultada, a sobrecarga nos membros aumenta e vão ter maior gasto energético durante o exercício. Por outro lado, uma condição corporal mais baixa, pode não assegurar reservas energéticas suficientes para terminar uma prova. Alcançar a condição corporal ideal no momento certo é um desafio. Um método fácil para acompanhar a condição corporal do cavalo é através da medição do perímetro torácico, nos cavalos puro sangue árabe ou cruzados de árabe, sendo que um aumento no perímetro torácico de um centímetro corresponde a um ganho de peso de cerca de três quilogramas (Atger, 2013). Em termos de morfologia e conformação, valoriza-se um cavalo equilibrado, bem proporcionado e bem apumado. Entre outras, as características pretendidas incluem uma tábua do pescoço devidamente equilibrada, uma espádua extensa e oblíqua, que torne o galope mais flexível, o garrote saliente e o dorso suficientemente forte para que permita uma boa amplitude nos andamentos (Liesens, 2014). O dorso do cavalo de resistência requer especial atenção uma vez que este se destaca dos cavalos de outras disciplinas por ter um número de horas de trabalho montado em treino e competição

muito superior. Assim, é importante encontrar um arreio adequado para cada cavalo, a fim de evitar problemas de dorso que estão na origem de claudicações cujo diagnóstico pode não ser simples, porque não existe uma relação direta entre a existência de lesão dorsal e a presença de sinais de dor; estes sinais de dor são influenciados pela qualidade do cavaleiro, regularidade e intensidade do trabalho e tolerância do cavalo (Atger, 2013).

Os metacarpos e metatarsos devem ser fortes e não muito longos para diminuir o risco de tendinites e fraturas. Os membros anteriores devem estar afastados o suficiente para que cumpram um movimento económico e amplo (Atger, 2013). No que diz respeito à garupa esta não deve ser muito horizontal, mas sim bem musculada e simétrica, os músculos das pernas devem formar massas musculares desenvolvidas e uniformes até ao tarso (Liesens, 2014). Os tarsos são importantes para a propulsão e qualidade do apoio, devendo o curvilhão apresentar um ângulo considerável, pois se for demasiado recto pode aumentar o risco de osteoartrite (esparvão ósseo) (Atger, 2013). Relativamente às extremidades dos membros, procuram-se cascos com boa qualidade, ou seja, bem formados, fortes e largos, simétricos tanto lateral como longitudinalmente, com uma rasilha bem marcada e centrada (Atger, 2013).

Em termos de andamentos, devem ser simétricos, ligeiros e harmoniosos (equilíbrio longitudinal). Preferem-se andamentos rasantes, com pouco gesto de joelho e suavidade na chegada ao solo. Tais aspetos são de extrema importância, tendo em conta que um animal que chega com violência ao solo, com pouca capacidade de amortecimento do impacto, tem maior predisposição para lesão de um dos vários componentes da extremidade distal (Atger, 2013).

A cavidade torácica deve ser mais profunda que larga, devendo o cavalo apresentar uma frequência cardíaca baixa em repouso (28 a 36 batimentos por minuto) e bons tempos de recuperação, os quais são fundamentais para um melhor desempenho (Liesens, 2014).

O cavalo puro sangue árabe tem um temperamento forte por isso é fundamental adaptar o cavalo, através do ensino e do treino, para que se deixe utilizar em prova, o que muitas vezes se descreve como conseguir um cavalo com “boa cabeça/tranquilo”. Pretende-se que consiga viajar sem *stress* excessivo para que não se magoe durante o transporte, que coma e beba nas provas, que não se esgote fisicamente nos primeiros

quilómetros do percurso com a excitação inerente à partida, que seja ambicioso mas sem ser incontrolável, não se esgotando ao ser ultrapassado por outros cavalos, que consiga descontraír nos períodos de descanso entre fases, que com a experiência se torne relativamente independente na escolha do caminho que segue, que tenha espírito de sacrifício e vontade de andar.

2.2 Bem-estar *versus* stress

2.2.1. Bem-estar animal

O bem-estar pode ser definido como um estado de equilíbrio dinâmico (homeostase) entre o animal e seu ambiente (interno ou externo) (Peeters, 2012). O bem-estar animal compreende o estado saudável, bem alimentado e sem sede, sem dor, ferimentos ou doença, confortável, sem medo ou sofrimento, e com possibilidade de manifestar o seu comportamento inato (AVMA, 2014). Assim, para assegurar o bem-estar animal, a relação entre humanos e animais deve resultar de um equilíbrio entre o conhecimento científico e a consideração de valores éticos e sociais, devendo estes ser continuamente avaliados para que sempre que necessário sejam criadas novas medidas (AVMA, 2014). Em 1989, a FEI formou o Comité de Revisão de Ética com o objetivo de assegurar a saúde e o bem-estar de cavalos participantes em concursos por si regulamentados. Durante os Jogos Equestres Mundiais de Estocolmo, em 1990, a FEI discutiu a criação dum Código de Conduta para todas as pessoas envolvidas no bem-estar de cavalos de competição, o qual entrou em vigor em Março de 1991. O Código de Conduta foi subsequentemente atualizado pelo Comité de Revisão de Ética e encontra-se incluído nos regulamentos, sendo recomendada a sua inserção nos programas de todos os eventos internacionais (FEI, 2014). O Código de Conduta da FEI considera que em todos os momentos o bem-estar do cavalo deve ser primordial e nunca deve ser subordinado à influência competitiva ou comercial (FEI, 2014). O código do bem-estar do cavalo definido pela FEI (2014) enumera os seguintes princípios:

1. Em todos os desportos equestres os interesses do cavalo devem ser considerados superiores a quaisquer outros;

2. O bem-estar do cavalo deve estar acima dos interesses dos criadores, treinadores, concorrentes, proprietários, apostadores, patrocinadores ou diretores do Concurso;
3. Todas as práticas de manejo e tratamentos médico-veterinários devem assegurar a saúde e bem-estar do cavalo;
4. Deverão ser permanentemente assegurados os mais elevados níveis de alimentação, saúde, higiene e segurança;
5. Deverão ser tomadas as medidas necessárias para assegurar uma adequada ventilação, alimentação, fornecimento de água e ambiente saudável durante o transporte;
6. Deve ser dada uma defesa especial ao ensino do treino e das práticas equestres e a promoção de estudos científicos sobre a saúde do cavalo;
7. No interesse do cavalo a habilidade e competência do cavaleiro deve ser vista como essencial;
8. Todos os métodos de montar e treinar devem ter em conta o cavalo como entidade viva e não devem incluir qualquer técnica considerada abusiva pela FEI;
9. As Federações Nacionais deverão implementar controlos adequados de forma a que todas as pessoas e grupos sob a sua jurisdição respeitem o bem-estar do cavalo;
10. As regras e regulamentos nacionais e internacionais do desporto equestre que respeitem a saúde e bem-estar do cavalo devem ser tidos em conta não somente nos Concursos mas também durante o treino. As normas regulamentares devem ser continuamente revistas de modo a assegurarem o bem-estar do cavalo.

A disciplina de resistência equestre tem regulamentos específicos impostos pela FEI que estão entre os mais rigorosos do mundo do desporto equestre. Nenhuma outra disciplina tem um nível de atenção tão elevado dos médicos-veterinários, trabalhando estes em conjunto com juizes e comissários durante todo o evento para salvaguardar o bem-estar do cavalo. A título de exemplo, durante uma competição de 160 km, a saúde e o bem-estar de um cavalo são verificados pelo menos 10 vezes por um painel de médicos-veterinários qualificados. Recentemente, surgiu o *Endurance Strategic Planning Group* (ESPG) que visa combater os problemas associados a esta disciplina tais como o *doping*

e o elevado número de lesões e mortes (FEI, 2014l). Este grupo propõe-se a fazer recomendações e apresentar estratégias que contribuam para: o desenvolvimento da disciplina, a segurança e bem-estar do cavalo, a educação de treinadores e cavaleiros, a criar legislações, a actuar durante as competições, e a ter um papel ativo na gestão das finanças, patrocínios, *marketing* e comunicação (FEI, 2014m).

2.2.2. Stress

O *stress* é um estado do organismo despoletado por estímulos endógenos ou exógenos que causam um desequilíbrio significativo da homeostase e que desencadeiam várias respostas biológicas (Fig. 4). De acordo com esta definição, alguns cientistas consideram o *stress* e o bem-estar versões opostas do mesmo processo (Peeters, 2012), enquanto outros referem que um potencial indicador de bem-estar animal é a ausência de *stress* (Veissier et al., 2007, referido por Peeters, 2012; Schwean, 2008;). Face ao exposto, o tema é hoje alvo de debate e não existem ainda definições padrão para estes conceitos, pelo que apenas é reconhecida uma íntima relação entre eles.

O *stress* pode ter um impacto positivo ou negativo no bem-estar animal. O impacto positivo é designado de *eustress*, e tem como exemplo o aumento da capacidade física (através da mobilização de energia) ou mental do indivíduo (motivação para o seu desempenho) e o impacto negativo é denominado de *distress* (Peeters, 2012).

Este processo pode desenvolver-se em três etapas sucessivas: a reação de alarme, desencadeada pelo sistema nervoso simpático com produção de catecolaminas; a fase de resistência, durante a qual há uma adaptação ao fator stressante com aumento dos níveis de cortisol para mobilização de defesas seguido de retorno aos valores basais por mecanismos de retroação negativo; e a fase de exaustão, se o contato com o fator causador de *stress* for prolongado, podendo ficar a atividade do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal deprimida (Peeters, 2012).

A reação biológica desencadeada combina quatro respostas: a resposta comportamental, a resposta do sistema nervoso autónomo, a resposta neuroendócrina e a resposta imunológica. Se o estímulo desencadeador de *stress* for de baixa intensidade, a primeira resposta é comportamental, por outro lado, se o estímulo for de maior intensidade ocorre a ativação do sistema nervoso simpático. Os parâmetros de análise para avaliação

do bem-estar e do *stress* nos animais são semelhantes e podem incluir as hormonas adrenais, a variação das frequências cardíaca e respiratória e a deteção de alterações do sistema imunológico. Algumas medidas etológicas também podem ser utilizadas para medir o *stress*, baseando-se na observação e comparação dos comportamentos expressos pelo animal (Peeters, 2012).

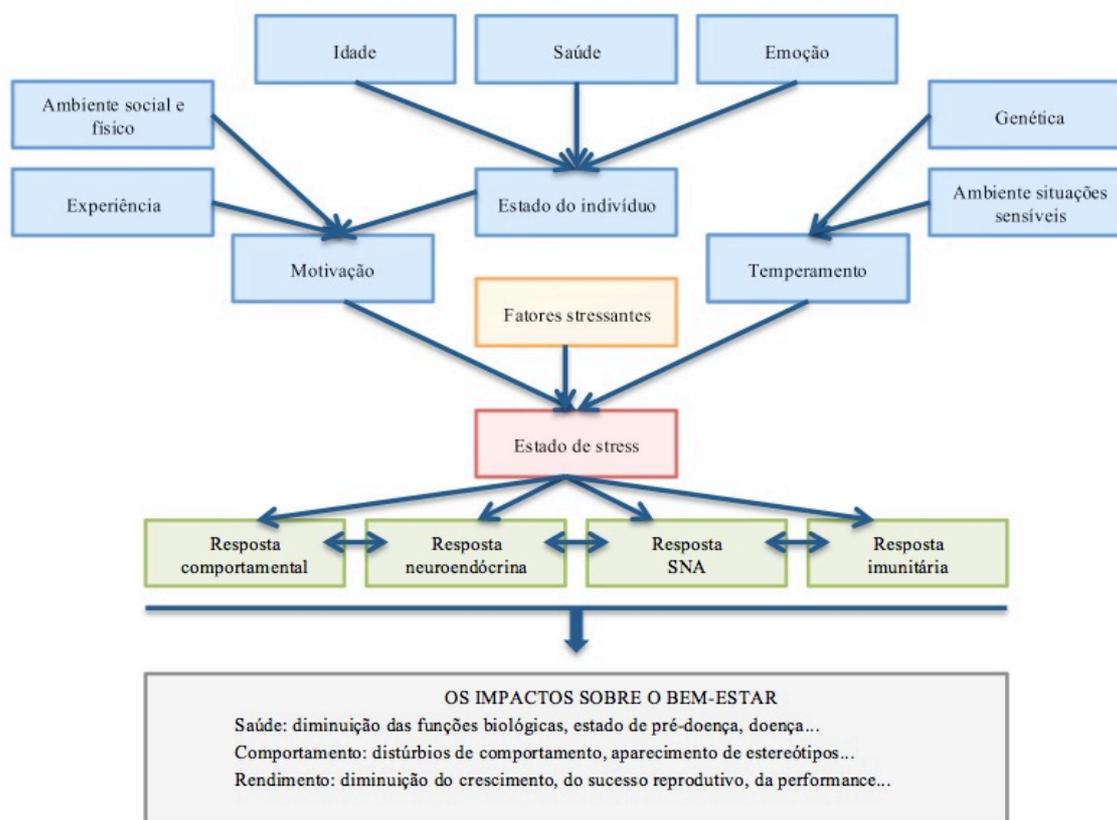


Fig. 4: Esquema das principais interações entre o indivíduo e os fatores internos e externos, as respostas desencadeadas pelo *stress* e os impactos sobre o bem-estar (adaptado de Peeters, 2012).

2.2.2.1. *Stress* agudo e crónico

A resposta ao *stress* envolve uma grande variedade de hormonas. Como mecanismo fisiológico o *stress* por si só não é inerentemente prejudicial, podendo mesmo ser necessário e benéfico (Möstl & Palme, 2002). Durante um curto período de *stress*, as hormonas libertadas visam melhorar as condições físicas através da mobilização de energia. No entanto, o *stress* crónico, ou seja, durante períodos prolongados pode

diminuir a aptidão individual por imunossupressão predispondo a ocorrência de doenças (Möstl & Palme, 2002).

O fator causador de *stress* pode ser pontual, intermitente ou contínuo e induzir *stress* agudo ou crónico. A diferença entre *stress* agudo e crónico é definida pela sua duração. O *stress* é considerado agudo quando há uma curta exposição a um fator stressante significativo, tendo como resposta o aumento dos níveis de cortisol passados alguns minutos. O *stress* crónico é comumente considerado o resultado de um processo contínuo, de longa duração, podendo ter efeitos prejudiciais até que o indivíduo recupere os recursos necessários para suprimir as necessidades biológicas e restaurar as funções alteradas (Peeters, 2012). Durante o *stress* crónico, as respostas podem variar. Por exemplo, algumas respostas comportamentais vão diminuir em resposta a uma adaptação cognitiva aos fatores stressantes e as diferentes respostas fisiológicas podem parar, voltar ao normal ou aumentar de acordo com a sensibilidade do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal. Quando o *stress* persiste, o indivíduo pode adaptar-se, desenvolvendo transtornos comportamentais por ansiedade ou depressão, ambos associados a um decréscimo do bem-estar o que pode ter efeitos significativos a nível biológico conduzindo o animal para condições de pré-doença. A fase de pré-doença é alcançada quando a resposta ao *stress* altera as funções biológicas de tal modo que o indivíduo fica suscetível ao desenvolvimento de doença. Assim, o *stress* pode não só reduzir o desempenho como pode promover úlceras gástricas, cólica, diarreia, inibir a inflamação, retardar a capacidade de reparação de tecidos danificados e predispor a doenças imunológicas, entre outros (Peeters, 2012).

2.3. Fisiologia do cavalo em exercício

Durante o exercício são desencadeadas várias respostas fisiológicas pelos diferentes sistemas no sentido de, entre outros, aumentar a disponibilidade de substrato energético, regular a temperatura corporal e manter o equilíbrio ácido-base e hidroeletrólítico dentro de limites aceitáveis (Votion, 2014).

O exercício frequente permite induzir adaptações fisiológicas que reduzem o efeito da tensão provocada por fatores de *stress* associados ao próprio exercício, obrigando o

organismo a reagir no sentido de minimizar as perturbações da homeostase e a aumentar a sua capacidade para lidar com a exigência do exercício. As respostas neuroendócrinas têm um papel fundamental não só para a realização do exercício, como para permitir estas adaptações fisiológicas e influenciar a recuperação do cavalo (Hinchcliff & Geor, 2008).

2.3.1. Energia

É a energia química libertada pela transformação de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina-difosfato (ADP) e fosfato inorgânico, por quebra de uma ligação fosfato, que possibilita o funcionamento do músculo. As reservas de ATP nas células musculares são limitadas e durante o exercício, de acordo com a sua intensidade e duração, o restabelecimento energético pode seguir diferentes vias metabólicas (Sena, 2007).

2.3.1.1. Vias metabólicas utilizadas

Para produção de energia as células podem utilizar, ou não, oxigénio (O_2) e produzir ácido láctico, ou não, como resíduo (Courtois, 2007).

A via anaeróbia participa em esforços de curta duração e grande intensidade, pois possibilita a produção muito rápida de uma pequena quantidade de energia, sem recorrer a oxigénio, com conseqüente produção de ácido láctico (envolvido na fadiga muscular) (Hinchcliff & Geor, 2008).

A via aeróbia, por sua vez, é usada durante esforços de longa duração, sendo portanto a via preferencialmente solicitada em provas de resistência, onde o fornecimento de energia recorre à oxidação de ácidos gordos e de hidratos de carbono (Robert, 2014). O resíduo resultante desta via metabólica é o dióxido de carbono (Hinchcliff & Geor, 2008).

2.3.1.2. Fontes de energia

As fontes de energia utilizadas são hidratos de carbono e lípidos. A contribuição destes substratos energéticos varia em função de vários fatores, tais como o nível de treino, a

composição muscular, a dieta (Hinchcliff & Geor, 2008) e também da intensidade e da duração do exercício (Robert, 2014).

Os hidratos de carbono são utilizados principalmente durante esforços intensos e no início de um esforço prolongado (Courtois, 2007). A glucose sanguínea está imediatamente disponível para utilização pelas células musculares mas a sua concentração diminui rapidamente no início do esforço. A hipoglicemia estimula, por um lado, a glicólise, ou seja, a degradação do glicogénio no fígado e no músculo (Robert, 2014) e, por outro, a gliconeogénese hepática que são as duas formas utilizadas pelo organismo para restabelecer os níveis de glucose no sangue e no músculo (Sena, 2007).

Os lípidos são usados principalmente durante um esforço longo de intensidade moderada. Estes representam a melhor fonte de energia para o metabolismo aeróbio, e portanto, para a resistência. A forma utilizável são os ácidos gordos livres que podem derivar diretamente dos triglicéridos musculares ou de lípidos presentes no tecido adiposo do organismo. Os ácidos gordos fornecem energia para a beta-oxidação nas fibras musculares, sendo a sua eficiência energética muito superior à dos hidratos de carbono por glicólise aeróbia. Assim, a utilização de ácidos gordos como fonte energética num metabolismo aeróbio limita a produção de resíduos, ou seja, a acumulação de ácido láctico e a fadiga muscular (Courtois, 2007).

O treino vai potenciar o aumento das reservas, musculares e hepáticas, de glicogénio e permite uma adaptação da utilização das diferentes vias metabólicas, tornando preferencial a utilização de ácidos gordos no exercício de resistência do cavalo (Sena, 2007).

