

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CORTISOL, RESPOSTA GLICÊMICA E SECREÇÃO
DE INSULINA EM EQUINOS CLINICAMENTE
SADIOS SUBMETIDOS A SESSÕES DE HIPÓXIA
NORMOBÁRICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diego De Gasperi

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**CORTISOL, RESPOSTA GLICÊMICA E SECREÇÃO DE INSULINA
EM EQUINOS CLINICAMENTE SADIOS SUBMETIDOS A SESSÕES
DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA**

por

Diego De Gasperi

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Flávio Desessards De La Corte

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CORTISOL, RESPOSTA GLICÊMICA E SECREÇÃO DE INSULINA
EM EQUINOS CLINICAMENTE SADIOS SUBMETIDOS A SESSÕES
DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA**

elaborada por
Diego De Gasperi

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Flávio Desessards De La Corte, PhD
(Presidente/Orientador)

Luiz Osório Cruz Portela, Dr. (UFSM)

Charles Ferreira Martins, Dr. (UFPEL)

Santa Maria, 26 de Julho de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Aos meu orientador Prof. Flávio Desessards De La Corte pela confiança durante o período em que trabalhamos juntos e pela oportunidade de aprendizado tanto na Clínica de Equinos da UFSM, como nas viagens a campo;

Aos professores Karin Erica Brass, Carlos Antônio Mondino Silva, Luiz Sérgio Segala de Oliveira e Mara Iolanda Batistella Rubin, pelos ensinamentos transmitidos nesses anos de convivência;

Ao meu co-orientador Prof. Luiz Osório Cruz Portela pelo empréstimo do equipamento e pelas dicas úteis na hora da confecção e montagem do sistema utilizado;

Aos colegas Eduardo A. da Silveira, Roberta C. da Fontoura Pereira, Diego Rafael P. da Silva, Ricardo Pozzobon e Marcos S. Azevedo pela colaboração na realização do experimento e pelo coleguismo;

Ao amigo Rogério Ferreira pelo auxílio prestado na realização da análise estatística e confecção dos gráficos;

Aos colegas de pós-graduação Henrique C. de Abreu e Endrigo Pompermayer pelo companheirismo durante o trabalho na clínica;

Aos estagiários da Clínica de Equinos pelo auxílio prestado com o manejo e tratamento dos animais utilizados no experimento;

À Milena Mendes Kirinus pelo carinho, apoio e paciência;

Aos meus Pais, Claudio e Susana, por representarem a “base” de tudo que eu aprendi até hoje. Pela confiança e pelo apoio em todas as minhas decisões.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

CORTISOL, RESPOSTA GLICÊMICA E SECREÇÃO DE INSULINA EM EQUINOS CLINICAMENTE SADIOS SUBMETIDOS A SESSÕES DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA

Autor: Diego De Gasperi

Orientador: Flávio Desessards De La Corte

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de Julho de 2010.

No passado a maioria das pesquisas apontou para os efeitos da hipóxia aguda ou crônica no intuito de estudar a adaptação em resposta às altas altitudes. Mais recentemente, alguns estudos têm buscado desvendar os efeitos da exposição à hipóxia intermitente (HI), objetivando explorar o valor terapêutico em pacientes e a influência potencial no desempenho de atletas. Muitos estudos demonstram que a exposição à hipóxia aguda ou crônica pode influenciar no metabolismo da glicose e hormônios relacionados, entretanto, os resultados ainda são inconsistentes, talvez devido aos vários protocolos usados até o momento. Em equinos, doenças como a miopatia por acúmulo de polissacarídeos, na qual os cavalos apresentam aumento na captação da glicose pelas células musculares e aumento da sensibilidade à insulina, podem ser alvo de futuros estudos para o uso potencial da HI em medicina veterinária. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da hipóxia normobárica intermitente nos níveis séricos de cortisol, resposta glicêmica e secreção de insulina de cavalos não exercitados. Cavalos adultos sadios (n=8) foram selecionados após exame físico e submetidos ao teste de tolerância à glicose intravenosa (0,5g/kg) (TTGIV). Amostras de sangue (n=11) foram coletadas entre 0 e 180 minutos após a administração de glicose para avaliar a resposta glicêmica e a secreção de insulina. Os animais foram então expostos a sessões de uma hora de hipóxia duas vezes ao dia, totalizando 43 sessões. Da primeira à última sessão o percentual de O₂ foi gradativamente diminuído de 17 a 12%. A frequência cardíaca e as amostras sanguíneas para a determinação do cortisol sérico foram coletadas antes e a cada 15 minutos durante as sessões 1, 4, 6, 8, 10, 14, 22 e 43. A TTGIV foi repetida ao final do estudo. Os níveis de cortisol sérico foram maiores na sessão 1 (S1) (17% O₂) quando comparados aos níveis da S10 (13% O₂) e da S43 (12% O₂) (P<0,05). A resposta glicêmica não foi significativamente alterada em equinos não exercitados submetidos a sessões de hipóxia normobárica de 17% a 12% de O₂, entretanto, foi necessária uma maior secreção de insulina, que sugere diminuição na sensibilidade a este hormônio. O declínio nos níveis de cortisol sérico e na frequência cardíaca sugere uma adaptação ao estímulo da hipóxia. A HI é um recurso que proporciona uma ampla área para novos estudos em cavalos, tanto como ferramenta terapêutica, quanto aos possíveis benefícios no desempenho atlético.

Palavras-chaves: cavalos; hipóxia intermitente; glicemia; estresse; altitude

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SERUM CORTISOL, GLYCEMIC RESPONSE AND INSULIN SECRETION IN HEALTHY HORSES EXPOSED TO NORMOBARIC HYPOXIA SESSIONS

Autor: Diego De Gasperi

Orientador: Flávio Desessards De La Corte

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de Julho de 2010.

Many studies pointed out to the effects of acute or chronic hypoxia in order to study the adaptation in response to high altitudes. Recently, some studies have tried to unravel the effects of exposure to intermittent hypoxia (IH), to explore the therapeutic value to patients and potential influence on the performance of athletes. Some studies show that exposure to acute or chronic hypoxia can influence the metabolism of glucose and related hormones, however, the results are still inconsistent. In horses affected with polysaccharide storage myopathy, in which horses show enhanced glucose uptake by muscle cells and increase insulin sensitivity may be the target of future studies for the potential use of IH in veterinary medicine. The aim of this study is to evaluate the effect of normobaric intermittent hypoxia in serum cortisol, blood glucose levels and insulin secretion in non-exercised horses. Healthy adult horses (n=8) were selected after physical examination and underwent an intravenous glucose tolerance test (0.5gr/kg) (IVGTT). Blood samples (n=11) were collected between 0 and 180 minutes after glucose administration to evaluate glycemic response and insulin secretion. Then, they were exposed to 1-hour hypoxia sessions twice a day, reaching a total of 43 hypoxia sessions. From first to last session the [O₂] was gradually decreased from 17% to 12%. The heart rate and the samples to measure serum cortisol were collected before and every 15 minutes during the sessions 1, 4, 6, 8, 10, 14, 22 and 43. The IVGTT was repeated at the end of the study. The serum cortisol levels were higher in session 1 (S1) (17% O₂) when compared to the levels of S10 (13% O₂) and S43 (12% O₂) (P<0.05). The glycemic response was not significantly altered in resting horses submitted to normobaric hypoxia sessions from 17% to 12% [O₂], however, required higher insulin secretion, suggesting a decrease in sensitivity to this hormone. The decline in serum cortisol and heart rate suggests an adaptation to the stimulus of hypoxia. IH is a resource that provides a wide area for further studies in horses, both as a therapeutic tool, about the potential benefits on athletic performance.

Key words: horses; intermittent hypoxia; glycemia; stress; altitude.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Resposta glicêmica (A) e secreção de insulina (B) durante o TTGIV realizado antes (Pré-tratamento) e após (Pós-tratamento) as 43 sessões de hipóxia. * indica diferença significativa entre os mesmos pontos das duas curvas ($P < 0,05$)..... 33

FIGURA 2: Concentrações séricas de cortisol (A) e frequência cardíaca (B) no decorrer das sessões com [O₂] de 17%, 13%, e na primeira e última sessão com 12% de O₂. * indica diferença significativa entre o ponto indicado e seu correspondente na S1 ($P < 0,05$)..... 34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Hipóxia intermitente.....	10
2.2. Produção da hipóxia	11
2.3. Efeito no metabolismo glicêmico e secreção de insulina	11
2.4. Efeito nos níveis séricos de cortisol	13
2.5. Possibilidades de uso terapêutico	15
2.6. Uso potencial na medicina esportiva.....	16
3. CAPÍTULO 1	18
4. CONCLUSÃO.....	34
5. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

Hipóxia é uma redução geral na oferta de oxigênio para os tecidos, causada pela diminuição do teor de O₂ arterial, diminuição do débito cardíaco, ou diminuição na captação de O₂ dos capilares sistêmicos, que podem resultar de uma série de complicações médicas, fatores ambientais ou esforço físico (KOLB, 2003). As adaptações fisiológicas à hipóxia e suas conseqüências são investigadas há muitos anos (PUGH, 1958; BASNYAT; MURDOCH, 2003).

