

## Efeito Da Suplementação Com Prebiótico Na Resposta Imune De Cavalos Quarto De Milha De Corrida

### Effect Of Supplementation With Prebiotics In Immune Response In Racing Quarter Horse

Carolina Fernanda Morais Oliveira<sup>1</sup>; Ana Carolina R. C. Porto<sup>2</sup>; Talita Ibelli<sup>3</sup>

#### RESUMO

O uso de prebióticos como aditivo prebióticos para equinos tem sido cada vez mais frequente e tem como objetivo melhorar a saúde dos animais, já que promovem benefícios como melhor aproveitamento da dieta, desenvolvimento corporal e incremento na resposta imune. A criação de cavalos de esporte é uma prática crescente no Brasil e, como consequência de uma rigorosa seleção genética, a competitividade dos animais está cada vez maior. Para se obter resultados satisfatórios na performance de cavalos atletas e minimizar o efeito do exercício no sistema imunese faz necessário a implantação de medidas que melhorem a resposta imune dos animais submetidos a exercício intenso. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia do uso de prebióticos à base de MOS (mananoligossacarídeos) na resposta imune de cavalos submetidos a exercício intenso. O estudo foi realizado com cavalos da raça Quarto de Milha residentes do Jockey Clube de Sorocaba e submetidos a treinamento intenso. Foram formados dois grupos de dez animais, no qual os animais do grupo teste receberam prebiótico uma vez ao dia adicionado na ração, enquanto que os do grupo controle receberam apenas a dieta padrão. Os animais foram suplementados por 90 dias. Sessenta dias após o início da suplementação os animais foram imunizados com proteína de alto peso molecular para investigação da produção de anticorpos específicos após exercício intenso. Foi coletado sangue no dia da imunização, 21, 45 e 60 dias após. Foi realizado ensaio imunoenzimático para comparação na produção de anticorpos pelos animais dos diferentes grupos experimentais. Foi observado produção de anticorpos antígeno específicos em ambos os grupos analisados, porém de maneira ligeiramente superior nos animais suplementados com o aditivo prebiótico. Conclui-se que a utilização do aditivo prebiótico pode incrementar a resposta imune após exercício intenso.

**Palavra-chave:** Cavalos de esporte, Prebióticos, Resposta Imune, Treinamento.

#### ABSTRACT

The use of prebiotics as an additive for horses is increasing, goals including dietary benefits, improved physical development and increased immune response. In Brazil, increase of sport horse breeding, including rigorous genetic selection of these animals, leads to growing competitiveness in equestrian sports. In order to obtain better performance of these equine athletes horses, and to minimize negative effects of exercise on the immune system, actions to get better responses from the immune system of horses subjected to exercise become necessary. The goal of this study is to analyse the efficiency of prebiotics with mannanoligosaccharids on athlete horses immune system subjected to physical exercise. The study was realized on Quarter Horses stabled at Sorocaba Jockey Club, subject to intense training schedules. Two groups of ten horses each were formed. The horses of the Test Group were fed with their regular food and once a day prebiotics were added to it. The horses from the Control Group were fed with their regular food. They were supplemented after 90 days. Sixty days after the start of supplementation the animals were immunized with high molecular weight protein in order to investigate the specific antibody production after intense exercises. An enzyme linked immunosorbent test was done to compare the antibody production of these animals in both groups. Both groups showed production of antigen antibodies, which was slightly higher on animals supplemented with the prebiotic. It is concluded that the use of an additive can increment the immune response after intense exercise in horses.

**Keyword:** Immune Response, Prebiotics, Sport horses, Training.

<sup>1</sup>Graduanda do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba, Sorocaba-SP

<sup>2</sup>Professora Doutora do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba, Sorocaba-SP, CRMV-SP 15669.

<sup>3</sup>Médica Veterinária gerente da linha de equinos da Univittá Saúde Animal.