2.3.2. Fibras musculares

Os músculos são constituídos por diferentes tipos de fibras musculares que variam na sua proporção (Rivero & Piercy, 2014). Os principais tipos de fibra são I, IIA e IIB. A composição muscular está inicialmente determinada geneticamente, contudo, a participação relativa das diferentes vias metabólicas e a percentagem do tipo de fibras constituintes dos músculos podem modificar-se de acordo com o treino, permitindo a adaptação ao tipo de esforço exigido. O treino de resistência está na origem de uma

modificação nas propriedades contráteis e, sobretudo, na capacidade oxidativa das fibras musculares, possibilitando o aumento substancial das fibras de contração intermédia em detrimento das fibras de contração rápida (Votion, 2014).

As fibras do tipo I são predominantemente utilizadas em esforços longos e pouco intensos (Courtois, 2007). Em condições aeróbias o seu desempenho é ótimo, tendo a capacidade de realizar combustão completa das substâncias energéticas, sem produzir resíduos. A sua eficácia perante esforços prolongados deve-se à capacidade de oxidar não só hidratos de carbono mas também lípidos. A limitação relativa à intensidade do esforço prende-se com o facto da sua contração ser lenta em conexão com um fluxo moderado de energia. Portanto, estas fibras são responsáveis por conferir resistência durante o esforço (Didelot, 2006).

Já as fibras tipo IIA estão envolvidas em esforços bastante intensos, durante bastante tempo (Rivero & Piercy, 2014). Estas fibras possuem propriedades metabólicas (velocidade de contração, força de contração e resistência à fadiga) intermédias. A energia provem quase exclusivamente da oxidação de hidratos de carbono. Possuem um bom metabolismo aeróbio, sofrendo maioritariamente combustão completa, e portanto, não causam acumulação significativa de ácido láctico conferindo alguma resistência à fadiga muscular (Didelot, 2006). Assim, ao apresentarem uma eficiência energética ótima, permitem a continuação de um esforço intenso, e uma vez que não se contraem tão rapidamente quanto as fibras do tipo IIB, são requeridas para assegurar a velocidade, sendo particularmente úteis para longos períodos de corrida (Rivero & Piercy, 2014).

As fibras do Tipo IIB são solicitadas durante esforços muito intensos mas de curta duração (Courtois, 2007). Estas fibras apresentam uma eficiência energética baixa, pois têm um potencial aeróbio baixo, o que pressupõe uma combustão a partir de hidratos de carbono, em grande parte anaeróbia e portanto pouco eficiente, levando à acumulação de ácido láctico, o que lhes confere pouca resistência à fadiga. Por outro lado, possuem uma capacidade de contração forte e muito rápida, o que as torna preferenciais no recrutamento para esforços muito intensos e de curta duração como um *sprint* (Didelot, 2006).

Outras fibras, tais como do tipo C, são formas imaturas capazes de evoluir no sentido de um dos tipos anteriormente referidos e explicar alguma variação nas diferentes proporções entre tipos de fibras (Sena, 2007).

2.3.3. Termorregulação

2.3.3.1. Produção de calor

O exercício provoca um aumento no metabolismo produzindo uma quantidade significativa de calor, sendo que 20% da energia produzida é convertida em trabalho mecânico e 80% em calor (Langlois, 2006).

Uma hipertermia moderada melhora a contração muscular, a elasticidade dos tendões, aumenta a velocidade de condução nervosa e modifica a atividade das enzimas musculares. Este aumento moderado da temperatura corporal está associado ao aumento da frequência cardíaca e também a um aumento da dissociação do oxigênio da hemoglobina, o que facilita o fornecimento de oxigênio ao músculo (Sena, 2007).

A produção de calor sofre influência de fatores individuais e ambientais, tais como a radiação solar, temperatura ambiente, humidade e vento. O risco de *stress* por calor depende do nível de treino do cavalo (Larson *et al.*, 2013) e aumenta quando as condições climáticas são extremas. O treino promove a adaptação dos cavalos e dos seus mecanismos de dissipação de calor ao ambiente em que se encontram minimizando qualquer efeito deletério subsequente à produção de calor (Didelot, 2006).

2.3.3.2. Mecanismos de termorregulação

Durante o exercício, os mecanismos de termorregulação sofrem influência direta dos centros de termorregulação localizados no hipotálamo. Este recolhe e integra os vários estímulos provenientes de vários termorreceptores periféricos e centrais, induzindo a ativação dos efetores primários que são o sistema circulatório e as glândulas sudoríparas (Didelot, 2006).

Com exceção do aumento agudo de cerca de 4°C observada durante um *sprint* de um a três minutos, e que rapidamente se dissipa após cessar esse período do exercício, o corpo não tolera grandes amplitudes térmicas (Didelot, 2006). Assim, a produção de calor deve ser compensada por mecanismos de dissipação. Estes realizam-se segundo diferentes mecanismos físicos que ocorrem em proporções variáveis de acordo com a intensidade do exercício e as condições ambientais em que se realizam (Courtois, 2007).

- **Condução:** o calor é perdido em função da diferença de temperatura. Uma vez que o ar apresenta baixa condutividade térmica, esta via é praticamente insignificante em cavalos de resistência. Pode referir-se que ocorre principalmente na cabeça, pescoço e membros, sob a influência direta e proporcional da temperatura da pele e inversamente proporcional à sua espessura (McCutcheon & Geor, 2014).
- **Convecção:** o ar aquecido pelo contato com o corpo quente é mais leve, sobe, permitindo assim a dissipação do calor. Este mecanismo é limitado pela presença de pêlos mas é potencializado quando há vento e favorecido por pele fina como a dos cavalos de linha árabe (Courtois, 2007).
- **Radiação:** o corpo pode eliminar calor através de radiação eletromagnética. No entanto, a exposição a radiação solar contribui para a aquisição de calor e no caso de ser muito intensa pode representar até 15% da produção total de calor metabólico (McCutcheon & Geor, 2014).
- **Evaporação:** o calor é dissipado pela passagem da água do estado líquido ao estado gasoso. Esta reação consome energia mas esta depende do gradiente de pressão do vapor de água entre a superfície corporal, o ambiente e o fluxo de ar existente na superfície do corpo (Didelot, 2006).

O principal mecanismo de termorregulação em cavalos de resistência é a evaporação tendo como principais fenômenos a taquipneia e a sudação (McCutcheon & Geor, 2014).

A taquipneia permite a dissipação até cerca de 30% do calor por evaporação da água da superfície das mucosas respiratórias (Langlois, 2006). Este fenômeno pode ser comprometido quando há desidratação devido às alterações na composição sanguínea e atividade cardíaca (Sena, 2007).

A produção de suor é induzida pelo sistema nervoso simpático, ocorrendo estimulação dos recetores beta-adrenérgicos pelos mediadores noradrenalina e adrenalina (Didelot, 2006). Através da sudação, até 65% do calor produzido é dissipado por evaporação da água à superfície da pele (McCutcheon & Geor, 2014). Uma vez que a produção de suor requer um suprimento em água e o estado de hidratação não limita a produção de suor no cavalo, o risco de desidratação é muito significativo (Sena, 2007).

A eficiência deste mecanismo depende de fatores individuais e ambientais. Se por um lado quando os níveis de humidade no meio ambiente são baixos este mecanismo é altamente eficaz, pelo contrário, uma humidade elevada reduz o diferencial de pressão de vapor e portanto minimiza a evaporação aumentando o risco de *stress* (Didelot, 2006).

2.3.4. Consequências metabólicas do exercício prolongado

2.3.4.1. Efeitos sobre o equilíbrio hidroeletrólítico

A sudação é o principal mecanismo de dissipação de calor durante o exercício. A produção de suor varia com as condições meteorológicas, perante um clima quente e húmido a sudação é estimulada porque a evaporação ocorre mais lentamente. A produção de suor excessiva pode ser responsável por desidratação grave. A perda de peso em água aumenta gradualmente durante o percurso (Langlois, 2006). Durante uma competição um cavalo pode perder 10 a 15 litros de água por hora (correndo a 16 Km/h) ou 2 a 3,5% do peso corporal, o que no final da prova pode corresponder a um défice de 25 a 50 litros de água e a uma perda de 4 a 7% do peso corporal (em competições de 80-160 km) (Robert, 2014).

Sendo essencialmente composto por água e iões, o suor do cavalo, ao contrário de outras espécies, é hipertónico. A sua composição compreende níveis relativamente baixos de cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e fósforo (PO_4^{4-}), mas níveis elevados de sódio (Na^{2+}), potássio (K^+) e cloro (Cl^-) (Robert, 2014). Com exceção do fósforo e do sódio, os restantes iões encontram-se em concentrações significativamente mais elevadas no suor do que no plasma (Sena, 2007). A concentração de sódio (Na^{2+}) é equivalente no suor e no plasma, as concentrações de iões cloro (Cl^-) e de potássio (K^+) vão ser, respetivamente, de 1,5 a 3 vezes e de 10 a 20 vezes mais elevadas no suor do que no plasma (Courtois, 2007). O suor dos equinos também contém uma proteína, a *latherin*, que facilita a dispersão e evaporação do suor (Sena, 2007). Assim, através da sudação ocorrem acentuadas perdas hidroeletrólíticas, que estão aumentadas numa competição uma vez que o *stress* implícito leva ao aumento dos níveis de cortisol no sangue que aumentam a sudação (Langlois, 2006).

Durante uma competição as concentrações iónicas séricas do potássio, cloro e cálcio diminuem significativamente, enquanto o sódio sérico pode diminuir ou permanecer estável dependendo, entre outros fatores, das condições ambientais (Courtois, 2007).

Uma vez que o sódio desempenha um importante papel na homeostasia, grandes perdas vão afetar o sistema circulatório, observando-se uma redução na pressão arterial, aumento no tempo de repleção capilar e da frequência cardíaca, com consequente prejuízo na perfusão dos órgãos (Robert, 2014). Em resposta à desidratação a perda de sódio induz a sua reabsorção a nível renal com excreção de potássio e de hidrogénio em troca. Portanto as perdas de grandes quantidades de potássio ocorrem devido à sudação e a nível renal em troca da reabsorção de Na^{2+} . Para além destas causas, a elevação dos níveis de cortisol no sangue relacionados com o *stress* aumenta a sudação e a diurese e contribui para uma maior perda de K^+ . A fim de compensar estas perdas de K^+ , verifica-se a saída destes iões do interior das células para o espaço extracelular com consequente aumento da concentração plasmática de K^+ . A hipercalemia é responsável pela alteração do potencial de membrana, e por conseguinte de arritmias e irritabilidade muscular (Robert, 2014).

A perda de iões cloro no suor é paralela à perdas de iões de sódio. O ião cloro é normalmente o principal ião reabsorvido a nível renal, e na sua ausência, é o bicarbonato (HCO^{3-}) que é reabsorvido. Este facto explica porque é que a concentração dos iões cloro no plasma varia conforme os níveis de iões sódio e inversamente aos de bicarbonato. A conservação renal de bicarbonato visa manter a eletroneutralidade dentro dos valores normais (Larsson *et al.*, 2013)

O cálcio presente no sangue é composto por cálcio ionizado (50%) e cálcio ligado a proteínas (50%). A hipocalcemia induz importantes alterações na difusão de sódio, causando aumento da excitabilidade dos nervos e um aumento das contrações musculares involuntárias (Sena, 2007).

A sudação também conduz a hipomagnesiemia, que provoca uma alteração no potencial de repouso do sistema nervoso responsável por irritabilidade neuromuscular e, por vezes, espasmos musculares e tetania (Langlois, 2006).

A concentração de fósforo é baixa no suor e o impacto sobre os valores sanguíneos é moderado. Em contraste, durante o exercício e com a desidratação, a sua concentração

plasmática tende a aumentar devido à desfosforilação de adenosina trifosfato (ATP) e da creatina fosfato (Langlois, 2006).

Em suma, durante uma competição, a perda de água através da sudorese estão associadas a perdas eletrolíticas significativas surgindo desequilíbrios hidroeletrólíticos (Sena, 2007).

2.3.4.2. Efeitos sobre o equilíbrio ácido-base

Uma prova de resistência decorre essencialmente segundo um metabolismo aeróbio, pelo que se produzem quantidades insignificantes de ácido láctico e não se verifica predisposição para a ocorrência de acidose metabólica durante este tipo de exercício. No entanto, diferentes mecanismos podem levar à alcalose (Langlois, 2006).

Como já foi referido, através dos mecanismos de termorregulação, o calor produzido pelo trabalho muscular em parte é dissipado através da taquipneia. O aumento da frequência respiratória é acompanhada por um aumento da ventilação alveolar que conduz à alcalose respiratória (Langlois, 2006).

Além disso, a desidratação provocada pela sudorese causa a perda significativa de eletrólitos, o que provoca uma reabsorção de iões de sódio pelos rins com excreção de iões de potássio e de hidrogénio (sendo que a diminuição de iões de hidrogénio contribui para o aumento do pH). Para compensar a hipocloremia, os rins também reabsorvem bicarbonato. Ambos os mecanismos contribuem para a ocorrência de alcalose metabólica (Courtois, 2007).

Assim, a sudorese e a taquipneia são os principais mecanismos de dissipação do excesso de calor produzido durante uma prova de resistência, mas se por um lado são essenciais para a sobrevivência do cavalo, podem conduzir a graves desequilíbrios hidroeletrólíticos e ácido-base responsáveis por várias alterações metabólicas (Langlois, 2006).

2.3.4.3. Efeitos sobre a circulação sanguínea

Durante o exercício, grandes volumes de sangue são dirigidos aos músculos para permitir as trocas gasosas, o fornecimento de substratos energéticos, a remoção dos resíduos metabólicos e a dissipação de calor (Courtois, 2007).

O fluxo sanguíneo permite a transferência de calor por condução. O aumento deste está sob controle do sistema nervoso simpático. Perante o aumento do calor, ocorre aumento da frequência cardíaca e vasodilatação, com redirecionamento progressivo do fluxo sanguíneo para tecidos superficiais, tais como a pele e constituintes do sistema respiratório, o que possibilita uma maior transferência de calor para a atmosfera através do aumento da evaporação (Sena, 2007).

Esta alteração na distribuição de sangue ocorre em detrimento de outros órgãos. Os intestinos são particularmente afetados ficando com a sua perfusão diminuída; em paralelo, com o prolongamento do exercício surge a desidratação e consequentemente aumenta a viscosidade do sangue, o que compromete gravemente as estruturas intestinais, podendo levar ao desenvolvimento de cólica (Courtois, 2007).

O débito cardíaco aumenta proporcionalmente à intensidade do exercício com o aumento da frequência cardíaca. O tempo de enchimento ventricular fica muito curto mas o débito cardíaco pode aumentar devido à enorme capacidade de reserva no coração. Esta diminui significativamente quando a temperatura exterior é alta devido à diminuição do volume plasmático causado pelas muitas perdas de fluidos induzidas pela sudorese, que ocorrem durante o exercício prolongado. O treino de cavalos de resistência parece induzir um aumento do volume plasmático e, portanto, pode manter o débito cardíaco durante o esforço prolongado e, assim, melhorar a termorregulação. É esta a razão porque cavalos de resistência a competir a alto nível, por vezes, têm uma diminuição do hematócrito sem uma diminuição no número de glóbulos vermelhos e de hemoglobina. O treino também permite diminuir a frequência cardíaca para uma determinada intensidade de esforço e além disso, aumenta o intervalo de tempo até que a frequência cardíaca máxima é atingida (Sena, 2007). Ainda assim, durante a competição, os níveis de hematócrito e creatinina podem surgir aumentados como resultado da hemoconcentração resultante da desidratação, da contração esplênica e da diminuição da perfusão renal (Courtois, 2007). Portanto, os cavalos em fadiga podem sofrer alterações hemodinâmicas significativas (Parot, 2011).

2.3.4.4. Efeitos sobre o sistema respiratório

Durante o exercício o aumento da frequência respiratória deve ser proporcional ao esforço. A eficácia da ventilação alveolar em taquipneia é questionável pois esta pode ser ineficiente e recorrer a forças mecânicas que requerem muita energia. O aumento da frequência respiratória deve estar associado ao aumento da amplitude respiratória para que a superfície pulmonar seja otimizada, melhorando a ventilação alveolar. Assim, o cavalo da resistência torna-se mais eficiente ao aumentar a amplitude dos movimentos respiratórios mais do que a frequência da respiração (Didelot, 2006).

Tem sido demonstrado que o treino não melhora diretamente a função pulmonar, o que se poderia tornar um fator limitante para a melhoria do rendimento desportivo do cavalo (Sena, 2007). No entanto, como os vários sistemas estão inter-relacionados essa limitação é ultrapassada pelo aumento do débito cardíaco e aumento do volume de glóbulos vermelhos que asseguram assim uma maior oxigenação (Hinchcliff & Geor, 2008).

2.3.5. Fisiopatologia de possíveis afeções associadas à prova de resistência

Embora patologias músculo-esqueléticas possam ocorrer em qualquer fase da prova de resistência, a maioria das situações de emergência envolvem problemas metabólicos. Esta disciplina combina exercício de longa duração, velocidade, percursos com diversos desafios e diversas condições ambientais com perda de fluidos e eletrólitos que predispõe ao desenvolvimento do complexo síndrome do cavalo exausto (Fig. 5). As perdas de fluidos e eletrólitos neste síndrome têm como resultado a diminuição do volume sanguíneo e aumento da viscosidade, o que leva a uma perfusão tecidual inadequada (Langlois, 2006).

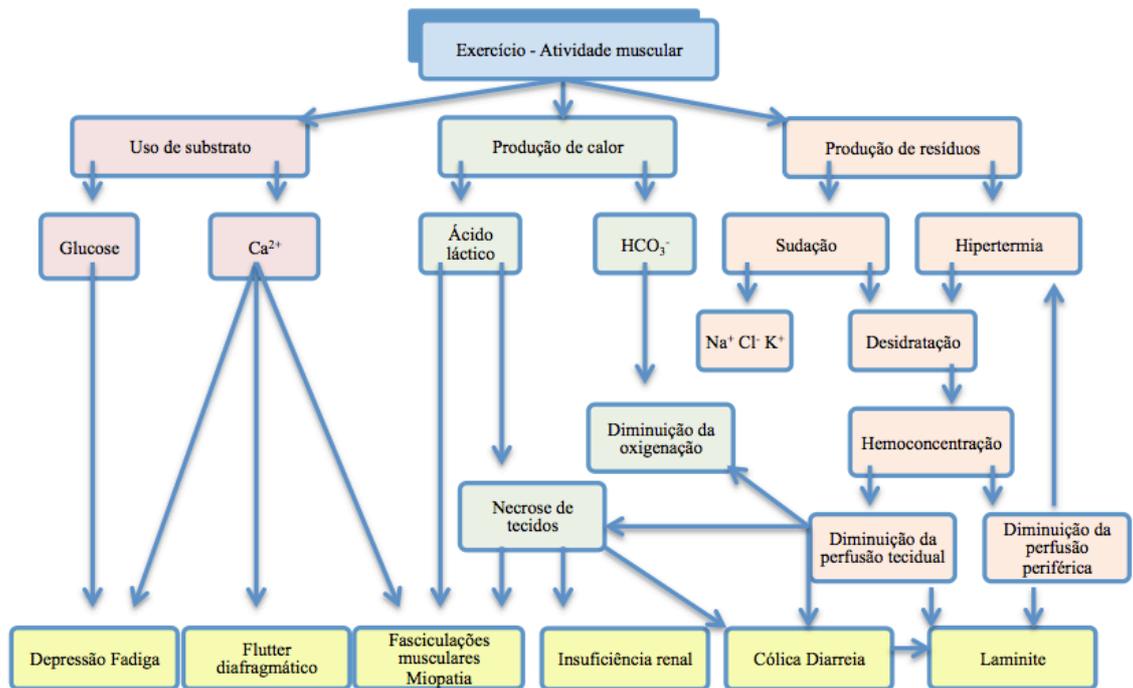


Fig. 5: Esquema das possíveis sucessões de eventos que conduzem a diferentes afecções metabólicas no cavalo de resistência (adaptado de Robert, 2014).