Na medicina humana, o estudo dos efeitos da hipóxia tem importância clínica principalmente na determinação da fisiopatologia de doenças vasculares cerebrais (SEVERINGHAUS et al., 1966; SEGLER, 2001) e doenças cardiorrespiratórias (NEUBAUER, 2001; LEUNG; BRADLEY, 2001), além de ser relevante no discernimento da etiologia de doenças relacionadas ao deslocamento a altas altitudes (HACKETT; ROACH, 2004). Soma-se a isto o crescente interesse no estudo aplicado na fisiologia esportiva, na qual são investigados há bastante tempo os possíveis benefícios da hipóxia e o subsequente potencial de aumento no desempenho atlético (PUGH, 1967; STRAY-GUDENSER; LEVINE, 1999; JULIAN et al., 2004;).

Embora as respostas fisiológicas da exposição aguda ou crônica a baixas concentrações de O₂ já tenham sido muito pesquisadas, ainda pouco se conhece sobre os efeitos da hipóxia intermitente. Hipóxia intermitente é definida como repetidos episódios de hipóxia intercalados com períodos de normóxia ou com episódios de hipóxia de menor intensidade (POWELL; GARCIA, 2000; NEUBAUER, 2001). Existe uma grande variedade de protocolos utilizados em humanos, diferenciados pela intensidade da hipóxia, número de sessões por dia, tempo de duração de cada sessão e o número de dias de exposição. Essa variação é muito grande, existindo protocolos com vários episódios diários de 30 segundos, e outros com até 12 horas de exposição, com duração de 1 a 90 dias de tratamento (NEUBAUER, 2001).

Muitos trabalhos demonstram que diferentes condições de hipóxia podem influenciar no metabolismo da glicose e hormônios relacionados, entretanto, os resultados ainda são inconsistentes (BROOKS et al., 1991; SAWHNEY et al., 1991; YOUNG et al., 1992; CHENG et al., 1997; RAFF et al., 1999; POLOTSKY et al., 2003). Isso pode ocorrer pela

diversidade entre espécies, grau e duração da hipóxia ou como consequência da complexidade dos mecanismos regulatórios do metabolismo (CHEN et al., 2007).

Na literatura existente, poucas referências sobre os efeitos da hipóxia em cavalos podem ser encontradas, o que justifica esse trabalho pioneiro por se tratar do efeito da hipóxia normobárica no metabolismo de eqüinos. Portanto, o principal objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da hipóxia normobárica intermitente na resposta glicêmica, secreção de insulina e nos níveis de cortisol sanguíneo de eqüinos não exercitados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hipóxia intermitente

Com a prática do alpinismo e da aviação, tornou-se evidente que os humanos sofrem adaptações frente aos efeitos da hipóxia de maneira benéfica, maximizando o eficiente uso do O₂ para as demandas metabólicas (NEUBAUER, 2001). No deslocamento à altitude, a aclimatização às baixas concentrações de oxigênio (O₂) é refletida pelo progressivo aumento da ventilação e subsequente vasoconstrição, ajustando temporariamente a perfusão dos pulmões e conseqüentemente aumentando a oxigenação arterial (NEUBAUER, 2001; TOWNSEND, 2002). Essas adaptações no sistema cardiovascular melhoram a oferta de O₂ aos tecidos, que por sua vez também podem sofrer alterações que permitem uma melhor extração e utilização deste para os processos metabólicos (NEUBAUER, 2001). Em eqüinos as adaptações às altitudes elevadas podem se manifestar por um aumento no hematócrito, na concentração de hemoglobina e no número de capilares da musculatura esquelética (WICKLER; ANDERSON, 2000).

Em humanos a exposição à hipóxia intermitente (HI) começou de forma casual há muito tempo, quando alguns escaladores subiam das estações bases em baixas altitudes e estabeleciam estações intermediárias durante a tentativa de chegar ao pico. Muitas vezes eles retornavam à estação base para buscar mantimentos ou mesmo para dormir. Isso gerava uma exposição à hipóxia de maneira intermitente e com aumento gradativo de intensidade. Esta prática é feita até hoje e mais recentemente foi reconhecida como uma forma de acelerar e melhorar a aclimatização (POWELL; GARCIA, 2000).

Entretando, quando a HI possui um protocolo específico e é empregada sob condições normais de pressão com um objetivo pré-determinado, usa-se o termo Treinamento Intermitente em Hipóxia (IHT) (SEREBROVSKAYA, 2002). Desenvolvido inicialmente por cientistas russos, este método vem sendo utilizado com êxito em treinamentos esportivos e no tratamento de doenças degenerativas (HAHN; GORE, 2001).

2.2. Produção da hipóxia

O equipamento utilizado para a produção de hipóxia emprega o princípio da separação de ar por meio da tecnologia de membranas semipermeáveis que reduzem o oxigênio do ar atmosférico. Superfícies sólidas diversas tendem a atrair gases sob pressão. Dessa forma, o ar sob pressão enviado por um compressor passa por um tubo contendo uma câmara adsorvente de nitrogênio, onde este fica armazenado e o O₂ é liberado. Ao regular a velocidade de passagem do ar também se regula a pressão exercida por ele sobre as membranas. De acordo com a pressão empregada na passagem do ar, mais ou menos nitrogênio é retido, o que consequentemente determina a concentração de O₂ (BIOMEDTECH, 2006).

A intensidade de hipóxia é determinada pelo operador e exibida em porcentagem de O₂ através do painel da unidade de controle. Essa unidade consiste de uma torre eletrônica que regula a velocidade de passagem do ar, regulando a concentração de O₂ fornecido. Através deste sistema se consegue ar com até 9% de O₂, o que seria equivalente ao disponível em uma altitude de 6500 metros (BIOMEDTECH, 2006).

Ao sair do equipamento, o ar com baixa concentração de O₂ é conduzido a um reservatório, sendo assim disponibilizado ao equino através de um sistema de tubulação. Esse sistema é ligado a uma máscara vedada que possui duas válvulas externas de fluxo único para liberação do gás expirado (BIOMEDTECH, 2006).

2.3. Efeito no metabolismo glicêmico e secreção de insulina

A necessidade mínima de glicose para o funcionamento da maioria dos tecidos corporais não é a mesma, o que lhes conferem diferenças quanto a sua sensibilidade à insulina. Enquanto os leucócitos, tecido hepático, muscular e adiposo respondem rapidamente a esse hormônio, o cérebro, rins, intestino e eritrócitos apresentam pouca resposta (MAYES, 1993; REECE, 2009). Com exceção do fígado, o principal efeito da insulina no metabolismo de carboidratos nos tecidos sensíveis a ela é permitir o transporte da glicose através da membrana celular por difusão facilitada. No tecido hepático ela estimula enzimas que produzem glicogênio e auxiliam na lipogênese, e inibe enzimas que catalisam a glicogenólise. De uma maneira geral, esse hormônio promove a deposição de gordura e a síntese de proteína. O resultado da sua atividade é a diminuição da concentração sanguínea de glicose (HADLEY, 1996; REECE, 2009).

Muitas pesquisas demonstram que a hipóxia aguda ou crônica pode influenciar no metabolismo da glicose e hormônios relacionados. Ela pode causar aumento ou diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, insulina e glucagon, ou mesmo mantê-los sem alteração (BROOKS et al., 1991; SAWHNEY et al., 1991; YOUNG et al., 1992; CHENG et al., 1997; RAFF et al., 1999; POLOTSKY et al., 2003). Entretanto, os resultados ainda são inconsistentes.

Em humanos, a glicemia não se altera em resposta à hipóxia aguda (horas) (BROOKS et al., 1991), mas aumenta após 3 dias de hipóxia (SAWHNEY et al., 1991) e se restabelece (SAWHNEY et al., 1991; YOUNG et al., 1992) ou chega a concentrações menores às do nível do mar quando adaptados à altas altitudes (BROOKS et al., 1991). A concentração de insulina aumenta rapidamente (BROOKS et al., 1991), permanecendo alta por uma semana (SAWHNEY et al., 1991), e retorna aos valores apresentados ao nível do mar de 15 a 21 dias (BROOKS et al., 1991; SAWHNEY et al., 1991).

Resistência a insulina geralmente está acompanhada de hiperinsulinemia ou níveis normais de insulina com manifestações clínicas de hiperglicemia (CHENG et al., 1997; CHEN et al., 2007). Barnholt et al. (2006) demonstraram uma resistência a insulina transitória em humanos que rapidamente apresentaram hiperglicemia e hiperinsulinemia ao se deslocar do nível do mar a uma altitude de 4.300 metros. Tais índices voltaram aos valores normais no décimo dia de aclimatização.

Raff et al. (1999) expuseram ratos com diferentes idades a uma concentração de 12% de O₂ de forma contínua por 7 dias. Os autores demonstraram que ratos jovens diminuiram os níveis de glicose e insulina, enquanto que, ratos recém-nascidos apresentaram aumento desses níveis quando comparados aos ratos que permaneceram em normóxia. Cheng et al. (1997) concluíram que a hipóxia induziu uma resistência a insulina em terneiros recém-nascidos submetidos a uma concentração de O₂ de 4,8 a 5,9% por duas horas. Os animais apresentaram aumento dos níveis sanguíneos de glicose, insulina e cortisol, porém diminuição do nível de glucagon. Os autores sugeriram que o mecanismo primário da resistência à insulina foi a diminuição da sensibilidade de seus receptores nas células e da atividade da tirosina quinase, enzima que atua após a ligação da insulina ao receptor (NELSON; COX, 2006).

Polotsky et al. (2003) expuseram camundongos magros à hipóxia intermitente por 5 dias, resultando em diminuição da glicemia e aumento da tolerância à glicose sem alteração no nível sérico de insulina. Já em camundongos obesos, esse tratamento levou a uma diminuição da glicemia juntamente com o aumento da insulina sérica com o desenvolvimento de um aumento tempo-dependente da insulina sérica quando a exposição à hipóxia é mantida

por mais de 12 semanas. Os autores concluíram que a hipóxia intermitente aumenta a resistência à insulina em camundongos obesos.

Um dos fatores considerados como causadores da diminuição de sensibilidade à insulina pela HI é a ativação do sistema nervoso simpático (HARSCH, 2004; PLIQUETT, 2004), através da liberação de catecolaminas, que podem diminuir a sensibilidade à insulina, aumentar a gliconeogênese e diminuir a glicólise (DEIBERT; DEFRONZO, 1980). Entretanto, Iiyori et al. (2007) demonstraram que o bloqueio da atividade do sistema nervoso autônomo não atenua tais efeitos, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos na alteração do metabolismo pela hipóxia.

Outro fator a considerar é atividade corticotrófica da HI, que leva ao aumento do cortisol circulante decorrente da modificação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (COSTE et al., 2005). Este hormônio tem a capacidade de aumentar a resistência à insulina, inibir sua secreção pelas células β do pâncreas e aumentar a gliconeogênese hepática (LAMBILLOTTE et al., 1997; ANDREWS; WALKER 1999). Entretanto, mais recentemente foram sugeridas outras possíveis causas para o aumento da resistência à insulina quando da exposição à HI, como a formação de radicais livres e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (LOUIS; PUNJABI, 2009).

2.4. Efeito nos níveis séricos de cortisol

O cortisol é um hormônio que altera o metabolismo mudando os tipos e as quantidades de certas enzimas que são sintetizadas nas suas células-alvo (NELSON; COX, 2006). No fígado, o cortisol promove a gliconeogênese estimulando a síntese da enzima-chave fosfoenolpiruvato carboxiquinase, efeito oposto ao da insulina. Para isso, ele contribui também com o fornecimento de aminoácidos através da degradação da proteína muscular, e com glicerol liberado do tecido adiposo. Os ácidos graxos resultantes dessa reação servem de combustível para vários tecidos. A glicose produzida dessa forma é armazenada no fígado como glicogênio, ou transportada imediatamente aos tecidos que a necessitam (CUNNINGHAM, 2004; NELSON; COX, 2006). Os glicocorticóides inibem a captação de glicose e o metabolismo nos tecidos periféricos, particularmente no músculo e células adiposas, o que é chamado de “efeito antiinsulínico” (CUNNINGHAM, 2004). O objetivo final dessas alterações metabólicas é suprir energia nas respostas de luta ou fuga geralmente

associadas com o estresse, aumentando a glicemia de volta ao seu nível normal e armazenando glicogênio. Conseqüentemente, os efeitos do cortisol contrapõem-se aos da insulina (NELSON; COX, 2006).

Para Alexander e Irvine (1998), o aumento do cortisol livre é um bom indicador de que um equino sofre de estresse. Esta condição é mais comumente definida como o conjunto de reações do organismo a qualquer tipo de agressão capaz de perturbar-lhe a homeostase. As glândulas adrenais possuem o papel principal nas reações hormonais envolvidas no estresse, por estarem diretamente ligadas ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e ao sistema simpático. Apesar de muitos hormônios estarem envolvidos nesta resposta, o primeiro mecanismo endócrino de defesa é o aumento da secreção de glicocorticóides e catecolaminas (MÖSTL; PALME, 2002). De acordo com Aguilera (1994), a liberação desses hormônios é conseqüência do aumento circulante de ACTH, que possui mecanismos multifatoriais de regulação com efeito de fatores estimulantes do hipotálamo, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (VP), e a influência inibitória dos glicocorticóides quando em estresse crônico.

Já foi relatado que a hipóxia aguda em humanos não submetidos a exercício pode aumentar (HUMPELER et al., 1980) ou mesmo não alterar (SUTTON et al., 1977) os níveis de cortisol circulante. Com o deslocamento de pessoas do nível do mar a uma altitude de 4.300 metros, Barnholt et al. (2006) demonstraram que o nível desse hormônio aumentam gradativamente atingindo um pico no décimo dia, mantendo-se altos durante os 21 dias de observação nessas mesmas condições. Segundo Sawhney (1991), quando há exposição crônica a altas altitudes ocorre um aumento passageiro do cortisol sanguíneo, retornando aos níveis encontrados ao nível do mar após 30 dias de aclimatização.

De acordo com Beidleman (2005), há liberação de cortisol e adrenalina pelo estresse da hipóxia aguda quando da exposição de humanos à altitude. Porém, o autor afirma que a aclimatização induzida com 2 a 3 semanas de residência contínua nestes ambientes resulta no retorno desses hormônios aos níveis basais. Em um estudo mais recente, Beidleman et al. (2006) demonstraram que a exposição intermitente de 4hs por dia em 5 dias por semana, durante 3 semanas, a uma altitude equivalente a 4300m, não afetou os níveis de cortisol e adrenalina, ou seja, não induziu uma resposta hormonal ao estresse, recomendando tal regime como um método de “pré-aclimatização”.

Taylor (1998) estudando os efeitos endócrinos e metabólicos de pôneis anestesiados com ou sem determinado período de hipóxia induzida, sugeriu que o leve aumento na concentração plasmática de glicose observada no grupo que recebeu menos oxigênio, foi

consequência do aumento da atividade simpática como uma resposta ao estresse. Entretanto, o mesmo autor observou que os dois grupos apresentaram aumento nos níveis de cortisol durante a anestesia de maneira semelhante, sugerindo que anestesia geral por si só é nociva à espécie e estimula a resposta máxima do córtex adrenal, visto que não há incremento no aumento do hormônio pela ação de hipóxia, cirurgia ou hipercapnia.

Martos et al (2003) mensuraram os níveis de cortisol sanguíneo em equinos atendidos em um hospital veterinário com diferentes problemas clínicos. Os autores demonstraram que os animais com enfermidades de caráter inflamatório agudo apresentavam níveis de cortisol maior que o grupo controle, enquanto que os pacientes com lesões crônicas apresentavam níveis menores. No estresse crônico, a repetida exposição ao agente estressor produz uma habituação, ou seja, uma diminuição na resposta do eixo HHA (HAUGER, 1990). Este mecanismo ainda não está bem elucidado, entretanto, alguns estudos sugerem pode haver uma alteração permanente deste eixo (OSTRANDER et al., 2006).

Todavia, quando um indivíduo recebe repetidos estímulos semelhantes seguidos de um novo estímulo estressante, a resposta do eixo HHA passa a ser a mesma ou maior do que a resposta inicial (HAUGER, 1990; BAHTNAGAR; DALLMAN, 1998). Outros autores sugerem ainda que a hipóxia pode diminuir a sensibilidade da adrenal ao ACTH (BOUISSOU, 1988; COSTE et al., 2005).

2.5. Possibilidades de uso terapêutico

O uso clínico do IHT é mais reconhecido pelos médicos russos como uma modalidade terapêutica útil para o condicionamento do paciente ao estresse de uma série de doenças. O raciocínio baseia-se no valor protetor da adaptação a um estresse proporcionando resistência a outro, o que é chamado de “proteção-cruzada” (WALLACE; COHEN, 1984; MEERSON et al., 1994). O aumento da expressão de algumas proteínas e de fatores antioxidantes gerados pela adaptação pode promover proteção contra efeitos deletérios de outras enfermidades (MEERSON et al., 1992). O IHT mostrou ter efeito antiarrítmico em casos de isquemia aguda do miocárdio em ratos (MEERSON et al., 1987), prevenir aterosclerose experimental em coelhos (NEUBAUER, 2001 apud KITAEV et al., 1999), e proteger o miocárdio de cães do infarto experimentalmente induzido (ZONG et al., 2004).

O efeito protetor da HI no miocárdio é relacionado com o aumento de sua vascularização, do fluxo sanguíneo coronariano e da cardiomioglobina, além do aumento na

expressão de enzimas antioxidantes e proteínas do estresse (ZHUANG; ZHOU, 1999). De acordo com Neubauer (2001), essas adaptações são semelhantes às que ocorrem com a exposição à hipóxia crônica de forma contínua, que, por sua natureza, desenvolvem proteção contra o estresse oxidativo de uma variedade de processos de doenças.

Em humanos, pacientes de risco ou já apresentando doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), aumentaram a tolerância ao exercício após três semanas de exposição ao IHT (BURTSCHER et al., 2009). Em um trabalho de revisão, Serebrovskaya (2002) cita vários autores da antiga União Soviética que estudaram a HI como forma de tratamento de inúmeras doenças, como doenças pulmonares crônicas, asma bronquial, hipertensão, problemas emocionais, diabetes mellitus, doença de Parkinson, processos inflamatórios, toxicidade por radiação e algumas doenças ocupacionais.