A diminuição da disponibilidade de substrato energético para os músculos leva à ocorrência de lesões musculares. A hipoperfusão renal, em conjunto com os efeitos adversos da mioglobina circulante (devido a lesão muscular) podem levar a insuficiência renal (Langlois, 2006). A diminuição da perfusão intestinal pode contribuir para má absorção de fluidos administrados por via oral e, por vezes, para diarreia. A perda de fluidos na diarreia e endotoxemia agravam ainda mais o problema de desidratação, podendo levar ao desenvolvimento de choque e laminite. Pode também ocorrer impactação do cólon ou do ceco devido à gravidade da desidratação e da mobilização das reservas de água do cólon na tentativa de restabelecer o volume sanguíneo. As extremidades distais dos membros podem ser mais suscetíveis aos efeitos combinados de desidratação e do início da coagulação intravascular, que conduzem ao desenvolvimento de laminite. Perdas substanciais de eletrólitos promovem irritabilidade neuromuscular, com atividade muscular espontânea (fasciculação muscular), arritmias cardíacas e *flutter* diafragmático. A desidratação dificulta a termorregulação, pois fica menos fluido extracelular disponível para circular conduzindo o calor à superfície da

pele, onde o perderia por evaporação, agravando assim o problema de sobreaquecimento em cavalos exaustos (Robert, 2014).

Em resumo, existem diferentes graus de comprometimento metabólico, variando de muito leve e quase imperceptível a extremamente grave e fatal. Um cavalo pode assim ser afetado por *flutter* diafragmático, miosite, insuficiência renal aguda, cólica, *stress* por calor ou prostração, tendo também potencial para desenvolver laminite (Courtois, 2007).

2.3.5.1. Fatores de risco de eliminação

As provas de resistência equestre têm elevadas taxas de eliminação que chegam a ultrapassar os 50%, ocorrendo a eliminação por um de três motivos. A principal causa de eliminação é a presença de claudicação, que ocorre quando um cavalo tem uma claudicação consistente ao trotar em linha reta na grelha médico-veterinária. A segunda maior causa de eliminação é a eliminação por razões metabólicas, que ocorre quando um cavalo não cumpre ou excede os critérios determinados pela FEI para avaliação médico-veterinária, ou quando revela sinais de incapacidade de continuar (como por exemplo, *flutter* diafragmático e rabdomiólise) (Nagy *et al.*, 2010). Por último, os cavalos podem ser eliminados pelo incumprimento do regulamento (como não cumprirem a velocidade mínima obrigatória), lesão do cavaleiro ou podem ser retirados por opção do mesmo (Fielding *et al.*, 2011). No gráfico 2 é possível analisar os registos da FEI, para provas de 100-160 km que decorreram entre 2008 e 2011, relativos a 47 países, quanto à evolução das taxas de sucesso e de eliminação por claudicação, razões metabólicas ou outros motivos (Nagy *et al.*, 2013a). Embora, a maioria dos cavalos sejam eliminados antes de ocorrer uma lesão substancial, alguns necessitam de tratamento médico de emergência no local da prova ou mais tarde pelo seu médico-veterinário pessoal (Fielding *et al.*, 2011).

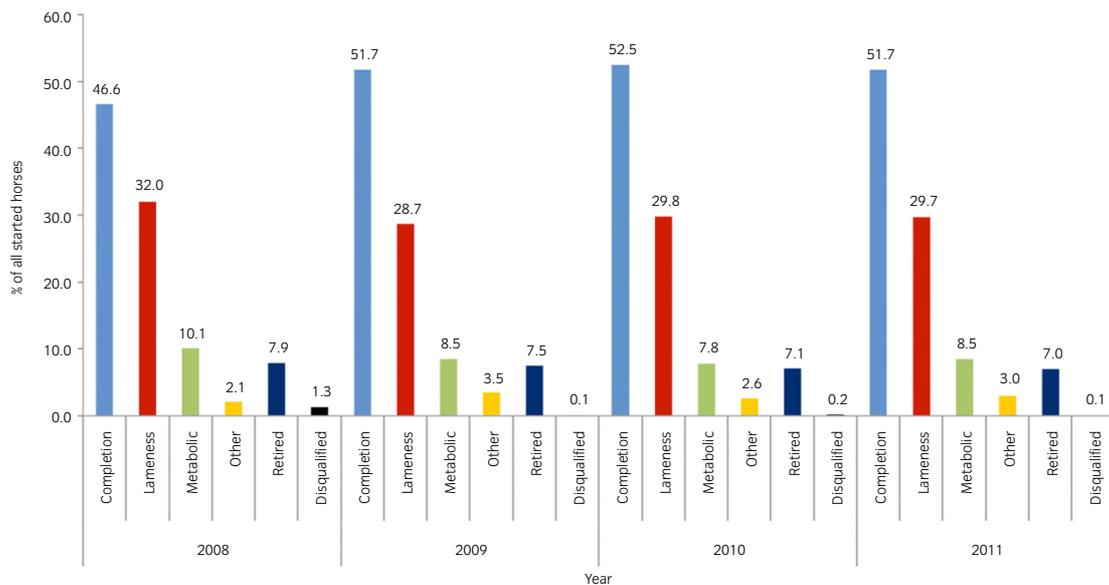


Gráfico 2: Registos da FEI, para provas de 100-160 km que decorreram entre 2008 e 2011, relativos 47 países, quanto à evolução das taxas de sucesso (azul claro) e de eliminação por claudicação (vermelho), razões metabólicas (verde) ou outros motivos (amarelo), retirados (azul escuro) ou desclassificados (preto) (Nagy *et al.*, 2013a).

A evolução das velocidades, cada vez maiores, praticadas nas competições de resistência tem sido uma fonte de preocupação constante, levantando questões relacionadas com o bem-estar dos cavalos. Tem-se relacionado o aumento da velocidade com o aumento número de lesões ortopédicas e sugere-se que os tipos de lesões mudaram e aumentaram em gravidade, mas são necessários mais estudos para confirmar estas informações empíricas e que implicam a participação ativa dos proprietários, treinadores e cavaleiros (Nagy *et al.*, 2013b). Verificou-se que em três das principais provas que decorreram entre 2009 e 2011, as velocidades a que foram ganhas variaram bastante (19.6 km/h, 21.1 km/h e 18.5 Km/h,) sugerindo que a criação de percursos tecnicamente mais difíceis potencialmente baixa as velocidades médias (Nagy *et al.*, 2012).

O risco de eliminação está significativamente associado com o tempo de viagem, o país onde ocorre a competição, o ano em que ocorre, os quilómetros percorridos, o número de cavalos que iniciam a prova, a experiência do cavaleiro e o controlo médico-veterinário (Nagy *et al.*, 2013a).

O transporte por longas distâncias induz *stress*, com perda de água e eletrólitos, imunossupressão e esforço muscular de forma semelhante ao que acontece durante a

competição; assim, o tempo de transporte pode aumentar o risco de eliminação do cavalo (Courtois, 2007). A diferentes países correspondem diferenças meteorológicas e de terreno consideráveis que têm um efeito significativo sobre as taxas de eliminação, tanto por claudicação como por razões metabólicas. Por outro lado, o risco de eliminação associado aos países também pode ser analisado sob uma perspectiva relacionada com a equitação, ou seja, os métodos de treino, a formação dos cavaleiros, o seu estilo de montar e a competitividade. O ano em que ocorre tem importância porque a rápida evolução da disciplina está associada à crescente exigência desportiva. A distância percorrida em prova é também proporcional ao risco de eliminação (Nagy *et al.*, 2010). Um grande número de participantes aumenta o espírito competitivo e tem efeitos sobre a estratégia da prova e sobre a velocidade, o que se traduz num aumento da ocorrência de claudicações e desequilíbrios metabólicos com subsequente eliminação. Contudo é importante não descuidar a hipótese de que quando há um maior número de cavalos em prova, a probabilidade de haver cavalos que não estão preparados para a competição aumenta (Nagy *et al.*, 2013a). A experiência dos cavaleiros é um fator influente a considerar, no entanto, a forma em concreto de como exerce a sua influência ainda não está confirmada (Nagy *et al.*, 2010). A qualidade do controlo médico-veterinário também tem impacto no risco de eliminação, sendo que para o diminuir não basta realizar um exame cuidadoso, sendo crucial o registo de todos os parâmetros avaliados (Fielding *et al.*, 2011).

2.4. Metabolismo neuroendócrino durante o exercício

2.4.1. O sistema hipotálamo-hipófise-adrenal

Os cavalos que praticam provas de resistência estão sujeitos a um exercício prolongado com níveis de intensidade moderados, o que traduz um gasto energético elevado com diminuição substancial da concentração de glicose, menor absorção de oxigénio a nível muscular e maior necessidade de eliminação de subprodutos metabólicos e de calor. O exercício representa assim uma situação de *stress* que leva à ativação de mecanismos compensatórios pelo organismo (Hyyppä, 2005) e que na totalidade compreendem a

coordenação dos vários sistemas, nervoso, endócrino, respiratório, cardiovascular, muscular, renal, hepático e digestivo (McKeever & Gordon, 2008).

A homeostase funcional durante a realização de exercícios de alta intensidade e/ou resistência está profundamente dependente da ação conjunta do sistema nervoso central e endócrino, tendo o hipotálamo e a hipófise como unidade funcional de integração com ação sobre as glândulas adrenais. Portanto o *stress* leva à ativação do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (Van der Kolk, 2014). A nível hipotálamo-hipófise as hormonas de maior relevância são a hormona libertadora de corticotrofina (CRH), produzida pelo hipotálamo, e a hormona adrenocorticotrófica (ACTH), produzida pela hipófise anterior (Hyypä, 2005). A nível adrenal as hormonas produzidas estão dependentes do tipo de resposta desencadeada. A resposta mediada pelo sistema nervoso simpático ocorre rapidamente e tem ação sobre neurónios simpáticos pós-ganglionares e sobre a medula adrenal estimulando a produção de catecolaminas; a resposta neuroendócrina é mais demorada e resulta da ação da ACTH no córtex adrenal estimulando-o a produzir glucocorticoides (Reece, 2005).

2.4.2. Catecolaminas

As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) estão envolvidas na regulação do metabolismo, produzindo, entre outras, respostas que permitem o ajuste a situações de *stress* agudo. As respostas desencadeadas por estas hormonas são mediadas por recetores adrenérgicos presentes em vários tecidos. Apesar dos recetores adrenérgicos variarem em tipo (α e β) e em número, são responsivos a ambas as catecolaminas possibilitando assim que uma determinada catecolamina desencadeie respostas variáveis (Greco & Stabenfeldt, 2004). Estudos recentes revelam que os níveis plasmáticos de catecolaminas aumentam de forma curvilínea com o aumento da intensidade do exercício (McKeever & Gordon, 2008). Contudo, as duas catecolaminas diferem no momento em que são libertadas, verificando-se que a libertação de noradrenalina se inicia durante o exercício de intensidade mais baixa e a libertação de adrenalina durante o exercício de maior intensidade (Hyypä, 2005).

As catecolaminas permitem aumentar a disponibilidade de oxigénio através do aumento do débito cardíaco conseguido pelo aumento da frequência cardíaca, aumento da força

de contração do miocárdio (Martin & Nankervis, 2002), aumento do fluxo sanguíneo, aumento de glóbulos vermelhos provenientes da contração esplénica e vasodilatação (McKeever & Gordon, 2008); do aumento da frequência respiratória e dilatação dos bronquíolos (Hyypä, 2005). Associado ao aumento da frequência respiratória, à dilatação dos bronquíolos e ao aumento do fluxo sanguíneo as catecolaminas participam na termorregulação ao promover a taquipneia e a sudação (Hyypä, 2005). As catecolaminas também facilitam a transmissão neuromuscular no músculo esquelético e estimulam os processos contráteis das fibras de contração rápida (Martin & Nankervis, 2002).

Do ponto de vista do metabolismo energético, as catecolaminas têm a capacidade de: promover a glucogenólise hepática e no músculo esquelético; de interferir na inibição da secreção de insulina, e conseqüentemente de promover a lipólise das células adiposas (uma vez que a insulina é um inibidor da lipase hormono-sensível, quando diminui, deixa a enzima disponível para atuar sobre as células adiposas); de estimular a secreção de glucagon pelo pâncreas, que por sua vez estimula a degradação de proteínas e a liberação de aminoácidos que podem ser usados como uma fonte energética pelo fígado, estimulando a gliconeogénese (McKeever & Gordon, 2008). Conseqüentemente, ocorre o aumento das concentrações de glicose e de ácidos gordos não esterificados no sangue, ficando estes disponíveis para o contínuo fornecimento de energia necessário durante o exercício e atrasando o aparecimento de fadiga (Larsson *et al.*, 2013).

2.4.4. Cortisol

O cortisol é a principal hormona glucocorticoide produzida no córtex adrenal devido à ação da ACTH em condições de *stress*, mas ao contrário das catecolaminas parece refletir melhor a duração do esforço do que a intensidade (Hyypä, 2005).

O cortisol é particularmente importante para aumentar a disponibilidade de substrato energético durante o exercício. Os seus efeitos incluem a inibição de síntese proteica, com aumento do catabolismo e conseqüente liberação de aminoácidos, ficando estes disponíveis como recurso para a síntese de novas proteínas necessárias na reparação do músculo e substituição de enzimas utilizadas nas diversas vias metabólicas (McKeever & Gordon, 2008). Para além disso, o cortisol potencializa os efeitos das catecolaminas

promovendo a glicogenólise hepática e no músculo-esquelético, inibindo a secreção de insulina e estimulando a secreção de glucagon pelo pâncreas e a lipólise do tecido adiposo (Greco & Stabenfeldt, 2004). A nível hepático, destaca-se igualmente a capacidade do cortisol para promover a gliconeogénese contribuindo assim para o restabelecimento do glicogénio hepático e muscular e da glicose plasmática (Greco & Stabenfeldt, 2004).

O cortisol tem também ação imunossupressora e anti-inflamatória, sendo que um ligeiro aumento dos seus níveis durante o treino pode proporcionar tolerância a pequenas "lesões musculares" estimulando assim uma resposta adaptativa ao exercício. Por outro lado, aumentos excessivos ou tempos de recuperação dos níveis de cortisol muito prolongados, já revelam exercício num nível demasiado elevado e podem levar a uma imunossupressão que predisponha o animal a doenças (Van der Kolk, 2014).

2.4.3.1. Influência de fatores externos e internos

Sendo o cortisol um indicador de *stress* influenciado por diversos fatores, cuja variação visa estimular o organismo a produzir uma série de respostas em função de uma adaptação, torna-se imperativo identificá-los e discuti-los para posterior análise da possível correlação com o desempenho desportivo.

- Ritmo circadiano

Em cavalos, assim como em outros animais e seres humanos, a intensidade de muitos processos biológicos varia de acordo com o ritmo circadiano, que corresponde a um período de 24 horas, sendo influenciado principalmente pela variação da luz e temperatura entre o dia e a noite.

O ritmo circadiano foi recentemente analisado em cavalos durante um estudo realizado por Janczarek (2013), na Hungria, no final de Agosto, com períodos de luz de 14 horas e ausência de luz de 10 horas, onde 20 cavalos (cl clinicamente saudáveis) sofreram a menor manipulação possível evitando distúrbios desnecessários. Como é possível verificar através do gráfico 3 verificaram-se níveis de cortisol máximos na parte da manhã, enquanto que os valores inferiores ocorreram durante a noite. No entanto, este estudo reconhece a limitação do número de ciclos avaliados e a necessidade de

pesquisar a causa desta flutuação, pois há estudos que não reconheceram o ritmo circadiano em cavalos e outros referem que o ritmo circadiano é interrompido se a rotina diária dos cavalos for alterada (Bohák *et al.*, 2013; Becker-Birck *et al.* 2013). Ao contrário das disciplinas de ensino, obstáculos e completo (Strzelec *et al.*, 2011), não foi encontrado um estudo que analise o efeito de uma prova de resistência sobre o ritmo circadiano.

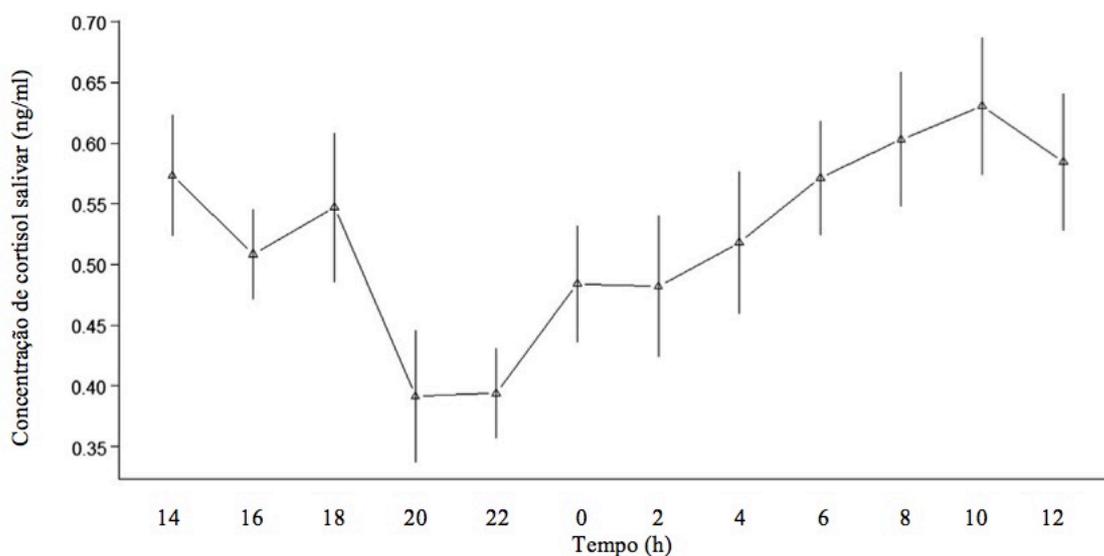


Gráfico 3: Perfil de variação da concentração de cortisol salivar durante 24 horas em 20 cavalos no seu ambiente normal (Bohák *et al.*, 2013).