Em equinos as principais causas de diminuição de desempenho atlético são as doenças musculoesqueléticas, respiratórias e cardiovasculares. Dentre as quais muitas são semelhantes às afecções humanas citadas anteriormente, como DPOC, arritmias cardíacas e doenças do miocárdio (HINES, 2004). Além dessas, doenças como a miopatia por acúmulo de polissacarídeos, na qual os cavalos apresentam um aumento na captação da glicose pelas células musculares e um aumento da sensibilidade à insulina (DE LA CORTE et al., 1999), podem ser alvo de futuros estudos.

2.6. Uso potencial na medicina esportiva

Em medicina esportiva o IHT é reconhecido como uma ferramenta utilizada para o aumento do desempenho de atletas (STRAY-GUDENSER; LEVINE, 1999). Pelo fato da exposição crônica à hipóxia poder causar sintomas adversos como náuseas, cefaléia, anorexia, sonolência e deficiências na transcrição e síntese protéica em humanos (HOPPELER et al., 2003), o treinamento pelo método “morar alto, treinar baixo” (live high, train low) passou a ser bastante utilizado. Dessa forma, promovem-se as adaptações hematológicas e ventilatórias, aumentando a capacidade de desempenho sem causar os efeitos adversos da exposição crônica à hipóxia (NEUBAUER, 2001).

A HI é capaz de estimular a produção de eritropoietina em humanos (KNAUPP et al, 1992; KOINSTINEN et al, 2000; SCHMIDT, 2002), aumentar a contagem de eritrócitos e hemoglobina, reduzir a frequência cardíaca em resposta ao exercício e aumentar a tolerância ao mesmo (ROBERTSON et al., 1982). Em equinos mantidos em altitudes elevadas já foi

relatado o aumento no hematócrito e na concentração de Hb (WICKLER; ANDERSON, 2000), o que pode gerar um aumento na disponibilidade de O₂ circulante e melhorar o desempenho durante exercícios (VOGT et al., 2001).

Burtscher et al. (2009) demonstraram que 21 dias de exposição ao IHT pode aumentar a tolerância ao exercício, relacionando tal efeito com o aumento na massa total de Hb, no tempo de limiar anaeróbico e na capacidade de difusão pulmonar. O aumento da massa eritrocitária, com conseqüente aumento no volume máximo de O₂ absorvido (VO₂) também está associado à melhora de desempenho atlético (STRAY-GUNDERSEN; LEVINE, 2008). Entretanto, alguns autores afirmam que independente de fatores hematológicos, o desempenho pode ser favorecido por alterações musculares como estímulo da angiogênese, aumento da densidade mitocondrial e conseqüente aumento da capacidade oxidativa das células (HOPPELER et al., 2003; GORE et al., 2007).

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**CORTISOL, RESPOSTA GLICÊMICA E SECREÇÃO DE INSULINA
EM EQÜINOS CLINICAMENTE SADIOS SUBMETIDOS A SESSÕES
DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA**

**Diego De Gasperi, Eduardo Almeida da Silveira, Diego Rafael Palma da Silva,
Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, Luiz Osório Cruz Portela, Karin Erica
Brass, Flávio Desessards De La Corte**

CIÊNCIA RURAL, 2010

Cortisol, resposta glicêmica e secreção de insulina em equinos clinicamente sadios submetidos a sessões de hipóxia normobárica

Serum cortisol, glycemic response and insulin secretion in healthy horses exposed to normobaric hypoxia sessions

**Diego De Gasperi¹, Eduardo Almeida da Silveira¹, Diego Rafael Palma da Silva¹,
Roberta Carneiro da Fontoura Pereira¹, Luiz Osório Cruz Portela², Karin Erica
Brass^{III}, Flávio Desessards De La Corte^{3*}**

RESUMO

Os níveis séricos de cortisol, resposta glicêmica e secreção de insulina foram avaliados em equinos não exercitados submetidos a sessões de hipóxia normobárica. Cavalos adultos sadios (n=8) foram selecionados após exame físico e submetidos ao teste de tolerância à glicose intravenosa (0,5g kg⁻¹) (TTGIV). Amostras de sangue (n=11) foram coletadas entre 0 e 180 minutos após a administração de glicose para avaliar a resposta glicêmica e a secreção de insulina. Os animais foram então expostos a sessões de uma hora de hipóxia duas vezes ao dia, totalizando 43 sessões, com concentração decrescente de O₂ de 17 a 12%. A frequência cardíaca e as amostras sanguíneas para a determinação do cortisol sérico foram coletadas antes e a cada 15 minutos durante as sessões 1, 4, 6, 8, 10, 14, 22 e 43. A TTGIV foi repetida ao final do estudo. Os níveis de cortisol sérico foram maiores na sessão 1 (S1) (17% O₂) quando comparados aos níveis da S10 (13% O₂) e da S43 (12% O₂)(P<0,05). A curva glicêmica de equinos clinicamente sadios não submetidos a exercício não é alterada pela exposição a 43 sessões de hipóxia normobárica. O aumento na secreção de insulina,

¹Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, Brasil.

²Laboratório de Fisiologia e Performance Humana, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Hospital Veterinário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: delacorte2005@yahoo.com.br *Autor para correspondência

acompanhada de diminuição da frequência cardíaca e cortisol sérico sugerem uma adaptação dos cavalos ao modelo de hipóxia utilizado.

Palavras-chave: cavalos, hipóxia intermitente, glicemia, estresse, altitude

ABSTRACT

The cortisol levels, glycemic response and insulin secretion were evaluated in non-exercised horses submitted to sessions of normobaric hypoxia. Healthy adult horses (n=8) were selected after physical examination and underwent an intravenous glucose tolerance test (0.5g kg⁻¹) (IVGTT). Blood samples (n=11) were collected between 0 and 180 minutes after glucose administration to evaluate glycemic response and insulin secretion. Then, they were exposed to 1-hour hypoxia sessions twice a day, reaching a total of 43 hypoxia sessions, with [O₂] decreasing from 17 to 12%. The heart rate and serum samples to measure cortisol were collected before and every 15 minutes during the sessions 1, 4, 6, 8, 10, 14, 22 and 43. The IVGTT was repeated at the end of the study. The serum cortisol levels were higher in session 1 (S1) (17% O₂) when compared to the levels of S10 (13% O₂) and S43 (12% O₂) (P<0.05). The glycemic curve in resting healthy horses is not altered by exposure to 43 normobaric hypoxia sessions. The increase in insulin secretion, followed by decreased heart rate and serum cortisol suggest an adaptation of the horses to hypoxia model used.

Key words: horses, intermittent hypoxia, glycemia, stress, altitude

INTRODUÇÃO

A exposição a um ambiente de hipóxia aguda ou crônica pode influenciar no metabolismo da glicose e hormônios relacionados, entretanto, os resultados publicados até o momento ainda são inconsistentes. Isso provavelmente ocorre pela diversidade entre espécies, grau e duração da hipóxia ou como consequência da complexidade dos mecanismos regulatórios do metabolismo (CHEN et al., 2007).

Estudos em diversas espécies demonstraram que a exposição a diferentes condições de hipóxia pode causar aumento da resistência à insulina (CHENG et al., 1997; BRAUN et al., 2001; POLOTSKY et al., 2003; IYORI et al., 2007). Um dos hormônios capaz de causar tal efeito é o cortisol (ANDREWS & WALKER, 1999), que pode estar com seus níveis circulantes aumentados quando da exposição aguda ou crônica de indivíduos a baixas concentrações de oxigênio ($[O_2]$) (HUMPELER et al., 1980; COSTE et al., 2005).

A elevação dos níveis de cortisol no sangue é um bom indicador que pode ser usado para avaliar se um equino sofre de estresse (ALEXANDER & IRVINE, 1998). As glândulas adrenais possuem o papel principal nas reações hormonais envolvidas nessa condição, por estarem diretamente ligadas ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e ao sistema simpático. Apesar de muitos hormônios estarem envolvidos nesta resposta, o primeiro mecanismo endócrino de defesa é o aumento da secreção de glicocorticóides e catecolaminas (MÖSTL & PALME, 2002). A liberação desses é consequência do aumento de ACTH circulante, que possui mecanismos multifatoriais de regulação com a liberação de fatores estimulantes do hipotálamo, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a vasopressina (VP), e a influência inibitória dos glicocorticóides quando em estresse crônico (AGUILERA, 1994).

No passado a maioria das pesquisas apontou para os efeitos da hipóxia aguda ou crônica no intuito de estudar a adaptação em resposta às altas altitudes. Mais recentemente, alguns estudos têm buscado desvendar os efeitos da exposição à hipóxia intermitente (HI), objetivando explorar o valor terapêutico em pacientes e a influência potencial no desempenho de atletas (NEUBAUER, 2001).