- Temperamento

Os valores basais de cortisol salivar diferem em grande parte entre os indivíduos (Peeters *et al.*, 2013). Um fator determinante para esta variabilidade inter-individual é o temperamento, em parte determinado geneticamente. O temperamento condiciona a maior ou menor intensidade com que um animal recebe um estímulo como uma ameaça à sua homeostase (Peeters, 2012), e portanto, podem existir variações significativas na secreção de cortisol (Janczarek *et al.*, 2013). Desta forma, para uma avaliação concreta perante fatores de *stress* é recomendado medir os valores basais de cada indivíduo antes de serem sujeitos aos mesmos (Peeters *et al.*, 2013).

- Género

Relativamente ao género, o estudo de Janczarek (2013) avaliou a sua influência nos

níveis de cortisol durante uma prova de resistência, tendo verificado valores mais baixos nos garanhões do que nas éguas e cavalos castrados. No entanto, está descrito que as variações dos níveis de cortisol devidas ao género só são significativas quando avaliadas éguas gestantes ou no período pós-parto, pelo aumento da disponibilidade da globulina de ligação aos corticosteróides (CGB) (Peeters, 2012).

- Idade e experiência

A idade e a experiência são dois fatores inter-relacionados. Os cavalos mais velhos apresentam níveis de cortisol mais baixos (Nogueira *et al.*, 2002), este resultado está em diversos estudos associado à experiência ou ao fenómeno de *stress* crónico (McKeever & Gordon, 2008). Uma vez que se tem verificado que os cavalos mais velhos atingem valores máximos de cortisol mais cedo que os mais novos (McKeever & Gordon, 2008), é possível que sejam mensurados valores mais altos nestes cavalos em etapas intermédias do percurso em relação aos obtidos no final da prova (Janczarek *et al.*, 2013).

- Transporte

Vários autores afirmam que o transporte influencia negativamente o estado físico e mental dos cavalos de desporto (Fazio *et al.*, 2008). Contudo Janczarek (2013) refere que apesar de verificar que o transporte é sem dúvida um fator de libertação de cortisol não verificou uma correlação entre o tempo de transporte e os níveis de cortisol no final da prova, concluindo que a sua influência pode afetar apenas até certo ponto da prova após o qual outros fatores se tornam mais importantes (Janczarek *et al.*, 2013). Peeters (2012) também refere estudos que desvalorizam o impacto do transporte em equinos.

- Treino

Após o exercício, um aumento da concentração de cortisol é normal. Este aumento varia com a intensidade e duração do esforço físico (Peeters, 2012). Os cavalos treinados têm variações de cortisol menores (Van der Kolk, 2014), atingindo concentrações máximas mais cedo e com tempo de recuperação mais rápido (McKeever & Gordon, 2008).

- Temperatura ambiente e humidade relativa

A temperatura e humidade mais elevadas dependendo da intensidade, da duração e da aclimação, podem levar ao aumento do risco de *stress* por calor e ao aumento dos níveis de cortisol (Didelot, 2006).

- Distância percorrida em prova

No que diz respeito à distância percorrida em prova, referindo-se a cavalos a concorrer em provas de 160 Km, foram encontrados níveis de cortisol mais elevados após percorrer essa totalidade de quilómetros, o que vai de encontro a outras referências que mencionam uma relação direta entre o aumento dos níveis de cortisol com a duração do exercício. Podem ser observados valores mais baixos durante distâncias médias que revelam boa preparação física e estão associados à diminuição da emoção do cavalo na própria participação, em parte pela sucessiva diminuição da concorrência, manifestando a adaptação ao ambiente da competição (Janczarek *et al.*, 2013).

2.5. Determinação dos níveis de cortisol

2.5.1. Meios para análise de cortisol

O cortisol, tal como já foi referido, é uma hormona glucocorticoide que pertence ao grupo das hormonas esteróides produzidas no córtex das glândulas adrenais. As hormonas esteróides são sintetizadas a partir do colesterol, através de uma série de processos enzimáticos, sendo libertadas imediatamente ou pouco tempo após a sua síntese, pelo que não são armazenadas na glândula secretora em quantidades significativas. Consequentemente as concentrações plasmáticas são o reflexo da taxa de secreção e a sua taxa de remoção metabólica é geralmente constante (Reece, 2005).

Como esteróide o cortisol é uma hormona lipofílica, apresentando uma solubilidade limitada em soluções aquosas, pelo que tem que ser transportado no sangue em associação reversível a determinadas proteínas de ligação específica ou não específica. Assim, no transporte para os tecidos-alvo 75% do cortisol encontra-se ligado à CBG, uma globulina com alta afinidade para o cortisol, e 15 % ligado à albumina (ligação não específica). A forma livre das hormonas esteroides é a que tem capacidade de atravessar

as membranas dos vasos sanguíneos e de exercer ação sobre as célula-alvo, o que no caso do cortisol pode corresponder entre 1-10% da quantidade total (Greco & Stabenfeldt, 2004).

As hormonas e as células-alvo de um tecido interagem de modo específico. Os esteroides, por serem lipossolúveis, conseguem atravessar as membranas celulares, podendo encontrar os seus recetores localizados no citoplasma ou no núcleo. A interação recetor-hormona desencadeia uma cascata de reações intracelulares que permite a produção de respostas efetivas mesmo em baixas concentrações (Greco & Stabenfeldt, 2004).

Em suma, após síntese, o cortisol fica disponível no sistema circulatório podendo ser detetado em vários fluidos ou excreções biológicas. Em equinos, a determinação dos níveis de cortisol está validada no sangue, saliva, urina e fezes.

2.5.1.1. Sangue

A determinação dos níveis de cortisol através de amostras sanguíneas é o método mais antigo para deteção de cortisol, no entanto não é o método de eleição por apresentar vários inconvenientes, tais como implicar uma colheita invasiva e dolorosa que só por si pode iniciar uma resposta ao *stress* (Kaushik *et al.*, 2014).

Em cavalos, a concentração sérica de cortisol inclui duas frações, a livre ou ativa (de apenas 10%) e a ligada ou inativa (de cerca de 90%). Consequentemente, os testes para a medição de cortisol no sangue envolvem a medição do cortisol total e em seguida é necessário deduzir a fração ativa, denominada de Índice de cortisol livre (ICL) (Kaushik *et al.*, 2014).

Portanto, a determinação dos níveis de cortisol sérico para além das implicações já referidas requiere a atenção de pessoas especializadas, equipamento estéril, preocupação acrescida pelo risco de infeções e cuidados de armazenamento (Kaushik *et al.*, 2014), e como método invasivo não é permitido em contexto de prova.

2.5.1.2. Saliva

A saliva tem tido crescente interesse como meio para análise e detecção de concentrações de cortisol uma vez que já existem estudos que comprovam uma elevada correlação entre os níveis de cortisol salivar e sanguíneo (Kędzierski *et al.*, 2013a).

Ao contrário da apresentação no sangue, o cortisol salivar existe inteiramente no estado biologicamente ativo, resultando da difusão passiva da fração livre para as glândulas salivares (Fig.6) (Peeters *et al.*, 2011).

Estes dois meios diferem no tempo necessário para que, após a estimulação de *stress*, se reflita o valor máximo de cortisol, levando cerca de 20 minutos para se refletir no plasma (Kędzierski *et al.*,

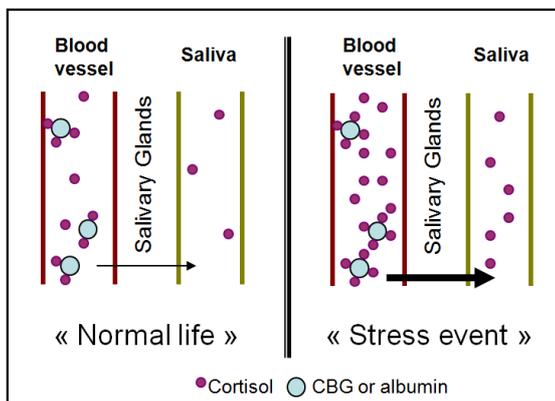


Fig. 6: Esquema de difusão passiva do cortisol ao nível das glândulas salivares (Peeters, 2012).

2013a) e 30 minutos para se refletir na saliva (onde concentração de cortisol parece ser independente do volume salivar (Peeters, 2012)). Este tempo de latência é variável e dependente da intensidade e duração do *stress* (Kędzierski *et al.*, 2013b). Enquanto houver CBG e albumina livres a concentração de cortisol salivar pode ser muito mais baixa que no sangue (Kaushik *et al.*, 2014), após saturação completa destas proteínas há um aumento do cortisol livre que se traduz num aumento de cortisol salivar superior ao do soro. No último caso, os níveis de cortisol salivar tornam-se mais expressivos e específicos na determinação do aumento da actividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. (Peeters *et al.*, 2011). Ao contrário da amostra sanguínea a saliva pode ser armazenada à temperatura ambiente (Strzelec *et al.*, 2011). A desvantagem da análise de cortisol em amostras salivares prende-se com o fato de necessitar de ensaios de alta sensibilidade com baixos limites de detecção (Kaushik *et al.*, 2014).

A colheita de amostras salivares compreende um método não invasivo, indolor e rápido, geralmente bem aceite pelo cavalo (Fig. 7) (Peeters *et al.*, 2011), que tem assumido procedimentos padrão fáceis de executar desde a recolha, ao manuseamento e armazenamento, o que favorece uma prática semelhante com menor variabilidade nos

resultados analisados e aumenta as perspectivas quanto à aplicabilidade em tempo real e detecção contínua de cortisol (Kaushik *et al.*, 2014).



Fig. 7: Colheita de saliva - Método não invasivo, indolor e rápido, geralmente bem aceite pelo cavalo (fotografia cedida pelo Professor Paulo Fonseca).

2.5.1.3. Urina

Os níveis de cortisol na urina são determinados pela fração livre e requerem uma medição ao longo de um período de 24 horas. A excreção de hormonas, sais e outras substâncias residuais através da urina é um processo bem caracterizado, existindo um conhecimento sobre a concentração normal destas substâncias, pelo que a observação de uma variação drástica nas concentrações de cortisol permite diagnosticar variações na função adrenal (Kaushik *et al.*, 2014).

Embora o método de análise deste fluido seja não-invasivo e indolor apresenta desvantagens no que diz respeito à conveniência e fiabilidade. Nomeadamente, este meio de análise não permite detetar variações ligeiras e transitórias (Peeters, 2012), e como a colheita da urina é realizada durante um período de 24 horas, é necessário confinar o animal a um local e mantê-lo sob vigilância durante esse período, interferindo assim com a sua rotina normal. Após a colheita é preciso armazenar sob refrigeração até que seja entregue a um laboratório apropriado (Kaushik *et al.*, 2014).

2.5.1.4. Fezes

A técnica de amostragem para determinação de metabolitos de cortisol em fezes segue um método simples que oferece a vantagem de conseguir amostras sem contato direto com o animal (Möstl & Palme, 2002).

A concentração de metabolitos de cortisol numa amostra fecal reflete a produção de um nível médio de cortisol em circulação durante um longo período de tempo (Fureix *et al.*, 2013), sendo a evolução temporal da sua excreção demorada e variável. Este tipo de amostra requer uma colheita no período de 24 horas, devendo ser avaliada a massa fecal total, onde idealmente as fezes devem se congeladas imediatamente pós-excreção para evitar a degradação (Hughes *et al.*, 2010). Na utilização de amostras de fezes deve considerar-se o potencial impacto de variações na flora intestinal, sendo que a composição bacteriana vai influenciar o tipo e/ou a quantidade de metabolitos hormonais. Assim, os metabolitos de cortisol medidos nas fezes são produtos de uma ampla modificação por bactérias (Fureix *et al.*, 2013).

Portanto este meio de análise torna-se adequado para estudos longitudinais, com monitorizações por períodos prolongados, e pelo contrário, é inadequada para detetar variações ligeiras e transitórias (Peeters *et al.*, 2011), como as que ocorrem numa situação de *stress* durante uma competição. Estas amostras adquirem assim especial importância na gestão da vida selvagem, biologia da conservação, ecologia comportamental e ambiental (maneio, habitação, transporte, etc.) (Möstl & Palme, 2002).

2.5.2. Métodos de análise de cortisol salivar

2.5.2.1. Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas representam as técnicas mais antigas de análise do cortisol. Têm como princípio a separação do cortisol a partir do meio biológico utilizando um processo de transferência de massa de adsorção induzida. A amostra é sujeita a procedimentos de extração, purificação, separação por cromatografia líquida e espectrometria de massa para a identificação e quantificação de cortisol (Kaushik *et al.*, 2014).

Apesar destas técnicas demonstrarem capacidade de deteção de cortisol em níveis fisiológicos, carecem de especificidade na medição de baixas concentrações e aquando da interferência de substâncias diluídas na amostra, necessitando de muitos procedimentos de cromatografia líquida de alto rendimento durante a fase de pré-processamento, tais como a extração da fase sólida (Kaushik *et al.*, 2014).

2.5.2.2. Imunoensaios

Os problemas existentes nas técnicas cromatográficas podem ser minimizados utilizando imunoensaios. Estes baseiam-se no elevado grau de seletividade e especificidade de uma reação antigénio-anticorpo, o que os torna técnicas de eleição para a deteção da presença e medição da concentração de uma substância de interesse (Kaushik *et al.*, 2014).

- Radioimunoensaio

O radioimunoensaio baseia-se num ensaio de competição. Esta técnica utiliza tubos revestidos com anticorpos monoclonais anti-cortisol, aos quais é adicionada amostra (tal como os padrões e controlos) com um marcador de cortisol, o radioisótopo iodo 125 (I125). Após incubação e lavagem, a radioatividade que permanece é medida por um contador gama, onde as reações são expressas em contagens por minuto (CPM). Os CPM indicam-nos a quantidade de ligações que o I125 fez e que será tanto maior quanto maior for a presença de cortisol. Uma curva de calibração é criada e os valores desconhecidos são determinados por extrapolação a partir dessa (DRG-Internacional, 2014).

É um método de alta sensibilidade que permite rápidas e precisas determinações com um limiar de deteção em nanogramas e picogramas por mililitro. Contudo, uma vez que lhe estão implícitos custos elevados, reagentes de vida média curta, vários riscos operacionais bem como contaminação ambiental, a sua utilização tem diminuído e dado lugar ao uso de marcadores que emitem luz cuja intensidade vai permitir inferir quanto à concentração da substância em análise (DRG-Internacional, 2014).

- Ensaio imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático (EIA) é um método analítico que permite detetar e quantificar a presença de uma substância com base em interações antígeno-anticorpo marcadas por enzimas que vão refletir o grau de reações ocorridas .

No método *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) recorre-se a uma placa com 96 poços (dispostos em 12 filas verticais cada uma com 8 poços), cujo fundo é revestido por um reagente de ligação específico para uma determinada substância designada de fase estacionária ou sólida, a esta é adicionada a fase líquida, ou seja, a amostra que contém a substância específica de quantidade desconhecida. Em seguida são adicionados sequencialmente vários reagentes líquidos, são realizadas incubações e lavagens, para que ocorram reações bioquímicas específicas que vão gerar um sinal facilmente quantificado e interpretado refletindo a quantidade da substância presente na amostra. A "leitura" desse sinal é geralmente baseada na deteção da intensidade de luz transmitida através de espectrofotometria, que envolve a quantificação da transmissão de comprimentos de onda específicos de luz através do líquido. A sensibilidade de deteção da substância depende da amplificação do sinal durante as reações analíticas e para esse fim associam-se enzimas aos reagentes (Cortisol ELISA, 2014).

Existem dois tipos de ELISA:

- Não competitivo: a amostra contendo os antígenos a determinar é adicionada a uma fase sólida onde se liga de forma específica aos anticorpos nela presentes. De seguida, é realizada uma lavagem para eliminar os antígenos não ligados. Adicionam-se anticorpos secundários ligados a enzimas (sendo aplicados como anticorpos de deteção) que se ligam especificamente aos anticorpos primários e efetua-se nova lavagem para remover os conjugados anticorpo-enzima não ligados. Por último, determina-se a presença e quantidade de antígeno presente de acordo com a intensidade de luz transmitida (Seadi, 1998).

- Competitivo: a fase sólida tem anticorpos ligados e a esta fase é adicionada a amostra com quantidade indeterminada de antígenos e em simultâneo são adicionados antígenos marcados com a enzima. Ambos vão competir pelos locais de ligação dos anticorpos que revestem os poços, depois procede-se à incubação e à lavagem. Neste tipo de ELISA a intensidade de luz desenvolvida é inversamente proporcional à quantidade de antígenos na amostra, porque quanto maior for a quantidade de

antigénios em análise menor a possibilidade de ligação dos antigénios marcados e assim menor a intensidade de luz emitida, ou pelo contrário, quanto maior for a intensidade de luz transmitida menor é a concentração da substância em análise (Seadi, 1998).

Os resultados são calculados através da construção de um gráfico com a densidade ótica da amostra padrão em função da sua concentração, usando um método computadorizado a concentração das amostras pode ser extrapolada diretamente a partir da curva de calibração (Cortisol ELISA, 2014).

Portanto, este é um teste de alta sensibilidade e especificidade, versátil sendo atualmente considerado um método de análise de primeira linha que tem sido muitas vezes utilizado para validar os resultados obtidos a partir de técnicas mais recentes. Utiliza reagentes estáveis que exigem menos precauções ambientais, sendo também menos dispendioso. No entanto é um método limitado pela necessidade dum volume de amostra considerável, é algo complexo (com vários passos de ensaio) e exige grandes tempos de incubação (Kaushik *et al.*, 2014).

- Imunoensaio electroquimicoluminescente (ECLIA)

Este imunoensaio baseia-se na propriedade quimicolumiscente eletro-gerada por intermediários submetidos a uma reação altamente exotérmica para produzir um estado eletrónico excitado que emite luz (Kaushik *et al.*, 2014).

ECLIA tornou-se uma técnica de imunoensaio altamente confiável devido à alta sensibilidade e controle preciso sobre a reação eletroquímica. O limite de deteção obtido permite a sua aplicação para a avaliação da atividade do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal. Este método oferece diversas vantagens de automação, sem pré-tratamento, mais rápido que ensaios isotópicos e imunoenzimáticos (Kaushik *et al.*, 2014).

- Imunoensaio eletroquímico de cortisol

Para superar custos e deficiências dos métodos de análise descritos, tem-se procurado desenvolver técnicas de imunoensaio livres de marcadores com alta sensibilidade, limites de deteção mais baixos e maior gama de deteção. Nesse sentido, surgiu recentemente o imunoensaio eletroquímico como a alternativa mais promissora para deteção ótica. Este imunoensaio baseia-se no princípio de medição das alterações nas propriedades elétricas de um material condutor, devido à adsorção da substância em

análise pelos anticorpos. A alteração elétrica é atribuída à alteração da concentração das espécies redox ativas na proximidade do eletrodo. A capacidade de processamento microeletrónico da indústria permitiu a construção de microeletrodos que oferecem alta sensibilidade e limites de deteção muito baixos (Kaushik *et al.*, 2014).