Na medicina, a HI já foi aplicada em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (BURTSCHER et al., 2009), hipertensão, processos inflamatórios, doença de

Parkinson, entre outras (SEREBROVSKAYA, 2002). Em animais, a HI mostrou ter efeito antiarrítmico em casos de isquemia aguda do miocárdio em ratos (MEERSON et al., 1987) e proteger o miocárdio de cães do infarto experimentalmente induzido (ZONG et al., 2004).

Em eqüinos as principais causas em ordem de diminuição de desempenho atlético são as doenças musculoesqueléticas, respiratórias e cardiovasculares. Dentre as quais, muitas são semelhantes às afecções citadas anteriormente, como DPOC, arritmias cardíacas e doenças do miocárdio (HINES, 2004). Além dessas, doenças como a miopatia por acúmulo de polissacarídeos, na qual os cavalos apresentam um aumento na captação da glicose pelas células musculares e um aumento da sensibilidade à insulina (DE LA CORTE et al., 1999), podem ser alvo de futuros estudos para o uso potencial da HI em medicina veterinária.

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da hipóxia normobárica intermitente na resposta glicêmica, secreção de insulina e nos níveis de cortisol sanguíneo de cavalos não exercitados.

MATERIAL E MÉTODOS

Oito equinos sem raça definida (5 fêmeas e 3 machos castrados), clinicamente saudáveis, com idade entre seis e 14 anos ($10 \pm 1,68$), provenientes da mesma região, com altitude inferior a 400 metros, alimentados previamente e durante o período de estudo apenas com feno de alfafa, foram usados neste experimento. Esses cavalos foram submetidos a 43 sessões de hipóxia normobárica com duração de uma hora durante o mês de Janeiro. A hipóxia foi gerada por um compressor e um módulo computadorizado^a que regula a retirada do oxigênio do ar atmosférico na concentração desejada. Os animais recebiam este ar com menor $[O_2]$ através de uma máscara^b, que era colocada 15 minutos antes do início de cada sessão. Nos quinze dias que antecederam o experimento os equinos foram habituados com o ambiente e com a máscara, permanecendo uma hora por dia com a mesma.

Nas três primeiras sessões foi utilizada uma [O₂] de 17%, que foi sendo reduzida em 1% a cada duas sessões até atingir a [O₂] de 13% que foi mantida por quatro sessões. A partir deste momento, a [O₂] foi reduzida a 12% e mantida por 30 sessões, completando assim as 43 sessões de hipóxia. Com exceção do primeiro dia, no qual os animais foram submetidos a apenas uma sessão, nos dias subsequentes o regime foi de duas sessões diárias, totalizando 22 dias de tratamento.

Com auxílio de anestesia local com lidocaína a 2%, foi fixado assepticamente um cateter^c 14G em uma das veias jugulares de cada cavalo, através do qual foram coletadas as amostras sanguíneas.

Antes do início da primeira sessão de hipóxia e ao final da última, os cavalos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose intravenosa (TTGIV). Para isso, foi administrada 0,5g de glicose por kg de peso vivo de uma solução a 50% durante um período de 10 minutos (MEHRING & TYZNIK, 1970; DE LA CORTE et al., 1999). Amostras de sangue foram coletadas antes, e 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a administração de glicose em tubos de ensaio contendo EDTA e fluoreto de potássio para determinação da concentração da glicose plasmática, e em tubos sem anticoagulante para dosagem da insulina sérica. As amostras foram imediatamente centrifugadas após a coleta e armazenadas a -80°C até o momento da determinação dos níveis de glicose e insulina através do teste enzimático de glicose-oxidase e quimioluminescência, respectivamente.

Para determinação sérica de cortisol foram coletadas amostras de sangue em tubos de ensaio sem anticoagulante durante as sessões 1, 4, 6, 8, 10, 14, 22 e 43. As coletas foram feitas imediatamente antes de colocar a máscara (-15), antes de iniciar a hipóxia (0), e 15, 30, 45 e 60 minutos após seu início. Essas amostras foram centrifugadas e o soro armazenado a -80°C até o momento da análise através do método de quimioluminescência. Imediatamente antes da coleta de cada amostra a frequência cardíaca (FC) do cavalo foi determinada.

O efeito dos distintos fatores nas variáveis dependentes foi analisado utilizando o PROC MIXED (mixed models, SAS Institute Inc., Cary, NC) em um modelo para dados repetidos. Foram determinados os efeitos principais de tratamento e tempo assim como sua interação. O efeito dos tratamentos sobre as variáveis dependentes em um tempo específico foi determinado pelo uso de ESTIMATES, também do SAS. Os resultados estão representados como média \pm erro padrão da média e o nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva glicêmica dos equinos submetidos ao teste intravenoso de tolerância à glicose não foi alterada pela exposição às 43 sessões de hipóxia (Figura 1-A). Por outro lado, a curva de insulina mostrou alteração significativa nos tempos de coleta 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos (Figura 1-B) ($P < 0,05$). Tal achado demonstra que, com exceção das amostras coletadas antes da administração de glicose e daquelas coletadas 180 minutos após, momento em que a glicemia volta aos níveis basais, foram necessários maiores níveis de insulina para manter os mesmos níveis de glicose.

Quando ocorre diminuição da sensibilidade à insulina há um aumento compensatório de sua secreção pelas células β pancreáticas (KAHN, 2003; KRONFELD et al., 2005). Foi o que demonstraram BARNHOLT et al. (2006) no homem após deslocamento do nível do mar para uma altitude de 4.300 metros. Com a exposição à hipóxia de forma contínua, RAFF et al. (1999) obtiveram resultados semelhantes expondo ratos recém nascidos a uma $[O_2]$ de 12% por 7 dias. Um aumento da resistência à insulina também foi observada em terneiros submetidos a uma $[O_2]$ de 4,8 a 5,9% (CHENG et al., 1997).

Utilizando HI, POLOTSKY et al. (2003) chegaram a mesma conclusão quando submeteram ratos a 5% de $[O_2]$, por períodos de 30 segundos seguidos de reoxigenação nos 30 segundos subseqüentes, durante 16 horas diárias por até 12 semanas. Entretanto, IYORI et

al. (2007) demonstraram que, com metodologia semelhante, um aumento da resistência à insulina em ratos é obtido com apenas 9 horas de exposição à HI. Não foi encontrada na literatura demonstração que tal efeito possa ser obtido com o método utilizado no presente estudo.

Embora os mecanismos desta relação ainda não estejam bem elucidados, um dos fatores ao qual se atribui a diminuição de sensibilidade à insulina pela HI é a ativação do sistema nervoso simpático (HARSCH, 2004; PLIQUETT et al., 2004), pela liberação de catecolaminas, que podem diminuir a sensibilidade à insulina, diminuir a glicólise e aumentar a gliconeogênese (DEIBERT & DEFRONZO, 1980). Entretanto, IYORI et al. (2007) demonstraram que o bloqueio da atividade do sistema nervoso autônomo não atenua tais efeitos, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos na alteração do metabolismo pela hipóxia.

Outro fator a considerar é atividade corticotrófica da HI, que pode levar ao aumento do cortisol circulante decorrente da modificação do eixo HHA (COSTE et al., 2005). Este hormônio tem a capacidade de aumentar a resistência à insulina, inibir sua secreção pelas células β do pâncreas e aumentar a gliconeogênese hepática (LAMBILLOTTE et al., 1997; ANDREWS & WALKER 1999).

TAYLOR (1998), estudando os efeitos endócrinos e metabólicos de pôneis anestesiados sendo ou não submetidos a um período de hipóxia induzida, sugeriu que o leve aumento na concentração plasmática de glicose e na frequência cardíaca observada no grupo que recebeu menos oxigênio, foi consequência do aumento da atividade simpática como uma resposta ao estresse. Entretanto, o mesmo autor observou que os dois grupos apresentaram elevação semelhante nos níveis de cortisol durante a anestesia, sugerindo que a anestesia geral por si só representa uma situação de estresse para a espécie e estimula a resposta máxima do

córtex adrenal, visto que não há aumento do hormônio pela ação de hipóxia, cirurgia ou hipercapnia.

Já foi relatado que a hipóxia aguda em humanos em repouso pode aumentar (HUMPELER et al., 1980), ou mesmo, não alterar (SUTTON et al., 1977) os níveis de cortisol circulante. Quando há exposição crônica a altitudes elevadas ocorre um aumento passageiro do cortisol sanguíneo, com retorno aos níveis encontrados ao nível do mar após 30 dias de aclimatização (SAWHNEY et al., 1991).

A concentração de cortisol foi superior na sessão com [O₂] de 17% (S1) após 30 minutos de exposição quando comparado aos valores da sessão com [O₂] de 13% (S10) (Figura 2-A) (P<0,05). Segundo HAUGER et al. (1990), no estresse crônico a exposição repetida ao agente estressor produz uma habituação, ou seja, pode ocorrer uma diminuição na resposta do eixo HHA. Apesar disso, quando um indivíduo recebe estímulos repetidos semelhantes seguidos de um novo estímulo estressante, a resposta do eixo HHA passa a ser a mesma ou maior do que a resposta inicial (HAUGER et al., 1990; BHATNAGAR & DALLMAN, 1998). Isso explica o fato de não ter havido diferença nos níveis de cortisol sérico quando a [O₂] foi reduzida a 12% (S14) em relação aos da S1 (17%) (Figura 2-A). O estímulo estressante continuou sendo a hipóxia, todavia, a [O₂] pode ter sido baixa o suficiente para representar um novo estímulo estressante. Talvez seja necessário expor esses indivíduos a mais sessões a 13% de O₂ para que o cortisol se mantenha mais baixo ou continue a diminuir.

Houve uma diminuição significativa nos níveis de cortisol a partir dos 15 minutos (P<0,05) na nona sessão em que os animais foram submetidos a 12% de O₂ (S22) comparado a S1 (17%). Além disso, quando S1 é comparada com a última sessão do experimento (S43) essa diferença é observada nos tempos -15, 0, 45 e 60 minutos (P<0,05) (Figura 3). Esses dados mostram que a exposição contínua a 12% de O₂ foi capaz de diminuir os níveis de

cortisol em relação ao início do tratamento. Não foram observadas diferenças entre as coletas feitas na mesma sessão.

Se os achados relativos ao cortisol são indicativos de um evento de estresse, estes são corroborados pela FC dos animais deste estudo. Analisando-se os dados de FC, ocorre um padrão semelhante, com diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os tempos quando as curvas da S1 são comparadas com a S10. Essa diferença se desfaz quase que totalmente na S14, momento em que a hipóxia é intensificada a 12% de O_2 , e volta a aparecer em alguns pontos na S43 (Figura 4).

CONCLUSÃO

A curva glicêmica de eqüinos clinicamente sadios não submetidos a exercício não é alterada pela exposição a 43 sessões de hipóxia normobárica.

O aumento na secreção de insulina, acompanhada de diminuição da frequência cardíaca e cortisol sérico sugerem uma adaptação dos cavalos ao modelo de hipóxia utilizado.

FONTES DE AQUISIÇÃO

a PORTABLE-2008 GO2Altitude® Hypoxicator: BIOMEDTECH AUSTRALIA Pty. Ltd.

17 Roberna Street Moorabbin, 3189, Victoria, Melbourne, Australia.

b ERA®Mask: BIOMEDTECH AUSTRÁLIA Pty. Ltda. 17 Roberna Street, Moorabbin, 189, Victoria, Melbourne, Australia.

c A-Cath®: BECTON DICKINSON IND. CIRÚRGICAS LTDA. Av. Pres. Juscelino Kubitschek, 273, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), parecer nº 015/2009, e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.15, p.321-350, 1994.
- ALEXANDER, S.; IRVINE, C.H.G. Stress in the racing horse: coping vs not coping. **Journal of Equine Science**, v.9, n.3, p.77-81, 1998.
- ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science**, v.96, p.513-523, 1999.
- BARNHOLT, K. E. et al. Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure (4,300 meters): modulating effects of caloric restriction. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.290, p.1078-1088, 2006.
- BHATNAGAR, S.; DALLMAN, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. **Neuroscience**, v.84, n.4, p.1025-1039, 1998.
- BRAUN, B. et al. Women at altitude: short-term exposure to hypoxia and/or α 1-adrenergic blockade reduces insulin sensitivity. **Journal of Applied Physiology**, v.91, p.623-631, 2001.
- BURTSCHER, M. et al. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in patients at risk for or with mild COPD. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.165, p.97-103, 2009.
- CHEN, X. et al. Effects of hypoxia on glucose, insulin, glucagon, and modulation by corticotropin-releasing factor receptor type 1 in the rat. **Endocrinology**, v.148, n.7, p.3271-3278, 2007.
- CHENG, N. et al. Effect of hypoxia on blood glucose, hormones, and insulin receptor functions in newborn calves. **Pediatric Research**, v.41, n.6, p.852-856, 1997.
- COSTE, O. et al. Hypoxic alterations of cortisol circadian rhythm in man after simulation of a long duration flight. **Steroids**, v.70, p.803-810, 2005.
- DEIBERT, D.C; DEFRONZO, R.A. Epinephrine-induced insulin resistance in man. **Journal of Clinical Investigation**, v.65, p.717-721, 1980.

DE LA CORTE, F.D. et al. Glucose uptake in horses with polysaccharide storage myopathy. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.4, p.458-462, 1999.

HARSCH, I.A. Continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.169, p.156-162, 2004.

HAUGER, R.L. et al. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. **Brain Research**, v.532, p.34-40, 1990.

HINES, M. T. Clinical approach to commonly encountered problems. In: REED, S. M. et al. **Equine internal medicine**. 2.ed. Saint Louis : Saunders, 2004. Cap.3, p.111-168.

HUMPELER, E. et al. Influence of exposure to moderate altitude on the plasma concentration of cortisol, aldosterone, rennin, testosterone and gonadotropins. **European Journal of Applied Physiology**, v.17, p.167-176, 1980.

IYORI, N. et al. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.175, p.851-857, 2007.

KAHN, S.E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v.46, p.3-19, 2003.

KRONFELD, D.S. et al. Insulin resistance in the horse: definition, detection, and dietetics. **Journal of Animal Science**, v.83, p.22-31, 2005.

LAMBILLOTTE, C. et al. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.3, p.414-423, 1997.

MEERSON, F.Z. et al. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. **Clinical Cardiology**, v 10, p.783-789, 1987.

MEHRING, J.S.; TYZNIK, W.J. Equine glucose tolerance. **Journal of Animal Science**, v.30, p.764-766, 1970.

MÖSTL, E.; PALME, R.. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74, 2002.

NEUBAUER, J.A. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia invited review: physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, v.90, p.1593-1599, 2001.

PLIQUETT, R.U. et al. Neurohumoral stimulation in type-2-diabetes as an emerging disease concept. **Cardiovascular Diabetology**, v.3, n.4, p.1-8, 2004.

POLOTSKY, V.Y. et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. **Journal of Physiology**, v.552, p.253-264, 2003.

RAFF, H. et al. The effect of hypoxia on plasma leptin and insulin in newborn and juvenile rats. **Endocrine**, v.11, n.1, p.37-39, 1999.

SAWHNEY, R.C. et al. Glucoregulatory hormones in man at high altitude. **European Journal Applied Physiology**, v.62, p.286-291, 1991.

SEREBROVSKAYA, T. V. Intermittent hypoxia research in the former Soviet Union and the Commonwealth of Independent States: history and review of the concept and selected applications. **High Altitude Medicine & Biology**, v.3, n.2, p.205-221, 2002.

SUTTON, J.R. Effect of acute hypoxia on the hormonal response to exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.42, p.587-592, 1977.

TAYLOR, P.M. Effects of hypoxia on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in ponies. **Research in Veterinary Science**, v.66, p.39-44, 1998.

ZONG, P. et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. **Experimental Biology and Medicine**, v.229, p.806-812, 2004.

LEGENDAS

Figura 1 - Resposta glicêmica (A) e secreção de insulina (B) durante o TTGIV realizado antes (Pré-tratamento) e após (Pós-tratamento) as 43 sessões de hipóxia. * indica diferença significativa entre os mesmos pontos das duas curvas ($P < 0,05$).

Figura 2 - Concentrações séricas de cortisol (A) e frequência cardíaca (B) no decorrer das sessões com [O₂] de 17%, 13%, e na primeira e última sessão com 12% de O₂. * indica diferença significativa entre o ponto indicado e seu correspondente na S1 ($P < 0,05$).