As abordagens analíticas atuais contam com imunoensaios realizados em laboratórios distantes, envolvendo um longo percurso que passa pela colheita, processamento, transporte, armazenamento, análise e finalmente emissão de relatórios. Assim, têm sido explorados novos imunossensores e nanomateriais que funcionem como matriz de suporte para a imobilização dos anticorpos com vista a melhorar a sensibilidade e seletividade de deteção de cortisol, bem como têm sido desenvolvidas estratégias com vista a melhorar a sua aplicabilidade, tornando-os imunes aos diversos fatores ambientais (variações de temperatura, humidade, mudança no pH, a exposição à luz, etc), no entanto continuam a existir limitações para o seu uso a campo, onde o objetivo é a determinação em tempo real encontrando-se esta uma área em contínuo desenvolvimento (Kaushik *et al.*, 2014).

III. Trabalho Experimental

3.1. Introdução

O *stress* é um estado do organismo despoletado por estímulos endógenos ou exógenos que causam um desequilíbrio significativo da homeostase, interferindo assim com o bem-estar de forma positiva (*eustress*) ou negativa (*distress*) (Peeters, 2012).

Os cavalos que praticam provas de resistência estão sujeitos a exercício prolongado com níveis de intensidade moderada, onde a sua *performance* está dependente da coordenação de vários sistemas (McKeever & Gordon, 2008). Um equilíbrio funcional durante a realização deste tipo de prova está profundamente dependente da ativação do sistema nervoso simpático e do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal que conduzem ao aumento da hormona libertadora de corticotrofina (CRH), adrenocorticotropina (ACTH), noradrenalina, adrenalina e cortisol em circulação, sendo estes indicadores que refletem a tensão implícita ao exercício (Van der Kolk, 2014).

As avaliações médico-veterinárias realizadas durante as provas de resistência são subjetivas e têm-se mostrado ineficientes face ao desenvolvimento exponencial da modalidade, sobretudo pelas velocidades praticadas atualmente, com um aumento significativo de relatos de morbilidade, pondo em risco a funcionalidade ou mesmo a vida dos cavalos. Assim, é fundamental criar um suporte científico capaz de acompanhar esta evolução e de encontrar novos métodos que complementem a avaliação existente. No futuro, a solução passa por associar ao exame clínico a utilização de métodos objetivos não invasivos que possibilitem aos médicos veterinários identificar mais precocemente cavalos em risco e substanciar a eliminação destes das provas. Por outro lado, um método objetivo não invasivo também pode ser uma ferramenta de interesse e de fácil acesso para proprietários e treinadores de modo a avaliar os seus cavalos no processo de treino analisando-os quanto à sua evolução e *performance*.

O cortisol é um glucocorticoide influenciado por diversos fatores (nomeadamente pelo ritmo circadiano, temperatura ambiente, humidade relativa, sexo, idade, entre outros), determinado como possível indicador objetivo de *stress* em pessoas e animais em situações adversas e que tem sido alvo de vários estudos em cavalos sujeitos a atividade

física, estando a sua determinação validada no sangue, saliva, urina e fezes. A saliva tem se tornado o meio de eleição para a determinação dos níveis de cortisol em equinos uma vez que neste meio ele existe inteiramente no estado biologicamente ativo (sendo esta a vantagem em relação ao sangue) e permite detecções ligeiras e transitórias (ao contrário das fezes e urina). A colheita de amostras salivares compreende um método não invasivo, indolor e rápido, geralmente bem aceite pelo cavalo (não despoletando *stress*) que tem assumido procedimentos padrão fáceis de executar desde a recolha, ao manuseamento e armazenamento, favorecendo uma prática semelhante com menor variabilidade nos resultados analisados e aumentando as perspectivas quanto à aplicabilidade em tempo real (Kaushik *et al.*, 2014).

No estudo de Janczarek *et al.* (2013) foram avaliados os níveis de cortisol salivar em cavalos PSA de resistência equestre, estes cavalos encontravam-se a participar em provas com distâncias entre 80 e 100 Km; em média tiveram 2.45 ng/ml em repouso, 9.13 ng/ml nas distâncias médias e 11.57 ng/ml 30 minutos após o final da prova. Noutro estudo, realizado por Kedzierski *et al.* (2013a) foram avaliados os níveis de cortisol salivar em cavalos PSA mas de corrida, tendo este estudo sido realizado durante um treino; as médias dos níveis de cortisol foram 0.38 ng/ml em repouso, 1.97 ng/ml imediatamente após o exercício, e 1.83 ng/ml 30 minutos após o exercício.

O ensaio imunoenzimático (EIA) é um método analítico que permite detetar e quantificar a presença de uma substância com base em interações antígeno-anticorpo marcadas por enzimas, sendo um teste versátil de alta sensibilidade e especificidade, que utiliza reagentes estáveis não exigindo especiais precauções operacionais e ambientais, para além disso também é menos dispendioso (Kaushik *et al.*, 2014) o que o torna uma boa opção.

Este estudo tem por objetivo avaliar a utilidade do doseamento de cortisol salivar como indicador objetivo de *stress* e de *performance* durante dois concursos de resistência equestre, através da determinação dos níveis de cortisol salivar e associação com os dados das avaliações médico-veterinárias, características individuais dos cavalos, condições ambientais e desempenho. Para além disso, pretendeu-se avaliar a exequibilidade das colheitas de saliva durante a competição.

As hipóteses deste estudo são:

- 1) Há diferença entre os níveis de cortisol salivar e os vários momentos em que foi feita a colheita (casa e grelhas veterinárias 0, 1, 2 e 3);
- 2) Há associação entre o cortisol e a variável fisiológica - frequência cardíaca - e as variáveis de *performance* - velocidade média, tempo de recuperação e classificação;
- 3) Há diferença dos níveis de cortisol no grupos de cavalos participantes na prova de 40 e 80 Km.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Cavalos

Este estudo baseou-se numa amostra de conveniência de cavalos a participar em dois tipos de provas de resistência equestre realizadas no mesmo dia. Os concorrentes participaram voluntariamente após leitura do consentimento informado do procedimento (anexo 1).

Os cavalos participantes no estudo concorreram em duas provas de velocidade controlada, uma de 40 Km (Concurso de Endurance de Promoção - CEP 40 Km) e outra de 80 Km (Concurso de Endurance de Promoção - CEP 80 Km).

Do total de 23 participantes processaram-se as amostras correspondentes a 11 participantes (cinco a competir na prova de 40 Km e seis na prova de 80 Km), com idades compreendidas entre os cinco e os oito anos, dos quais três são fêmeas, cinco são machos castrados e três são garanhões.

Com a exceção de dois participantes, todos são Puro Sangue Árabe (PSA), sendo um deles Anglo-árabe (AA) e o outro Cruzado Português (CP). Apenas um participante não concorreu com o seu treinador ou com alguém que o monte com frequência. Dois dos participantes vivem em boxe e os restantes ao ar livre ou em regime misto (boxe e *paddock*), sendo a alimentação destes constituída por feno, ração e pastagem. O transporte para o local da prova foi realizado no dia da mesma, tendo o tempo de transporte variado entre 30 minutos e 1 hora e 30 minutos.

3.2.2. Desenho experimental e colheita de amostras

As informações sobre os cavalos foram obtidas por escrito a partir dos responsáveis pelos cavalos e página de internet da Federação Equestre Portuguesa. Os detalhes técnicos sobre os resultados das provas, tais como velocidades médias (VM), tempos de recuperação (TR) e classificação, foram obtidos junto da cronometragem. Os fatores ambientais, temperatura (T) e humidade relativa (HR), foram



Fig. 8: Colheita de amostra salivar (fotografia original)

medidos e fornecidos pela estação meteorológica do Centro de Geofísica da Universidade de Évora, localizada na Herdade da Mitra (local onde estava estabelecida a grelha médico-veterinária). As informações sobre a avaliação médico-veterinária - frequência cardíaca (FC), tempo de repleção capilar (TRC) e tempo de retração da prega cutânea (TRPC) - foram obtidas a partir dos verbetes veterinários.

A colheita de saliva realizou-se através da utilização de *kits* de recolha *Salivette*[®] *Sarstedt*, sendo este constituído por um tubo de plástico incluindo algodão de forma cilíndrica específico para doseamento de cortisol salivar. As amostras de saliva foram colhidas antes da prova em casa (casa cortisol), na inspeção pré-raide (GV0) e imediatamente após cada etapa na grelha médico-veterinária (GV1, GV2 e GV3) de acordo com a tabela 2, seguindo o método descrito por Peeters *et al.* (2011). Este método compreendeu a inserção do algodão na boca do cavalo, com ajuda de uma pinça hemostática (Fig. 8), e a realização de várias passagens nas bochechas, língua ou palato, durante 30 a 40 segundos e por último, a colocação imediata do algodão novamente no respetivo tubo do *kit*.



Fig. 9: *Salivette*[®] e amostra após centrifugação (fotografia original).

Os *kits* foram identificados com o número do participante e com letras correspondentes à grelha veterinária realizada (Fig. 9) (exemplo: a amostra da primeira grelha veterinária do cavalo 85 fica designada "85a"). As amostras foram refrigeradas até à centrifugação. A centrifugação foi realizada a 1500g durante 15 minutos à temperatura ambiente,

seguindo-se o armazenamento das amostras a -20°C até à determinação dos níveis de cortisol conforme indicado nas recomendações do Kit.

Tabela 2: CEP 40 e 80 Km - Ordem cronológica das grelhas médico-veterinárias onde foram realizadas as colheitas de saliva e etapas com o número de quilómetros correspondentes.

	Inspeção pré-raide	Etapa 1	Grelha vet. 1	Etapa 2	Grelha vet. 2	Etapa 3	Grelha vet. 3
Raide 40 Km	GV0	20 Km	GV1	20 Km	GV2	-	-
Raide 80 Km	GV0	40,5 Km	GV1	20 Km	GV2	20 Km	GV3

3.2.3. Análise laboratorial

Antes da análise laboratorial as amostras foram sujeitas a um descongelamento progressivo (tendo sido colocadas em recipientes com gelo) e foram centrifugadas de modo a remover partículas que pudessem interferir com as ligações antígeno-anticorpo (Salimetrics® salivary cortisol, 2014).

O método de análise utilizado foi o imunoensaio enzimático ELISA recorrendo ao *kit Cortisol ELISA* da *IBL internacional* (referência 52061). Todas as amostras foram analisadas em duplicado. O ELISA (fig. 10) utilizado baseou-se no princípio da competição, onde uma quantidade indeterminada de antígeno presente na amostra e uma quantidade fixa de antígeno marcado com enzima competem pelos locais de ligação dos anticorpos que revestem os poços. Após incubação, os poços foram lavados para parar a reação de competição. Após a reação do substrato, a intensidade da cor desenvolvida (que é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra) foi medida em leitor de microplacas a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados das amostras, expressos em ng/ml, foram determinados a partir da curva padrão.

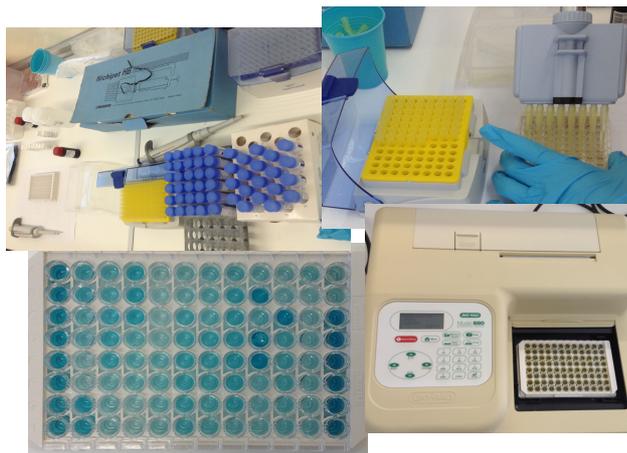


Fig. 10: Análise laboratorial - ELISA (fotografias originais).

3.2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS (IBM SPSS Statistics, version 22, United States). Os resultados são expressos em valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$). A importância das diferenças entre os resultados obtidos foi determinada pelo teste T para amostras emparelhadas. Para avaliar as correlações entre as variáveis foi utilizado o teste de Spearman. A significância estatística foi aceita para $P \leq 0,05$. Quando não se verificou uma relação linear foi efetuada a regressão com estimativa da curva.

3.3 Resultados

3.3.1. CEP 40 Km

3.3.1.1. Valores médios e desvio-padrão

- Condições climáticas

Na tabela 3 estão representadas as condições climáticas no momento em que foram realizados os exames veterinários e as colheitas de saliva em cada grelha médico-veterinária, observando-se que a temperatura aumentou bastante entre a GV0 e a GV1, e

ligeiramente entre a GV1 e a GV2, enquanto a humidade relativa variou de forma inversa.

Tabela 3: CEP 40 Km - Temperatura (°C) e humidade relativa (%) em cada grelha médico-veterinária.

	GV0	GV1	GV2
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
T (°C)	15.7±0	23.0±0	24.5±0
HR (%)	76.7±0	42.8±0	39.5±0

- Velocidade média e tempo de recuperação

Na tabela 4 estão representados os valores médios \pm DP dos parâmetros técnicos, verificando-se que na 2ª fase da prova (GV2) a velocidade média praticada foi superior, tendo também aumentado o tempo de recuperação.

Tabela 4: CEP 40 Km - Valores médios \pm DP, mínimos, máximos dos parâmetros técnicos - velocidade média (Km/h) e tempo de recuperação (s) (n=5).

		GV1	GV2
VM (Km/h)	$\bar{x} \pm s$	13.83±1.57	15.01±1.35
	min.	12.17	13.78
	máx.	15.64	16.90
TR (s)	$\bar{x} \pm s$	3m16s±45s	6m2s±1m29s
	min.	2m26s	4m26s
	máx.	4m21s	7m59s

- Parâmetros médico-veterinários: frequência cardíaca, tempo de repleção capilar e tempo de retração da prega cutânea

Na tabela 5 estão representados os valores médios \pm DP dos parâmetros médico-veterinários analisados em cada grelha médico-veterinária. A partir da grelha médico-veterinária 1 (GV1) a média do tempo de repleção capilar aumentou para 2 segundos.

Tabela 5: CEP 40 Km - Valores médios \pm DP, mínimos, máximos dos parâmetros médico-veterinários dos cavalos examinados nas grelhas médico-veterinárias - FC (bpm), TRC (s), TRPC (s) (n=5).

	GV0			GV1			GV2		
	$\bar{x} \pm s$	min.	máx.	$\bar{x} \pm s$	min.	máx.	$\bar{x} \pm s$	min.	máx.
FC	44 \pm 8	32	50	62 \pm 2	60	64	60 \pm 2	56	62
TRC	1 \pm 0	1	1	2 \pm 0	1	2	2 \pm 0	1	2
TRPC	1 \pm 0	1	1	1 \pm 0	1	2	1 \pm 0	1	2

3.3.1.2. Teste T para amostras emparelhadas

- Cortisol nos vários momentos

A tabela 6 foi construída com base no teste T para amostras emparelhadas e permite comparar as concentrações salivares médias de cortisol, representadas no gráfico 4, entre os vários momentos. Observa-se que a concentração média de cortisol salivar em casa não difere significativamente da concentração média de cortisol salivar na inspeção pré-raide (GV0) mas difere significativamente ($P \leq 0,05$) da GV1 e da GV2; enquanto a concentração salivar média de cortisol na GV0 e entre as grelhas não diferiram significativamente entre si ($P > 0,05$).

Tabela 6: CEP 40 Km - Teste T para comparação de médias de cortisol salivar (ng/ml) em função do momento da recolha (n=5).

Cortisol salivar	$\bar{x} \pm s$
Casa	0,261 \pm 0,112 ^a
GV0	0,533 \pm 0,196 ^{a,b}
GV1	1,265 \pm 1,052 ^b
GV2	1,403 \pm 0,834 ^b

^{a, b, c} Letras diferentes representam médias com diferenças significativas entre si para $P \leq 0,05$

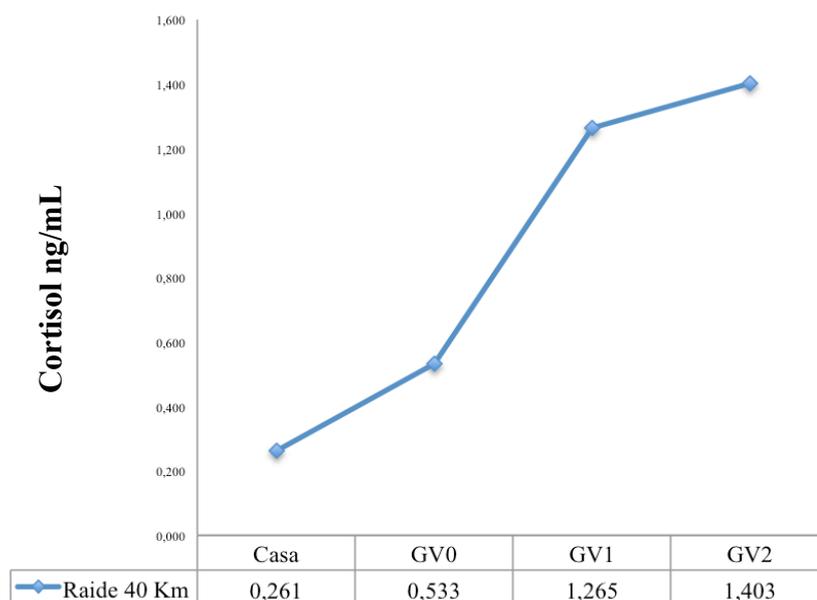


Gráfico 4: CEP 40 Km - Níveis médios de cortisol salivar (ng/ml)

3.3.1.3. Correlações de Spearman

- Cortisol nos vários momentos

As concentrações salivares médias nos vários momentos foram igualmente avaliadas através do coeficiente de correlação de Spearman e estão apresentadas na tabela 7. Nessa tabela verifica-se apenas uma correlação significativa entre as concentrações de cortisol salivar nas GV1 e GV2 ($P=0,037$), ou seja, os cavalos com níveis de cortisol mais elevados na 1ª fase da prova são também os que terminaram a prova com os níveis mais elevados.

Tabela 7: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre as concentrações salivares médias (ng/ml) nos vários momentos (n=5).

		Casa Cortisol	GV0 Cortisol	GV1 Cortisol	GV2 Cortisol
Casa Cortisol	Coefficiente de Correlação				
	Sig. (bilateral)				
GV0 Cortisol	Coefficiente de Correlação	0,400			
	Sig. (bilateral)	0,505			
GV1 Cortisol	Coefficiente de Correlação	0,400	-0,500		
	Sig. (bilateral)	0,505	0,391		
GV2 Cortisol	Coefficiente de Correlação	0,300	-0,600	0,900*	
	Sig. (bilateral)	0,624	0,285	0,037	

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

- Cortisol e frequência cardíaca (variável fisiológica)

Através da tabela 8 observa-se a relação entre a frequência cardíaca e a concentração de cortisol salivar média em cada momento. A correlação de Spearman entre as duas variáveis na GV0 é negativa e quase significativa ($P=0,054$), enquanto que nos restantes momentos é positiva mas não significativa. Na figura 11 está representada a regressão com estimativa da curva que demonstra a relação entre a concentração salivar média e a frequência cardíaca antes de iniciar a prova (GV0) e nas grelhas médico-veterinárias 1 e 2.

Tabela 8: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) no mesmo momento (n=5).