Figura 1

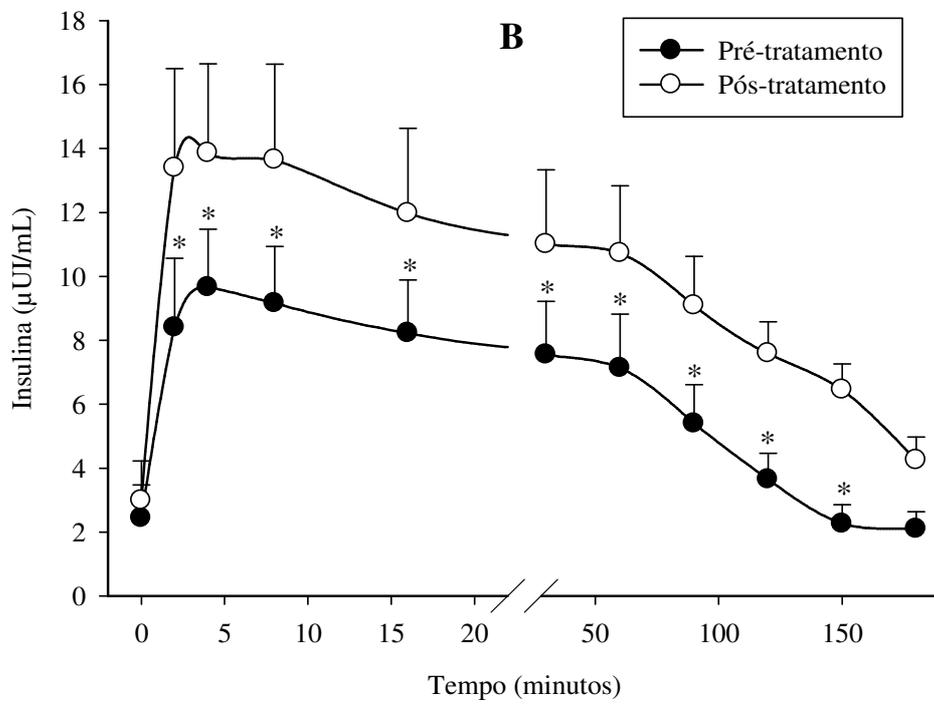
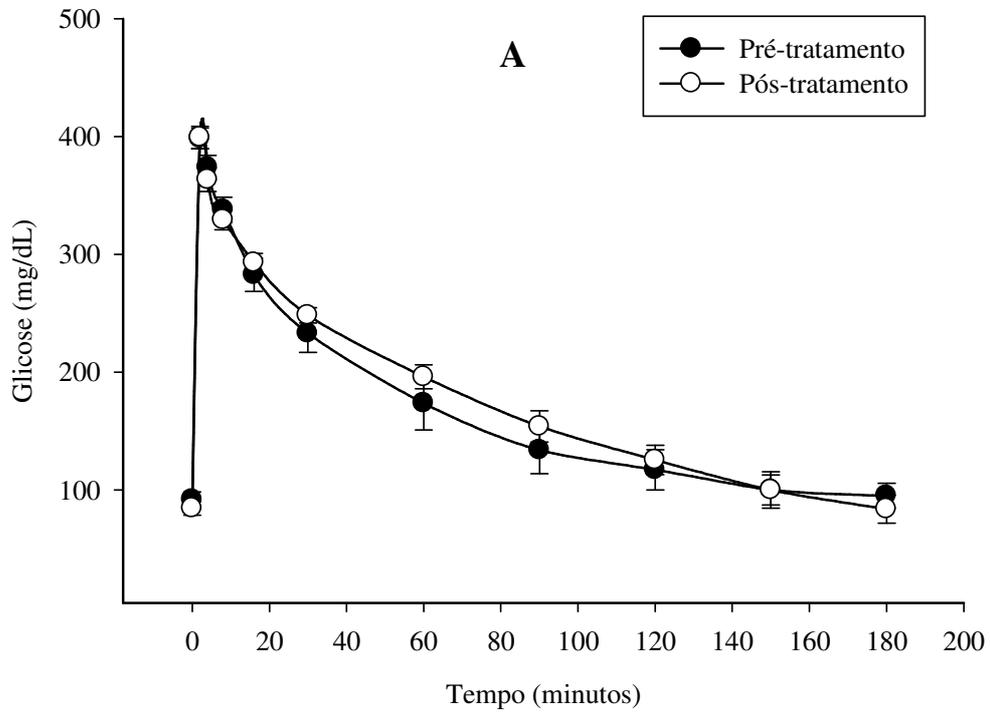
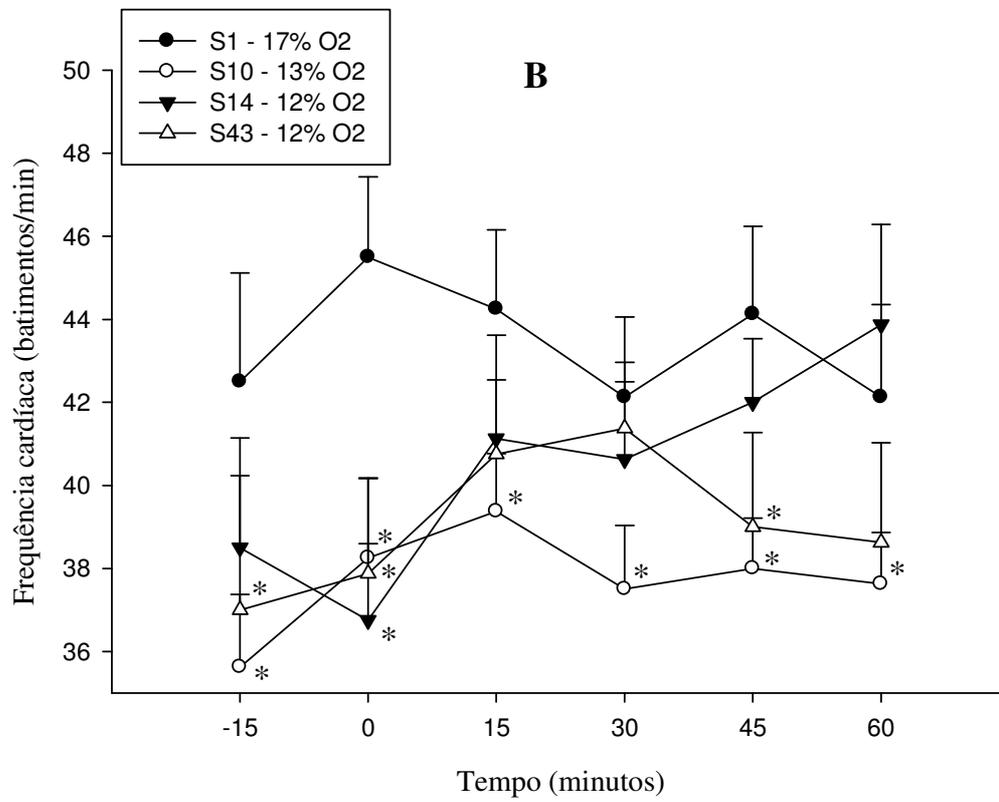
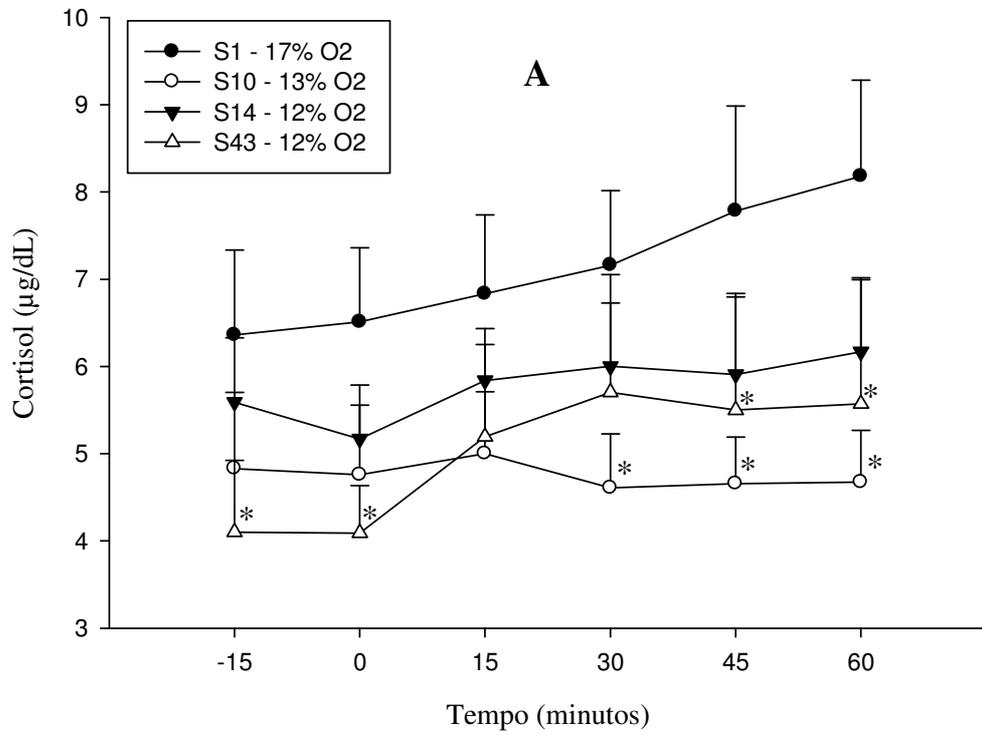


Figura 2



4. CONCLUSÃO

A curva glicêmica de equinos clinicamente sadios não submetidos a exercício não é alterada pela exposição a 43 sessões de hipóxia normobárica. No entanto, a manutenção da curva está associada a um incremento na secreção de insulina, o que sugere diminuição na sensibilidade a esse hormônio.

Houve adaptação dos cavalos ao modelo de hipóxia utilizado, o que é demonstrado pelos menores níveis de cortisol e frequência cardíaca ao final do tratamento.

A HI é um recurso que proporciona uma ampla área para novos estudos em cavalos, tanto como ferramenta terapêutica, quanto aos possíveis benefícios no desempenho atlético.

5. REFERÊNCIAS

AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 15, p. 321-350, 1994.

ALEXANDER, S.; IRVINE, C.H.G. Stress in the racing horse: coping vs not coping. **Journal of Equine Science**, v. 9, n. 3, p. 77-81, 1998.

ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science**, v.96, p.513-523, 1999.

BARNHOLT, K. E. et al. Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure (4,300 meters): modulating effects of caloric restriction. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 290, p.1078-1088, 2006.

BASNYAT, B.; MURDOCH, D. R. High-altitude illness. **The Lancet**, v. 361, june 2003, p. 1967-1974. Disponível em : < [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(03\)13591-X/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(03)13591-X/fulltext)> . Acesso em: 3 fev. 2010.

BEIDLEMAN, B.A. et al. White blood cell and hormonal responses to 4300 m altitude before and after intermittent altitude exposure. **Clinical Science**, v.111, p.163-169, 2006.

BHATNAGAR, S.; DALLMAN, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. **Neuroscience**, v.84, n.4, p.1025-1039, 1998.

BIOMEDTECH – BIOMEDICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT. **GO₂ Altitude Equine One Hypoxicator System: Operators Manual**, 1999-2006. p. 34, Melbourne, 2006.

BOUISSOU, P. et al. Plasma adrenocorticotrophin and cortisol responses to acute hypoxia at rest and during exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.57, n.1, p.110-113, 1988.

BROOKS, et al. Increased dependence on blood glucose after acclimatization to 4,300 m. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, n. 2, p.919-927, 1991.

BURTSCHER, M. et al. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in patients at risk for or with mild COPD. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.165, p.97-103, 2009.

CHEN, X. et al. Effects of hypoxia on glucose, insulin, glucagon, and modulation by corticotropin-releasing factor receptor type 1 in the rat. **Endocrinology**, v.148, n.7, p.3271–3278, 2007.

CHENG, N. et al. Effect of hypoxia on blood glucose, hormones, and insulin receptor functions in newborn calves. **Pediatric Research**, v.41, n.6, p.852-856, 1997.

COSTE, O. et al. Hypoxic alterations of cortisol circadian rhythm in man after simulation of a long duration flight. **Steroids**, v.70, p.803-810, 2005.

CUNNINGHAM, J.G. Glândulas endócrinas e suas funções. In: _____. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3rd ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004. Cap. 33, p. 350-384.

DEIBERT, D.C; DEFRONZO, R.A. Epinephrine-induced insulin resistance in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v.65, p.717-721, 1980.

DE LA CORTE, F.D. et al. Glucose uptake in horses with polysaccharide storage myopathy. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.4, p.458-462, 1999.

GORE, C. J. et al. Nonhematological mechanisms of improved sea level performance after hypoxic exposure. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 39, n. 9, p. 1600-1609, 2007.

HACKETT, P. H., ROACH, R. C. High altitude cerebral edema. **High Altitude Medicine & Biology**, v. 5, n. 2, p. 136-146, 2004.

HADLEY, M. E. Pancreatic hormones and metabolic regulation. In: _____. **Endocrinology**. 4th ed. New Jersey : Upper Saddle River, 1996. Cap. 11, p. 231-256.

HAHN, A. G.; GORE, C. J. The effect of altitude on cycling performance: A Challenge to Traditional Concepts. **Sports Medicine**, Auckland, v. 31, n. 7, p. 533-557, Jul. 2001.

HARSCH, I.A. Continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.169, p.156–162, 2004.

HAUGER, R.L. et al. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. **Brain Research**, v.532, p.34-40, 1990.

HINES, M. T. Clinical approach to commonly encountered problems. In: REED, S. M. et al. **Equine internal medicine**. 2nd ed. Saint Louis : Saunders, 2004. Cap.3, p. 111-168.

HOPPELER, H. et al. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. **Experimental Physiology**, v. 88, n. 1, p. 109-119, 2003.

HUMPELER, E. et al. Influence of exposure to moderate altitude on the plasma concentration of cortisol, aldosterone, rennin, testosterone and gonadotropins. **European Journal of Applied Physiology**, v.17, p.167–176, 1980.

IYORI, N. et al. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.175, p.851–857, 2007.

JULIAN, C. G. et al. Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p. 1800-1807, 2004.

KNAUPP, W. et al. Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, n. 3, p. 837-840, 1992.

KOISTINEN, P. O. et al. EPO, red cells, and serum transferrin receptor in continuous and intermittent hypoxia. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 4, p. 800-804, 2000.

KOLB, J. C. **Physiological responses to intermittent hypoxia in humans**. 2003. Tese – German Sport University Cologne, 2003.

LAMBILLOTTE, C. et al. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.3, p.414-423, 1997.

LEUNG, R. S. T.; BRADLEY, D. Sleep apnea and cardiovascular disease. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.164, p.2147–2165, 2001.

LOUIS, M; PUNJABI, N.M. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy. **Journal of Applied Physiology**, v.106, p.1538-1544, 2009.

MAYES, P. A. Gluconeogenesis & control of the blood glucose. In: MURRAY, R. K. et al. **Harper's Biochemistry**. 23th ed. East Norwalk : Appleton & Lange, 1993. Cap.21, p. 190-200.

MARTOS, N. et al. Cortisolemia en diferentes enfermedades equinas. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v. 19, p. 129-140, 2003.

MEERSON, F. Z.; USTINOVA, E. E.; ORLOVA, E. H. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. **Clinical Cardiology**, v. 10, p.783-789, 1987.

MEERSON, F. Z.; POZHAROV, V. ; MINYAIENKO, T. Superresistance against hypoxia after preliminary adaptation to repeated stress. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 5, p. 1856-1861, 1994.

MEERSON, F. Z.; MALYSHEV, I. Y.; ZAMOTRINSKY, A. V. Differences in adaptative stabilization of structures in response to stress and hypoxia relate with the accumulation of hsp70 isoforms. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 111, p.87-95, 1992.

MÖSTL, E.; PALME, R.. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67-74, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M.M. Regulação hormonal e integração do metabolismo dos mamíferos. In: _____. **Lehninger Princípios de Bioquímica**, 4th ed. São Paulo : Sarvier, 2006. Cap.23, p. 872-912.

NEUBAUER, J.A. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia invited review: physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, v.90, p.1593-1599, 2001.

OSTRANDER, M.M. et al. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. **Endocrinology**, v.147, n.4, p.2008-2017, 2006.

PLIQUETT, R.U. et al. Neurohumoral stimulation in type-2-diabetes as an emerging disease concept. **Cardiovascular Diabetology**, v.3, n.4, 2004.

POLOTSKY, V.Y. et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 253–264, 2003.

POWELL, F. L.; GARCIA, N. Physiological effects of intermittent hypoxia. **High Altitude Medicine & Biology**, v. 1, n. 2, p. 125-136, 2000.

PUGH, L. G. C. E. Muscular exercise on mount everest. **The Journal of Physiology**, v.141, p.233-261, 1958.

PUGH, L. G. C. E. Athletes at altitude. **The Journal of Physiology**, v. 192, p. 619-646, 1967.

RAFF, H.; BRUDER, E. D.; JANKOWSKI, B. M. The effect of hypoxia on plasma leptin and insulin in newborn and juvenile rats. **Endocrine**, v. 11, n. 1, p. 37-39, 1999.

REECE, W. O. Endocrine System. In: _____. **Funcional anatomy and physiology of domestic animals**. 4th ed. Ames : Wiley-Blackwell, 2009. Cap.6, p. 160-178.

ROBERTSON, R. J. et al. Effect of induced erythrocythemia on hypoxia tolerance during physical exercise . **Journal of Applied Physiology**, v. 53, n. 2, p.490-495, 1982.

SAWHNEY, R. C.; MALHOTRA, A. S.; SINGH, T. Glucoregulatory hormones in man at high altitude. **European Journal of Applied Physiology**, v. 62, p. 286-291, 1991.

SCHMIDT, W. Effects of intermittent exposure to high altitude on blood volume and erythropoietic activity. **High Altitude Medicine & Biology**, v. 3, n. 2, p. 167-176, 2002.

SEGLER, C. P. Prophylaxis of climbers for prevention of embolic accidents. **Medical Hypotheses**, v. 57, n. 4, p. 472-475, 2001.

SEREBROVSKAYA, T. V. Intermittent hypoxia research in the former Soviet Union and the Commonwealth of Independent States: history and review of the concept and selected applications. **High Altitude Medicine & Biology**, v. 3, n. 2, p. 205-221, 2002.

SEVERINGHAUS, J. W. et al. Cerebral blood flow in man at high altitude: role of cerebrospinal fluid pH in normalization of flow in chronic hypoxemia. **Circulation Research**, v. 19, p. 274-282, 1966.

STRAY-GUNDERSEN, J.; LEVINE, B. D. "Living high and training low" can improve sea level performance in endurance athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 3, p. 150–154, 1999.

SUTTON, J.R. Effect of acute hypoxia on the hormonal response to exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.42, p587–592, 1977.

TAYLOR, P.M.. Effects of hypoxia on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in ponies. **Research in Veterinary Science**, v. 66, p. 39–44, 1998.

TOWNSEND, N. E. et al. Living high-training low increases hypoxic ventilatory response of well-trained endurance athletes. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 1498–1505, 2002.

VOGT, M. et al. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 1, p. 173-182, 2001.

WALLACE, J.; COHEN, M. M. Gastric mucosal protection with chronic mild restraint: role of endogenous prostaglandins. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 10, p. 127-132, 1984.

WICKLER, S. J.; ANDERSON, T. P. Hematological changes and athletic performance in horses in response to high altitude (3800 m). **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. 1176-1181, 2000.

YOUNG, P.M. et al. Operation Everest II: metabolic and hormonal responses to incremental exercise to exhaustion. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 2574–2579, 1992.

ZHUANG, J-L.; ZHOU, Z. Protective effects of intermittent hypoxia adaptation on myocardium and its mechanisms. **Biological Signals and Receptors**, v. 8, p. 316-322, 1999.

ZONG, P. et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, p. 806-812, 2004.