		GV0 FC	GV1 FC	GV2 FC
Cortisol	Coefficiente de Correlação	-0,872*	0,474	0,447
	Sig. (bilateral)	0,054	0,420	0,450

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

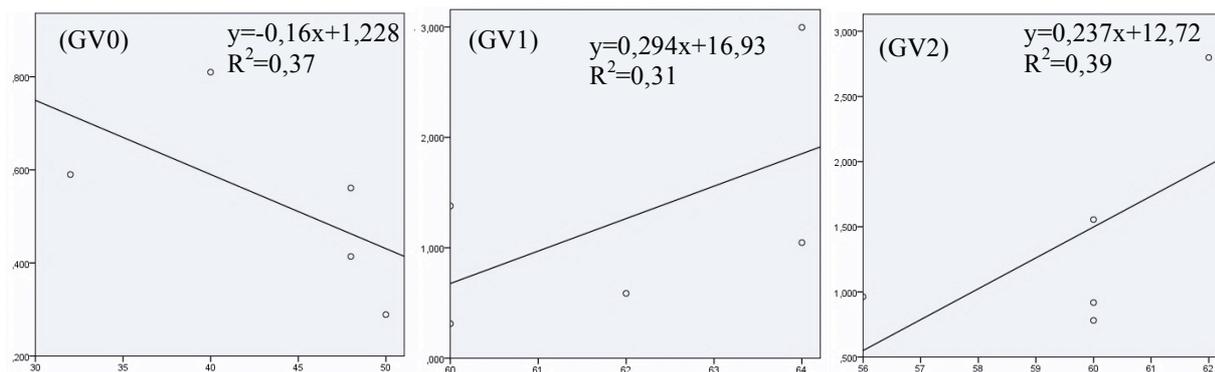


Fig. 11: CEP 40 Km - Regressões com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) antes de iniciar a prova (GV0) e nas grelhas veterinárias 1 (GV1) e 2 (GV2).

- Cortisol e velocidade média (variável de performance)

Na tabela 9 a correlação de Spearman revela a ausência de correlações significativas entre a velocidade média em cada grelha e as concentrações salivares médias nos mesmos momentos. Não obstante, as correlações são sempre positivas, ou seja quanto maior a velocidade maior a concentração de cortisol salivar. Na figura 12 está representada a regressão com estimativa da curva que demonstra a relação entre a concentração salivar média e a velocidade média nas grelhas médico-veterinárias 1 e 2.

Tabela 9: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) no mesmo momento (n=5).

		GV1	GV2
		VM	VM
Cortisol	Coefficiente de Correlação	0,800	0,500
	Sig. (bilateral)	0,104	0,391

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

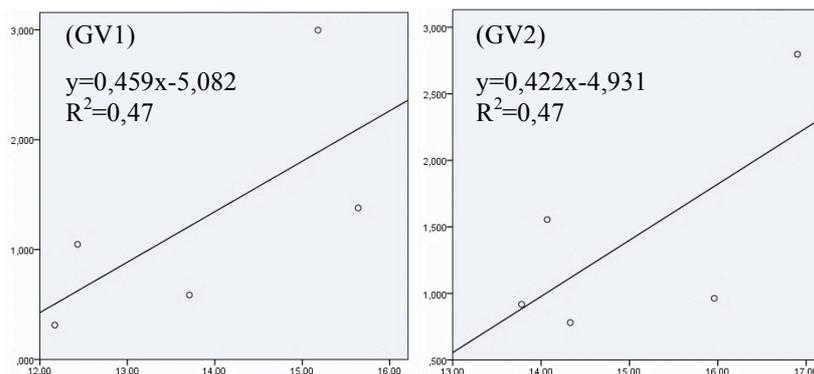


Fig. 12: CEP 40 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) nas grelhas veterinárias 1 (GV1) e 2 (GV2).

- Cortisol e tempo de recuperação (variável de performance)

Através da tabela 10 verifica-se que não existem correlações de Spearman significativas entre o tempo de recuperação em cada grelha e as respectivas concentrações salivares médias. Apesar disso pode observar-se que as correlações são sempre positivas, ou seja quanto maior a concentração de cortisol salivar maior o tempo de recuperação.

Tabela 10: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e o tempo de recuperação no mesmo momento (s) (n=5).

		GV1	GV2
		TR	TR
Cortisol	Coefficiente de Correlação	0,200	0,500
	Sig. (bilateral)	0,747	0,391

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

- Velocidade média e tempo de recuperação (variáveis de performance)

A partir da tabela 11 verifica-se que correlação de Spearman não apresenta uma correlação significativa entre a velocidade média e o tempo de recuperação na GV2. No entanto pode observar-se que a correlação é positiva, ou seja quanto maior a velocidade média maior o tempo de recuperação. Na figura 13 está representada a regressão com

estimativa da curva que demonstra a relação entre a velocidade média e o tempo de recuperação após a 2ª fase da prova.

Tabela 11: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre as variáveis de *performance* velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) (n=5).

		GV2
		VM
GV2	Coefficiente de Correlação	0,500
TR	Sig. (bilateral)	0,391

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

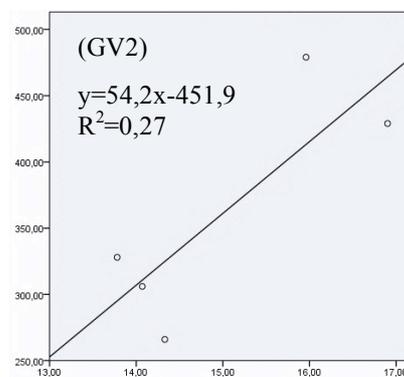


Fig. 13: CEP 40 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) após a 2ª fase da prova (GV2) (n=5).

- Cortisol e classificação

A partir da tabela 12 consegue-se observar que correlação de Spearman não apresenta uma correlação significativa entre os níveis de cortisol salivar durante a prova, ou seja na inspeção pré-raide (GV0) e as grelhas médico-veterinárias 1 e 2 (GV1 e GV2) e a classificação. No entanto a correlação é positiva, ou seja, quanto maiores os níveis de cortisol menor o valor da classificação e portanto melhor o resultado. Para a avaliação desta correlação a amostra diminuiu para 4 uma vez que um dos participantes foi eliminado na última grelha e poderia influenciar negativamente os resultados. Na figura 14 está representada a regressão com estimativa da curva que demonstra a relação entre os níveis de cortisol salivar durante a prova e a classificação.

Tabela 12: CEP 40 Km - Correlações de Spearman entre os níveis de cortisol (ng/ml) durante a prova (GV1e GV2) e a classificação da prova (n=4).

		Classificação
Cortisol	Coefficiente de Correlação	-0,800
	Sig. (bilateral)	0,200

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

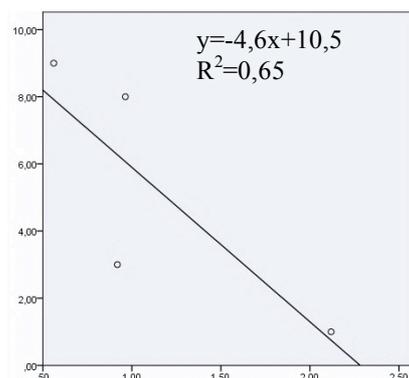


Fig. 14: CEP 40 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre os níveis de cortisol salivar durante a prova (ng/ml) e a classificação na prova (n=4).

3.3.2. CEP 80 Km

3.3.2.1. Valores médios e desvio-padrão

- Condições climáticas

Na tabela 13 estão representadas as condições climáticas no momento em que foram realizados os exames médico-veterinários e as colheitas de saliva, observando-se que a temperatura aumentou bastante entre GV0 e GV1, e ligeiramente entre GV1, GV2 e GV3, enquanto a humidade relativa variou de forma inversa.

Tabela 13: CEP 80 Km - Temperatura (°C) e humidade relativa (%) em cada grelha médico-veterinária.

	GV0	GV1	GV2	GV3
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
T (°C)	15.7±0	23.0±0	24.5±0	25.8±0
HR (%)	76.7±0	42.8±0	39.5±0	37.2±0

- Velocidade média e tempo de recuperação

Os valores médios \pm DP dos parâmetros técnicos estão representados na tabela 14, verificando-se que apesar da velocidade média na GV2 ter sido inferior em relação às outras duas grelhas, o tempo de recuperação médio aumentou de fase para fase. Na última grelha médico-veterinária (GV3) observaram-se os valores médios mais altos tanto na velocidade média como no tempo de recuperação.

Tabela 14: CEP 80 Km - Valores médios \pm DP, mínimos, máximos dos parâmetros técnicos - velocidade média (Km/h) e tempo de recuperação (s) (n=6).

		GV1	GV2	GV3
	$\bar{x} \pm s$	14.86±0.23	14±0.53	14.97±1.74
VM (Km/h)	min.	14.67	13.25	13.98
	máx.	15.20	14.42	18.05
	$\bar{x} \pm s$	5m1s±2m21s	5m39s±2m11s	6m14s±2m21s
TR (s)	min.	2m14s	2m20s	2m43s
	máx.	7m13s	7m44s	8m51s

- Parâmetros médico-veterinários: frequência cardíaca, tempo de repleção capilar e tempo de retração da prega cutânea

Na tabela 15 estão representados os valores médios \pm DP dos parâmetros médico-veterinários analisados em cada grelha médico-veterinária. Tal como no raide de 40

Km a frequência cardíaca na inspeção pré-raide (GV0) é o parâmetro com maior desvio padrão (DP±10). As médias da frequência cardíaca foram aumentando até á VG2 tendo se mantido na VG3, assim como os limites. A média do tempo de repleção capilar também aumentou para 2 segundos partir da grelha médico-veterinária 1 (GV1). O tempo de retração da prega cutânea sofreu alterações apenas a partir da grelha médico-veterinárias 3.

Tabela 15: CEP 80 Km - Valores médios ± DP, mínimos, máximos dos parâmetros médico-veterinários dos cavalos examinados nas grelhas médico-veterinárias - FC (bpm), TRC (s), TRPC (s) (n=6).

	GV0			GV1			GV2			GV3		
	$\bar{x} \pm s$	min.	máx.									
FC	47±10	36	64	55±9	40	64	60±4	52	64	60±4	52	64
TRC	1±0	1	1	2±1	1	2	2±1	1	2	2±1	1	3
TRPC	1±0	1	1	1±1	1	2	1±0	1	2	2±1	1	3

3.3.2.2. Teste T para amostras emparelhadas

- Cortisol nos vários momentos

A tabela 16 construída com base no teste T para amostras emparelhadas com o objetivo de comparar as concentrações salivares médias de cortisol entre os vários momentos, representadas no gráfico 5, observando-se que a concentração média de cortisol salivar em casa difere significativamente ($P \leq 0,05$) das concentrações médias de cortisol salivar em todos os outros momentos excepto antes da prova na inspeção pré-raide (GV0). Na GV0 a concentração salivar média de cortisol é diferente da GV1 e da GV3 não diferindo significativamente da GV2 que demonstra uma descida dos níveis de cortisol. Quanto às diferenças entre médias dos níveis de cortisol salivar determinados ao longo da prova (GV1, GV2 e GV3), a grelha médico-veterinária 1 não diferiu significativamente da GV2 e GV3, contudo, entre a GV2 e GV3 há diferenças significativas.

Tabela 16: CEP 80 Km - Teste T para comparação de médias de cortisol salivar (ng/ml) em função do momento da recolha (n=6).

Cortisol salivar	$\bar{x} \pm s$
Casa	0,398 ± 0,241 ^a
GV0	0,647 ± 0,250 ^{a,b}
GV1	2,410 ± 1,419 ^{c,d}
GV2	1,562 ± 0,873 ^{b,c}
GV3	2,230 ± 0,835 ^d

^{a, b, c, d} Letras diferentes representam médias com diferenças significativas entre si para $P \leq 0,05$

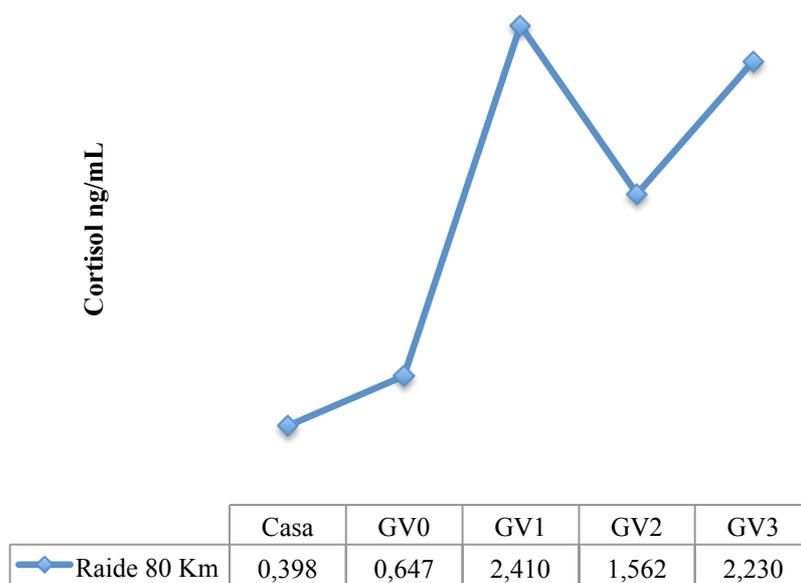


Gráfico 5: CEP 80 Km - Níveis médios de cortisol salivar (ng/ml)

3.3.2.3. Correlações de Spearman

- Cortisol nos vários momentos

As concentrações salivares nos vários momentos foram igualmente avaliadas através do coeficiente de correlação de Spearman, estando apresentadas na tabela 17. Nesta tabela verifica-se apenas uma correlação significativa entre as concentrações de cortisol salivar nas GV1 e GV3 ($P=0,042$), ou seja, os cavalos com níveis de cortisol mais elevados após a 1ª fase da prova são também os que terminaram a prova com os níveis mais elevados, tal como no raide de 40 km.

Tabela 17: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre as concentrações salivares médias (ng/ml) nos vários momentos (n=6).

		Casa Cortisol	GV0 Cortisol	GV1 Cortisol	GV2 Cortisol	GV3 Cortisol
Casa Cortisol	Coeficiente de Correlação					
	Sig. (bilateral)					
GV0 Cortisol	Coeficiente de Correlação	-0,771				
	Sig. (bilateral)	0,072				
GV1 Cortisol	Coeficiente de Correlação	0,600	-0,486			
	Sig. (bilateral)	0,208	0,329			
GV2 Cortisol	Coeficiente de Correlação	0,543	-0,086	0,600		
	Sig. (bilateral)	0,266	0,872	0,208		
GV3 Cortisol	Coeficiente de Correlação	0,429	-0,486	0,829*	0,429	
	Sig. (bilateral)	0,397	0,329	0,042	0,397	

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

- Cortisol e frequência cardíaca (variável fisiológica)

Através da tabela 18 observa-se a relação entre a frequência cardíaca e a concentração de cortisol salivar em cada momento. A correlação de Spearman entre as duas variáveis na grelha veterinária 1 (GV1) é negativa e significativa ($P=0,036$), ou seja a um aumento dos níveis de cortisol salivar está associada uma frequência cardíaca mais baixa. Na figura 15 está representada a regressão com estimativa da curva que

demonstra a relação entre a concentração salivar média e a frequência cardíaca antes de iniciar a prova e nas grelhas veterinárias 1, 2 e 3.

Tabela 18: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) no mesmo momento (n=6).

		GV0	GV1	GV2	GV3
		FC	FC	FC	FC
Cortisol	Coefficiente de Correlação	0,580	-0,841*	0,093	0,555
	Sig. (bilateral)	0,228	0,036	0,862	0,252

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

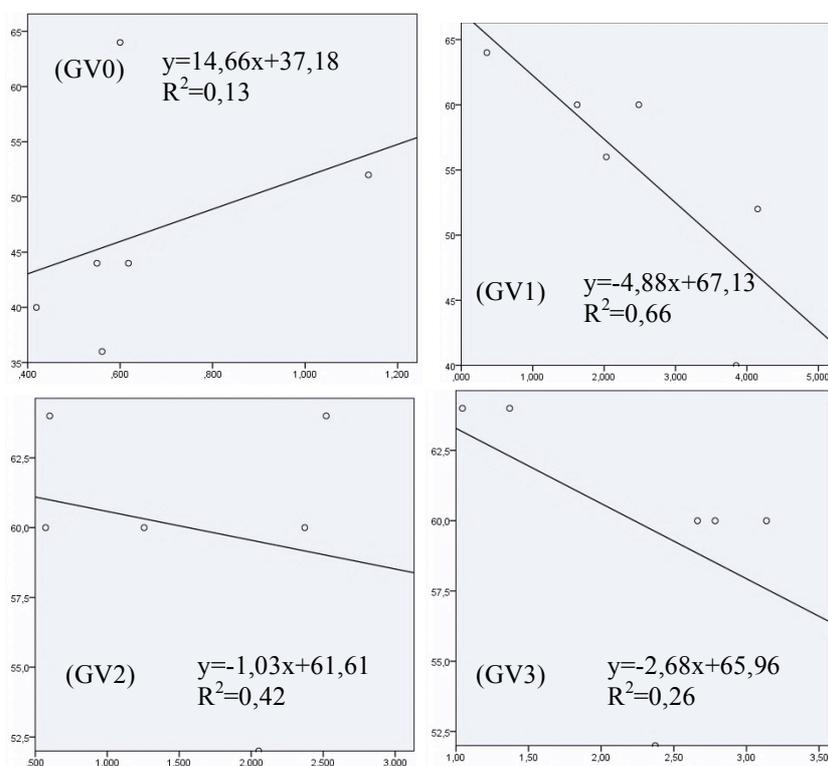


Fig. 15: CEP 80 Km - Regressões com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a frequência cardíaca (bpm) antes de iniciar a prova (GV0) e nas grelhas veterinárias 1 (GV1), 2 (GV2) e 3 (GV3).

- Cortisol e velocidade média (variável de performance)

Na tabela 19 a correlação de Spearman revela a ausência de correlações significativas entre a velocidade média em cada grelha e as concentrações salivares nos mesmos momentos. Não obstante, as correlações são sempre positivas, ou seja quanto maior a velocidade maior a concentração de cortisol salivar. Na figura 16 está representada a regressão com estimativa da curva que demonstra a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) nas grelhas veterinárias 1, 2 e 3.

Tabela 19: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) no mesmo momento (n=6).

		GV1	GV2	GV3
		VM	VM	VM
Cortisol	Coeficiente de Correlação	0,638	0,600	0,600
	Sig. (bilateral)	0,173	0,208	0,208

* A correlação é significativa para $P \leq 0,05$

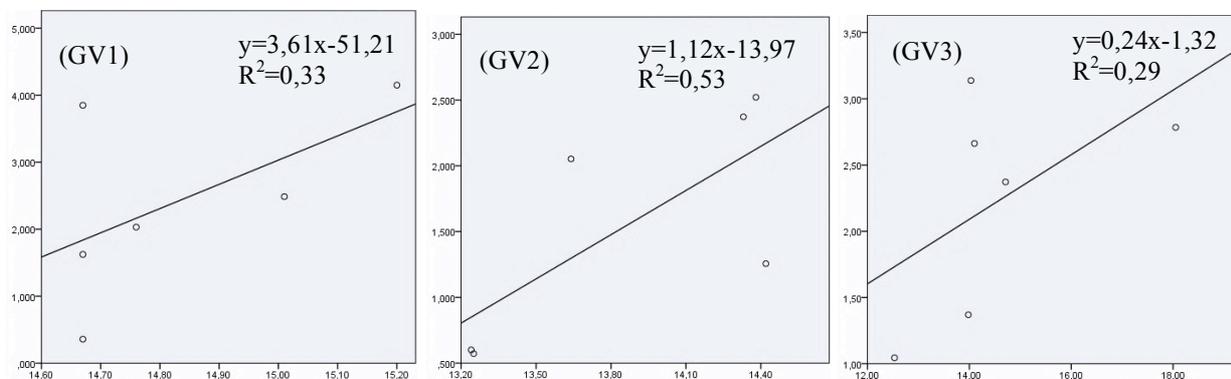


Fig. 16: CEP 80 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre a concentração salivar média (ng/ml) e a velocidade média (Km/h) nas grelhas veterinárias 1 (GV1), 2 (GV2) e 3 (GV3).

- Cortisol e tempo de recuperação (variável de performance)

Através da tabela 20 verifica-se que correlação de Spearman não revela correlações significativas entre o tempo de recuperação em cada grelha e as respectivas

concentrações salivares. Apesar disso pode observar-se uma correlação negativa entre a concentração do cortisol salivar na grelha veterinária 1 e o tempo de recuperação na mesma grelha, e pelo contrário correlações positivas entre a concentração do cortisol salivar média e os respetivos tempos de recuperação nas restantes grelhas.

Tabela 20: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre a concentração salivar média (ng/ml) e o tempo de recuperação no mesmo momento (s) (n=6).

		GV1	GV2	GV3
		TR	TR	TR
Cortisol	Coefficiente de Correlação	-0,086	0,200	0,086
	Sig. (bilateral)	0,872	0,704	0,872

- Velocidade média e tempo de recuperação (variáveis de *performance*)

No que se refere à relação entre a velocidade média e o tempo de recuperação nas duas primeiras grelhas o valor de P é muito elevado e o R^2 é inferior a 0,05, pelo que não se justifica a sua apresentação.

A partir da tabela 21 consegue-se verifica-se que correlação de Spearman não apresenta uma correlação significativa entre a velocidade média e o tempo de recuperação na grelha veterinária 3. No entanto pode observar-se que as correlações são positivas, ou seja quanto maior a velocidade média maior o tempo de recuperação. Na figura 17 está representada a regressão com estimativa da curva que demonstra a relação entre a velocidade média e o tempo de recuperação após a 3ª fase da prova.

Tabela 21: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre as variáveis de *performance* velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) (n=6).

		GV3
		VM
GV3	Coefficiente de Correlação	0,543
TR	Sig. (bilateral)	0,266

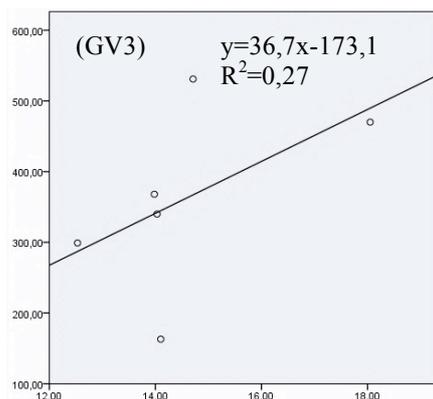


Fig. 17: CEP 80 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar entre a velocidade média (Km/h) e o tempo de recuperação (s) após a 3ª fase da prova (GV3) (n=6).

- Cortisol e classificação

A partir da tabela 22 consegue-se observar que correlação de Spearman não apresenta uma correlação significativa entre os níveis de cortisol salivar durante a prova, ou seja na inspeção pré-raide (GV0) e as grelhas médico-veterinárias 1, 2 e 3 (GV1, GV2 e GV3) e a classificação. No entanto a correlação é positiva, ou seja, quanto maiores os níveis de cortisol menor o valor da classificação e portanto melhor o resultado. Na figura 18 está representada a regressão com estimativa da curva que demonstra a relação entre os níveis de cortisol salivar durante a prova e a classificação.

Tabela 22: CEP 80 Km - Correlações de Spearman entre os níveis de cortisol durante a prova (GV1, GV2 e GV3) e a classificação da prova (n=6).

		Classificação
Cortisol	Coefficiente de Correlação	-0,600
	Sig. (bilateral)	0,208

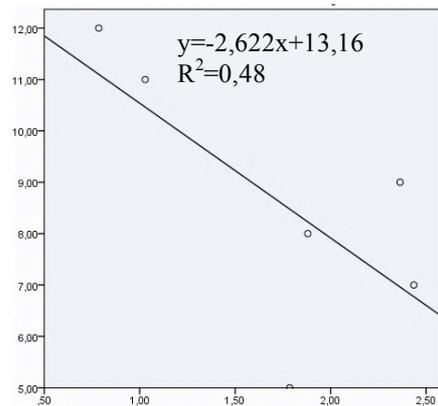


Fig. 18: CEP 80 Km - Regressão com estimativa da curva para demonstrar a relação entre os níveis de cortisol salivar durante a prova (ng/ml) e a classificação na prova (n=6).

3.4. Discussão

A temperatura e a humidade mais elevadas aumentam o risco de *stress* por calor (Didelot, 2006). A temperatura aumentou de grelha para grelha enquanto a humidade relativa variou de forma inversa. Entre a inspeção pré-raide e a grelha médico-veterinária 1 (GV1) houve um aumento substancial da temperatura ambiente, com uma diferença de 7,3° C, enquanto entre esta grelha e as restantes a diferença foi de cerca de 1° C. No raide de 40 Km o grande aumento de temperatura durante a 1ª fase pode justificar o aumento do tempo de repleção capilar logo na GV1. Esta alteração foi acompanhada de uma frequência cardíaca média superior às restantes. No conjunto as referidas observações, possivelmente, são a resposta fisiológica desencadeada pelo aumento do *stress* por calor (Langlois, 2006), desidratação (Janczarek *et al.*, 2013) e alteração do equilíbrio electrolítico (Robert, 2014). No raide de 80 Km o tempo de retração da prega cutânea só se alterou nas grelhas 2 e 3 (GV2 e GV3), o que pode revelar uma tolerância maior ao calor devido à melhoria dos mecanismos de dissipação de calor conseguidas com o treino (Larson *et al.*, 2013). Neste raide, a frequência cardíaca apresentou uma evolução diferente, foi aumentando até á GV2 e manteve-se na GV3. Durante o exercício a frequência cardíaca aumenta devido ao aumento da estimulação pelo sistema nervoso simpático em detrimento da estimulação do sistema nervoso parassimpático, com aumento da adrenalina em circulação (Marlin &

Nankervis, 2008), seguindo-se, com algum atraso, um aumento da libertação de cortisol (Becker-Birck *et al.*, 2013). Inicialmente o aumento da frequência cardíaca é proporcional ao esforço, depois deixa de ser linear e quando atinge a frequência cardíaca máxima pode permanecer num *plateau*. Portanto o nível de esforço atingido na GV2 pode ter sido suficiente para atingir a frequência cardíaca máxima e pode ter sido semelhante na GV3 porque as duas etapas que antecederam estas grelhas foram semelhantes e a distância percorrida foi igual (20 Km cada).

Durante a análise das médias dos valores de cortisol salivar dos dois raides verificaram-se alguns resultados distintos entre eles. Em ambos os raides houve um aumento dos níveis de cortisol salivar entre as amostras de casa e da inspeção pré-raide o que revela aumento da atividade hipotálamo-hipófise-adrenocortical. Este aumento pode resultar do *stress* causado pelo transporte (Fazio *et al.* 2008), pela antecipação da competição (Peeters, 2012; Becker-Birck *et al.*, 2013) e pela reação ao novo ambiente (Peeters *et al.*, 2013). A maioria dos estudos também detetaram um aumento dos níveis de cortisol 15 a 30 minutos antes da competição, considerando-o importante na resposta às adaptações comportamentais e exigências fisiológicas, onde primeiramente é responsável por recrutar os devidos recursos energéticos, secundariamente afeta a aprendizagem e emoção, e por último desempenha um papel homeostático regulando outros sistemas sensíveis ao *stress* (Peeters *et al.*, 2013). No entanto, apesar dos níveis de cortisol salivar determinados na inspeção pré-raide serem mais elevados que os níveis detetados em casa não diferiram significativamente, facto que pode ser explicado pelo facto destes cavalos terem experiência em ser transportados (Fazio *et al.* 2008, Becker-Birck *et al.*, 2013) e já terem ido a competições (Janczarek *et al.*, 2013).

Durante o raide de 40 km a média dos valores de cortisol salivar aumentaram de forma progressiva entre grelhas o que refletiu a contribuição neuroendócrina influenciada pela duração do exercício já descrita noutros estudos (Janczarek *et al.*, 2013; Kędzierski *et al.*, 2013a; Strzelec *et al.*, 2011; Hyypä, 2005; Nagata *et al.*, 1999;). Já durante o raide de 80 Km a evolução dos níveis médios de cortisol salivar foi diferente. Na GV0 a média do cortisol salivar diferiu significativamente da média na GV1. Os valores significativamente mais elevados na GV1 podem ser justificados pela emoção da participação na prova (Cayado *et al.* 2006). Foi na VG1 que se verificou o valor médio mais alto e está descrito que cavalos bem treinados atingem concentrações máximas

mais cedo (McKeever & Gordon, 2008). Uma ligeira descida dos níveis de cortisol após o pico na VG2, pode estar associada a uma diminuição da emoção da participação na prova, ou seja, mostra uma adaptação ao ambiente da competição e boa preparação física (Janczarek *et al.*, 2013). Se pelo contrário a descida fosse acentuada seria uma reação de defesa do organismo contra a exaustão (Cayado *et al.* 2006; Janczarek *et al.*, 2013). Na GV3 os níveis de cortisol salivar sobem novamente mas sem atingir os valores registados na GV1. As variações de menor amplitude estão associadas a cavalos melhor treinados (McKeever & Gordon, 2008).

A diferença entre o cortisol salivar em casa e a última grelha veterinária foi significativa em ambos os raides. Este resultado demonstra como este nível de exercício representa uma situação de *stress* que necessita da intervenção de mecanismos neuroendócrinos (Hyypä, 2005) para minimizar as perturbações da homeostase e aumentar a capacidade para lidar com a exigência do exercício (Hinchcliff & Geor, 2008).

A média dos níveis de cortisol do raide de 80 km foi superior à do raide de 40 Km o que vai de encontro ao descrito por Janczarek (2013) que relaciona este resultado com a distância percorrida, sendo que quanto maior for maior será a duração do exercício e maiores serão os valores de cortisol. No final do exercício estão descritos valores entre 3 vezes (Peeters *et al.*, 2013) e 10 vezes (Janczarek *et al.*, 2013) maiores que em repouso, sendo estas diferenças justificadas pela duração do exercício. Neste estudo, após os 40 Km os resultados foram 5 vezes maiores e após os 80 Km os valores foram 6 vezes maiores que em repouso.

Através da análise das correlações de Spearman observou-se que nas duas provas os cavalos com níveis de cortisol mais elevados após a 1ª fase da prova (GV1) são também os que a terminaram com níveis mais elevados.

Relativamente à associação entre o cortisol e a frequência cardíaca (variável fisiológica), no raide de 40 Km verificou-se uma associação negativa quase significativa ($P=0,054$) entre as duas variáveis na inspeção pré-raide, isto sugere que quanto maior a concentração média de cortisol salivar menor a frequência cardíaca. Neste caso deduz-se que o cortisol estaria a ter um impacto positivo, revelando-se como *eustress* a durante a adaptação ao novo ambiente (Peeters *et al.*, 2013). No raide de 80 Km observou-se uma correlação significativa entre as duas variáveis na GV1 e foi negativa, portanto, nesta grelha médico-veterinária o aumento dos níveis de cortisol salivar também foi

associado a uma frequência cardíaca mais baixa manifestando-se como um indicador de *eustress*. Este resultado também contribui para situação descrita por McKeever & Gordon (2008) que refere que os valores de cortisol significativamente mais elevados na GV1 podem ser sinónimos dos cavalos estarem bem treinados.

Nos restantes momentos a ausência de significância entre o cortisol e a frequência cardíaca já tinha sido descrita por Becker-Birck (2013) que estudou a associação da variação da frequência cardíaca e dos níveis de cortisol durante o exercício verificando que as mudanças não são exatamente paralelas. Janczarek (2013) refere que o cortisol se relaciona de forma diferente com os vários parâmetros médico-veterinários avaliados e que pode apresentar correlações significativas apenas no final da prova.

Entre o cortisol e as variáveis de *performance*, velocidade e tempo de recuperação, não houve correlações significativas. No entanto, observou-se que há uma tendência para quanto maior a velocidade maior a concentração de cortisol salivar. Isto pode ser explicado pelo facto de maior velocidade requerer maior exigência física, aumentando a exigência metabólica para em simultâneo conseguir obter a quantidade de substrato energético necessário, aumentar a eficácia dos mecanismos de dissipação de calor e manter o equilíbrio ácido-base e hidroeletrólítico dentro de limites aceitáveis (Votion, 2014). Estudos anteriores também não conseguiram clarificar a relação entre a velocidade e o cortisol (Janczarek *et al.*, 2013; Nagata *et al.*, 1999).

Quanto à associação entre o cortisol e o tempo de recuperação no raide de 80 Km houve uma correlação negativa (sem significância) na GV1, ou seja, o aumento dos níveis de cortisol salivar pode ter contribuído para diminuir o tempo de recuperação e nesse caso, mais uma vez, os valores elevados verificados na GV1 parecem estar associados a *eustress*. Pelo contrário, nas restantes grelhas as correlações entre a concentração do cortisol salivar média e os respetivos tempos de recuperação foram positivas. Os dados obtidos não são idênticos aos observados por Janczarek (2013) que verificou uma correlação positiva e significativa na última grelha da prova mas se aumentássemos o número de animais testados talvez a correlação fosse significativa. Em termos proporcionais quanto maior a velocidade maior a exigência física e por isso maior será a dificuldade e o tempo para recuperar, portanto esta tendência positiva é expectável. O desejado pelos participantes é que quanto maior for a velocidade a que realizam o raide o aumento do tempo de recuperação seja o menor possível porque isso vai traduzir-se

numa *performance* melhor e conseqüentemente numa classificação melhor.

A correlação de Spearman não apresentou uma correlação significativa entre os níveis de cortisol salivar durante a prova - inspeção pré-raide (GV0) e grelhas médico-veterinárias 1, 2 e 3 (no caso do raide de 80 Km) - e a classificação. Janczarek *et al.* (2013) concluiu que a correlação entre o nível de cortisol e os resultados desportivos é raramente visível e que não há uma resposta clara para a questão de como o aumento da atividade do córtex adrenal afeta os parâmetros médico-veterinários dos cavalos ou a sua velocidade durante a competição. Existem outros estudos que referem que grandes aumentos dos níveis de cortisol levam a um mau desempenho. Kedzierski *et al.* (2013a; 2013b) estudou cavalos PSI e PSA de corrida e observou valores mais elevados em cavalos menos treinados. Apesar de não significativa, a correlação observada no presente estudo, é positiva, ou seja, quanto maiores os níveis de cortisol melhor o resultado. No raide de 40 Km o cavalo que ficou em primeiro lugar foi o que apresentou o nível de cortisol médio mais elevado. Assim, este estudo vai de encontro ao descrito por Peeters *et al.* (2013) que associa valores significativamente mais elevados de cortisol nos cavalos vencedores em comparação com os vencidos. Esta autora avaliou os níveis de cortisol salivar em cavaleiros e cavalos durante um concurso de obstáculos e observou uma influência do cortisol sobre a *performance* oposta, ou seja, nos cavaleiros os níveis mais altos corresponderam a piores performances enquanto nos cavalos ocorreu o inverso.

IV. Conclusão

A colheita de amostras salivares foi um método não-invasivo, simples, prático e bem aceite pelo cavalo que não interferiu com os procedimentos normais das competições.

Há várias diferenças significativas entre os níveis de cortisol salivar e os vários momentos em que foram feitas as colheitas de saliva nos dois raides quando analisados em separado. Destacou-se uma diferença comum quanto aos níveis de cortisol em casa e no final da prova. Tanto no raide de 40 km como no de 80 Km os cavalos com níveis de cortisol mais elevados após a 1ª fase da prova (GV1) são também os que terminaram a prova com os níveis mais elevados.

A relação entre o cortisol e a frequência cardíaca durante o exercício não é exatamente paralela e por isso não houve uma associação significativa em todos os momentos. Este estudo, tal como outros, não obteve uma associação significativa entre o cortisol e a velocidade. A associação entre o cortisol e o tempo de recuperação também não ficou clara observando-se respostas diferentes em momentos diferentes. Relativamente à associação entre o cortisol e a classificação, apesar de não ter sido significativa foi sempre positiva, ou seja, quanto maiores os níveis de cortisol melhor o valor da classificação e portanto melhor o resultado, o que leva a querer que se a amostra fosse maior esta associação poderia ter sido significativa.

O exercício é uma situação de *stress* que exige uma resposta fisiológica adaptativa do organismo. Observando os resultados conclui-se que há uma elevada variabilidade individual e portanto são necessárias amostras maiores para estabelecer mais associações entre o cortisol, características individuais dos cavalos, parâmetros fisiológicos e de *performance*.

Verificou-se que níveis elevados de cortisol podem ser benéficos e que não há uma associação linear entre níveis de cortisol elevados e má *performance* como referido em alguns estudos. Portanto são necessários mais estudos para tirar quaisquer conclusões sobre a linha tênue entre *stress* fisiológico "normal" e uma boa *performance*, do *stress* "prejudicial" que compromete o bem-estar dos cavalos. Algumas soluções podem passar por realizar procedimentos de rotina ao longo dos programas de treino para monitorizar a melhoria ou deterioração da condição desportiva, comparando análises consecutivas; acompanhar a progressão de alguns cavalos ao longo da sua vida desportiva, analisando

as medições de cortisol e os resultados desde o raide de promoção ao raide de 160 Km; conseguir uma amostra de animais eliminados e procurar diferenciá-los dos cavalos com boas performances; ou estudar a variação dos níveis de cortisol em associação com outras ferramentas.

Em conclusão, este estudo confirma que colheita de saliva para determinação de cortisol é uma técnica promissora para utilização durante provas de resistência equestre mas definir que nível de cortisol é mais benéfico do ponto de vista dos parâmetros fisiológicos observados durante as competições para obter a melhor *performance* é um grande desafio. Portanto, este estudo revelou limitações na utilização do cortisol como indicador objectivo para ajudar os médicos-veterinários oficiais das provas a identificar mais precocemente cavalos em risco ou para fundamentar a eliminação destes das provas. Assim, há a necessidade de pesquisar novas ferramentas objetivas e não-invasivas.

Bibliografia

Atger, V. (2013) Le cheval d'endurance. In *L'Endurance: L'expérience et le respect du cheval avant la performance*. Ecurie Blue Ride Edition Equineews, France. pp. 34-44.

AVMA (2014) *Animal Welfare Principles*. Acedido em Novembro 5, 2014. Disponível em <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/AVMA-Animal-Welfare-Principles.aspx>.

Barnes A., Kingston J., Beetson, S., Kuiper, C. (2010) Endurance veterinarians detect physiologically compromised horses in a 160 km ride. *Equine Veterinary Journal*, 42 (38): 6-11. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00225.x

Becker-Birk, M., Schmidt, A., Lasarzik, J., Aurich, J., Mostl, E., Aurich, C. (2013) Cortisol release and heart rate variability in sport horses participating in equestrian competitions. *Journal of Veterinary Behaviour*, 8 (2): 87-94. doi:10.1016/j.jveb.2012.05.002

Bohák, Z., Szabó, F., Beckers, J.-F., Melo de Sousa, N., Kutasi, O., Nagy, K., Szenci, O. (2013) Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, 45(1): 38–42.

Cayado, P., Muñoz-Escassi, B., Domínguez, C., Manley, W., Olabarri, B., Sánchez de la Muela, M., Castejon, F., Marañón, G., Vara, E. (2006) Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Exercise Physiology*, 7 (36): 274-278.

Claudete Seadi (1998) *Princípios Básicos de Imunologia* (1ª ed.). Editora da Ulbra. Acedido em Novembro, 12, 2014. Disponível em http://books.google.pt/books?id=bamp89_V-4MC&pg=PA194&hl=pt-PT&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false.

Coombs, S.L. & Fisher, R.J. (2012) Endurance riding in 2012: too far too fast? *The Veterinary Journal*, 194 (3): 270-271.

Cortisol ELISA (2014) *Instruções de Utilização Kit referência 52061* In Portal da IBL internacional, <http://www.ibl-international.com>. Acedido em 12 de Novembro de 2014. Disponível em http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE52061_IFU_pt_Cortisol_ELISA_2014

-05_sym3.pdf

Couetil, L. (2009) 4th World Equine Airways Symposium. In *How do we define poor performance?*. IVIS, pp. 195-196.

Courtois, A. (2007) La fourbure chez le cheval d'endurance , enquête epidemiologique sur les saisons 2004 a 2007. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, La Faculté de Médecine de Créteil, França, pp.70-80.

Didelot, C. (2006) Evolution de parametres biologiques simples en relation avec l'entraînement et la performance chez le cheval d'endurance. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, La Faculté de Médecine de Créteil, França, pp. 7-43.

DRG International, Inc., USA (2012) *Cortisol RIA (RIA-4511)*. Acedido em Novembro 12, 2014. Disponível em <http://www.drg-international.com/ifu/ria-4511.pdf>

Emirates Equestrian Federation (2014) *EEF Endurance*. Acedido em Setembro 11, 2014. Disponível em <http://eef.ae/index.php?loading=eefendurance&default=1>.

Evans, D., Jeffcott, L., Knight, P. (2006) Performance-related problems and exercise physiology. In *The Equine Manual* (2nd ed.). Higgins, A., Snyder, J., Elsevier - Saunders, pp. 1063-1069.

Fazio, E., Medica, P., Aronica, V., Grasso, L., Ferlazzo, A. (2008) Circulating β -endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50 (6): 1-7. doi:10.1186/1751-0147-50-6

Federação Equestre Internacional (2014a) Capítulo I, Artigo 800 *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional (2014b) Capítulo I, Artigo 802. *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional (2014c) Capítulo I, Artigo 803. *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional (2014d) Capítulo I, Artigo 820. *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional(2014e) Capítulo I, Artigo 806. *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional (2014f) Capítulo III, Artigo 820. *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional (2014g) Capítulo III, Artigo 821. *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional (2014h) Capítulo IV, Artigo 824. *Endurance Rules*.

Federação Equestre Internacional (2014i) Acedido em Outubro 11, 2014. Disponível em <http://history.fei.org/node/125>.

Federação Equestre Internacional (2014j) *FEI code of conduct for the welfare of the horse*. Acedido em Novembro 5, 2014. Disponível em http://www.fei.org/system/files/Code_of_Conduct_Welfare_Horse_1Jan2013_0.pdf

Federação Equestre Internacional (2014l) Acedido em Dezembro 5, 2014. Disponível em <http://www.fei.org/news/endurance-strategic-planning-group-calls-immediate-and-sustainable-action>.

Federação Equestre Internacional (2014m) Endurance Strategic Planning Group's - Final Report and Recommendations for Bureau of the FEI. Acedido em Dezembro 5, 2014. Disponível em http://www.fei.org/system/files/Pt.2.1_ESPG_Final_Report_and_Recommendations_0.pdf

Federação Equestre Portuguesa (2014a) Capítulo I, Artigo 800. *Regulamento Nacional de Raides*.

Federação Equestre Portuguesa(2014b) Capítulo II, Artigo 814. *Regulamento Nacional de Raides*.

Federação Equestre Portuguesa (2014c) Capítulo II, Artigo 815. *Regulamento Nacional de Raides*.

Federação Equestre Portuguesa (2014d) Capítulo II, Artigo 816. *Regulamento Nacional de Raides*.

Fielding, C., Meier, C., Balch, O., Kass, P. (2011) Risk factors for the elimination of endurance horses from competition. *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, 239 (4): 493-498.

Fureix, C., Benhajali, H., Henry, S., Bruchet, A., Prunier, A., Ezzaouia, M., Jego, P. (2013) Plasma cortisol and faecal cortisol metabolites concentrations in stereotypic and non-stereotypic horses : do stereotypic horses cope better with poor environmental conditions?. *BMC Veterinary Research*, 9 (3): 10.

- Ganong, W.F. (2003). *Review of Medical Physiology* (21st ed.). McGraw-Hill, San Francisco, pp. 315-390.
- Greco, D. & Stabenfeldt, G.H. (2004) O sistema endócrino. In *Tratado de Fisiologia Veterinária* (4th ed.) Cunnigham, J.G. & Klein, B. G. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 333-368.
- Hinchcliff, K. W. & Geor, R. J. (2008) The horse as an athlete: a physiological overview. In *Equine Exercise Physiology - The science of exercise in athletic horse* (1st ed.) Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., Geor, R.J., Saunders - Elsevier, pp. 2-10.
- Hinchcliff, K. W. (2014) The horse as an athlete. In *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of tehe equine athlete* (2nd ed.) Hinchcliff, K., Kaneps, A., Geor, R., Elsevier - Saunders, pp. 3-9.
- Hughes, T., Creighton, E., Coleman, R. (2010) Salivary and fecal cortisol as measures of stress in horses. *Journal of Veterinary Behavior*, 5 (1): 59-60.
- Hyypä, S. (2005) Endocrinal responses in exercising horses. *Livestock Production Science*, 92 (2): 113-121. doi:10.1016/j.livprodsci.2004.11.014
- Janczarek, I., Bereznowski, A., Strzelec, K. (2013) The influence of selected fators and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentration. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16 (3): 533-541. doi:10.2478/pjvs-2013-0074
- Kaushik, A., Vasudev, A., Arya, S. K., Pasha, S. K., Bhansali, S. (2014) Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application. *Biosensors & Bioelectronics*, 53: 499-512. doi:10.1016/j.bios.2013.09.060
- Kędzierski, W., Cywińska, A., Strzelec, K., Kowalik, S. (2013a) Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Animal Science Journal*, 85 (3): 313-317. doi:10.1111/asj.12146
- Kędzierski, W., Strzelec, K., Cywińska, A., Kowalik, S. (2013b) Salivary Cortisol Concentration in Exercised Thoroughbred Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33 (12): 1106-1109. doi:10.1016/j.jevs.2013.04.011
- Langlois, C. (2006). Développement de troubles métaboliques chez les chevaux

d'endurance lors de courses de longue distance : étude épidémiologique sur les épreuves françaises en 2003. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, La Faculté de Médecine de Créteil, França, pp. 15-48.

Larson, J., Pilborg, P., Johansen M., Christophersen, M., Holte, A., Roepstorff, L., Olsen, L., Harrison, P. (2013) Physiological Parameters of Endurance Horses Pre-Compared to Post-Race, Correlated with Performance: a two race study from Scandinavia. *ISRN Veterinary Science*, 2013, Article ID 684353.

Liesens, L. (2014) Endurance - El libro de un jinete... para los jinetes. pp. 17–30.

Linden, A., Art, T., Amory, H., Desmecht, D., Lekeux, P. (1991) Effect of 5 Different Types of Exercise, Transportation and ACTH Administration on Plasma Cortisol Concentration in Sport Horses. *Equine Exercise Physiology*, 3: 391-396.

Marc, M., Parvizi, N., Ellendorff, F., Kallweit, E., Elsaesser, F. (2000) Plasma cortisol and ACTH concentrations in the warmblood horse in response to a standardized treadmill exercise test as physiological markers for evaluation of training status. *Journal Animal Science*, 78: 1936-1946.

Marlin, D. & Nankervis, K. (2002) Aspects of physiological stress and fatigue. In *Equine Exercise Physiology* (1st ed.) Blackwell Publishing, pp. 127-133.

McGreevy, P., McLean, A., Buckley, P., McConaghy, F., McLean, C. (2011) How riding may affect welfare: What the equine veterinarian needs to know. *Equine Veterinary Education*, 23 (10): 531-539. doi: 10.1111/j.2042-3292.2010.00217.x

McKeever, K. H. & Gordon, M. E. (2008) Endocrine alterations in the equine athlete. In *Equine Exercise Physiology - The science of exercise in athletic horse* (1st ed.) Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., Geor, R.J., Saunders - Elsevier, pp. 271-291.

McKenzie, E. (2011) Muscle physiology and nutrition in exercising horses. *Equine Veterinary Journal*, 43 (6): 637-639. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00468.x

Möstl, E., & Palme, R. (2002) Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23 (1-2), pp. 67-74. Acedido em Setembro 15, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3734172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Nagata, S., Takeda, F., Kurosawa, M., Mima, K., Hiraga, A., Kai, M., Taya, K. (1999) Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines response to various exercises. *Equine Exercise Physiology*, 5 (30): 570-574.
- Nagy, A., Dyson, S.J., Murray, J.K. (2013b) Riders' prediction of results at Fédération Equestre Internationale (FEI) endurance rides and sources of bias in questionnaires completed by riders. *Preventive veterinary medicine*, 112 (3-4): 378-386.
- Nagy, A., Dyson, S.J., Murray, J.K. (2012) A veterinary review of endurance riding as an international competitive sport. *The Veterinary Journal*, 194 (3): 288-93.
- Nagy, A., Murray, J.K., Dyson, S. (2010) Elimination from elite endurance rides in nine countries: a preliminary study. *Equine Veterinary Journal*, 42 (38): 637-643.
- Nagy, A., Murray, J.K., Dyson, S.J. (2013a) Descriptive epidemiology and risk factors for eliminations from Fédération Equestre Internationale endurance rides due to lameness and metabolic reasons (2008-2011). *Equine Veterinary Journal*, 46 (1): 38-44.
- Nogueira, G., Barnabe, R., Bedran-de-Castro, J., Moreira, A., Fernandes, W., Mirandola, R., Howard, D. (2002) Serum cortisol, lactate and creatinine concentrations in Thoroughbred fillies of different ages and states of training. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39 (1): 54-57.
- Parot, C. (2011). Bilans héματο-biochimiques chez le cheval d'Endurance de haut niveau: intérêt pronostic et proposition de valeurs de référence. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, La Faculté de Médecine de Créteil, França, pp.42-50.
- Peeters, M. (2012) Evaluation du niveau de stress du cheval en compétition et en milieu hospitalier. *Évaluation du niveau de stress du cheval en compétition et en milieu hospitalier - Mesures comportementales, physiologiques et appréciation du tempérament*. Thèse de doctorat en Sciences, Université de Liège, França, pp. 23-80.
- Peeters, M., Closson, C., Beckers, J., Vandenhede, M. (2013) Rider and Horse Salivary Cortisol Levels During Competition and Impact on Performance. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33 (3): 155-160. doi:10.1016/j.jevs.2012.05.073
- Peeters, M., Sulon, J., Beckers, J.-F., Ledoux, D., Vandenhede, M. (2011) Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an

adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Veterinary Journal*, 43 (4): 487–93.
doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00294.x

Pösö, A. R., Hyppa, S., Geor, R. J. (2008) Metabolic responses to exercise and training. In *Equine Exercise Physiology - The science of exercise in athletic horse* (1st ed.) Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., Geor, R.J., Saunders - Elsevier, pp. 248-267.

Reece, W. O. (2005) Endocrine system. In *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals* (3st ed.) Lippincott Williams & Wilkins, Iowa, pp. 457-472.

Ridgeway, K.J. (1994) Training endurance horses. In *The Athletic Horse. Principles and Practices of Equine Sports Medicine* Hodgson, D.R., Rose, R. J., W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 409-417.

Rivero, J.-L. L. & Piercy, R. J. (2014). Muscle physiology: responses to exercise and training. In *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete* (2nd ed.) Hinchcliff, K., Kaneps, A., Geor, R., Elsevier - Saunders, pp. 69-73.

Robert, C., (2014). Veterinary aspects of training and racing endurance horses. In *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete* (2nd ed.) Hinchcliff, K., Kaneps, A., Geor, R., Elsevier - Saunders, pp. 1083-1088.

Schwean, K. (2008). The welfare of horses: review of recent literature. University of Saskatchewan, Canada.

Sena, A. (2007). Suivi clinique de chevaux d'endurance en course de niveau national (CEN, CEI): contribution a la détermination des paramètres les plus pertinents. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, La Faculté de Médecine de Créteil, França, pp. 11-67.

Smith, A. (2002, September 10). Amateur days are long gone. *The Telegraph*. Acedido em Novembro 15, 2014. Disponível em: <http://www.telegraph.co.uk/sport/3034231/Amateur-days-are-long-gone.html>

Strzelec, K., Kankofer, M., Pietrzak, S. (2011) Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise. *Acta Veterinaria Brno*, 80 (1): 101-105.
doi:10.2754/avb201180010101

Valera, M., Bartolomé, E., Sánchez, M., Molina, A., Cook, N., Schaefer, A. (2012) Changes in Eye Temperature and Stress Assessment in Horses During Show Jumping Competitions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (12): 827-830. doi:10.1016/j.jevs.2012.03.005

Van der Kolk, J. H. (2014) Endocrine function during exercise and response to training. In *Equine Sports Medicine and Surgery - Basic and clinical science of the equine athlete* (2nd ed.) Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., Geor, R.J., Elsevier - Saunders, pp. 759-780.

Von Lewinski, M., Biau, S., Erber, R., Ille, N., Aurich, J., Faure, J.-M., Mostl, E., Aurich, C. (2013) Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider: Different responses to training and performance. *The Veterinary Journal*, 197 (13): 229-232. dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.025

Votion, D. (2014) Metabolic responses to exercise and training. In *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete* (2nd ed.) Hinchcliff, K., Kaneps, A., Geor, R., Elsevier - Saunders, pp. 747-761.

Anexos

Anexo 1: Consentimento informado

I Raide Hípico de São Pedro - Muralha de Évora

Sábado, 28 de Junho de 2014

Herdade da Mitra

Informação Proprietários/Cavaleiros - Projecto Clínico

*"Doseamento de cortisol salivar em provas de resistência equestre:
stress versus performance"*

1) O que é o cortisol salivar?

O cortisol salivar é uma hormona glucocorticóide produzida no córtex adrenal, envolvida na homeostase de processos bioquímicos vitais durante o esforço, situações de *stress* e reacções fisiológicas. Esta hormona é afectada por vários factores individuais, ambientais e pelo exercício (tipo, tempo e intensidade).

2) Qual o procedimento para colheita de saliva?

Para a colheita de saliva é usado algodão com forma cilíndrica específico para doseamento de cortisol salivar (kit de recolha Salivette® - Sarstedt). O procedimento compreende a inserção do algodão na boca do cavalo, com ajuda de uma pinça hemostática, e a realização de várias passagens nas bochechas, língua ou palato, durante 30 a 40 segundos. As amostras são posteriormente centrifugadas e armazenadas até à determinação dos níveis de cortisol.



Retirado de http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_42521/en/assessing-equine-stress?part=3

3) Objectivo do estudo clínico

Determinar a utilidade do doseamento de cortisol salivar como indicador objectivo de *stress* em cavalos antes, durante e após provas de resistência equestre, colhido de forma não-invasiva pela saliva, numa tentativa de estabelecer correlações com as informações obtidas a partir das avaliações veterinárias, características individuais, condições ambientais e *performance* desportiva.

4) Que cavalos são elegíveis para participar neste estudo?

Cavalos participantes em três tipos de provas de resistência equestre realizadas no mesmo dia:

- Velocidade controlada de 40Km (Concurso de Endurance de Promoção - CEP 40Km)
- Velocidade controlada de 80Km (Concurso de Endurance de Promoção - CEP 80Km)
- Velocidade livre de 80Km (Concurso de Endurance Nacional - CEN1*)

5) Como vão funcionar as colheitas durante a prova?

As colheitas de saliva serão realizadas, antes da prova e imediatamente após cada grelha veterinária.

6) Quais os requisitos para participar no estudo?

Aos participantes no estudo é pedido que não lhes seja dado alimento nos 30 minutos que antecedem a colheita de saliva a realizar antes da prova.

7) Os resultados serão comunicados aos cavaleiros?

Os resultados das avaliações poderão ser divulgados aos cavaleiros ou proprietários que manifestem esse interesse.

8) Quais são as contrapartidas da participação do seu cavalo neste estudo?

Os concorrentes que participarem no estudo têm desconto na inscrição da prova.

9) Quais são os riscos da participação do seu cavalo neste projecto?

O procedimento a realizar é um método não-invasivo e rápido que não incomoda o cavalo.

10) Confidencialidade das informações obtidas nesse projeto

Os dados e imagens obtidos durante o estudo clínico (colheita da amostra, doseamento do cortisol salivar, assim como a avaliação feita pelos veterinários oficiais da prova, fotografias e vídeos) são confidenciais. Caso esses dados e imagens sejam usados no futuro para alguma publicação ou palestra, a identidade dos cavalos e cavaleiros não será revelada.

I Raide Hípico de São Pedro - Muralha de Évora

Sábado, 28 de Junho de 2014

Herdade da Mitra

Inscrição no Raide e Estudo Clínico

(CEP 40 Km, CEP 80 Km, CEN* 80 Km)

Identificação do Proprietário	
Nome	
Telefone	
E-mail	

Identificação do Cavaleiro	
Nome	
Telefone	
E-mail	

Identificação Cavallo	
Nome	
Idade	
Sexo	
Raça	
Carácter/temperamento	
Maneio (ar livre, estábulo ou misto)	
Alimentação	
Tempo de Transporte	
Treinador do Cavallo	

Leu o documento informativo para o cavaleiro:

- Sim e ACEITO participar no estudo clínico
- Sim NÃO ACEITO participar no estudo clínico

Nota: O cavalo não deve ter alimento à disposição nos 30 minutos que antecedem a colheita de saliva.

Contactos:

- equimuralha@hvetmuralha.com
- www.hvetmuralha.com