## Introdução

O Brasil tem o quarto maior rebanho equino do mundo, com 6 milhões de animais conforme dados estatísticos da FAO (Food and Agriculture Organization) e IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Censo Agropecuário em 31/12/2009 (CNA, 2010). O agronegócio equino é importante para a economia brasileira, pois ao todo são gerados cerca de R\$ 7,3 bilhões de negócios e mais de 700 mil empregos diretos, que vão desde o treinamento de animais, venda de insumos, eventos, esportes, entre outros (CNA, 2010). A vivência entre homem e cavalo vem sofrendo grandes mudanças, coincidentes com o crescimento acentuado da equideocultura nas últimas décadas. Em consequência das mudanças na utilização dos equinos, os estudos técnicos com enfoque no cavalo atleta ganham destaque, visto que hoje é grande a criação desses animais exclusivamente para participação em eventos equestres. A raça Quarto de Milha foi a primeira a ser desenvolvida na América. Surgiu nos Estados Unidos por volta do ano de 1600. Os primeiros exemplares da raça que a originaram foram trazidos da Arábia e Turquia à América do Norte pelos exploradores e comerciantes espanhóis.

Os garanhões escolhidos eram cruzados com éguas que vieram da Inglaterra, em 1611. O cruzamento produziu cavalos compactos, com músculos fortes, podendo correr distâncias curtas mais rapidamente do que nenhuma outra raça. Nos finais de semana, os colonizadores divertiam-se, promovendo corridas nas ruas das vilas e pelas estradas dos campos, perto das plantações, com distância de um quarto de milha (402 metros), originando o nome do cavalo. O plantel Quarto de Milha no Brasil é composto, segundo dados fornecidos pelo Stud Book da ABQM, até 13/08/2015, por 474.862 animais registrados, representados por 95.792 proprietários. Desse número, 45.447 são criadores e 26.917 associados cadastrados, espalhados por todos os estados brasileiros. Seus haras distribuídos em aproximadamente 1 milhão de hectares, são avaliados em mais de R\$ 19,8 bilhões, onde são consumidos anualmente em ração em torno de 336 mil toneladas, com gasto de cerca de R\$ 370 milhões. A mão-de-obra empregada diretamente também é bastante significativa, oferecendo 380 mil empregos diretos (ABQM, 2016).

O cavalo atleta é um corredor nato, mas para

apresentar resultados satisfatórios e melhorar a sua performance atlética se faz necessária a implantação de métodos de treinamento, alimentação e suplementação adequados em cada fase de sua carreira (FERRAZ, 2006). Sabe-se que o exercício físico intenso realizado durante treinamentos ou competições gera em humanos e animais variações em diversos parâmetros fisiológicos (MARQUES, 2002). Para o bom desempenho durante a realização de exercícios de alta, moderada e baixa intensidade, ocorre a exigência de um correto funcionamento dos sistemas nervoso, respiratório, cardiovascular e musculoesquelético, para que assim, seja preservada e mantida a homeostasia do organismo durante a execução dos exercícios cardiovascular e musculoesquelético, para que assim, seja preservada e mantida a homeostasia do organismo durante a execução dos exercícios. A participação do sistema nervoso autônomo e endócrino favorece a mobilização das reservas energéticas, controle da homeostasia cardiovascular e equilíbrio dos fluidos corporais (FOSS, 2000).

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimular a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, inibindo a multiplicação de patógenos, além de estimular a resposta imune, levando a benefícios adicionais ao organismo (ROBERFROID, 2002). Os dois principais polissacarídeos constituintes da parede celular das leveduras ( $\beta$ -D-glucanos e  $\alpha$ -D-manano) têm sido recentemente reconhecidos como prebióticos por serem capazes de promover modulação do sistema imune de diversos organismos vivos, desde insetos a humanos, mediante interações específicas com diferentes células imunocompetentes (GARCIA, 2008). Os mananoligossacarídeos (MOS) são obtidos a partir da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

Com o rebanho equino em ascensão, é fundamental o investimento em tecnologias para suprir as necessidades do animal de forma sustentável, minimizando efeitos colaterais da utilização destes produtos. As situações diversas nesta área têm atraído interesse dos pesquisadores em realizar estudos que possam promover aos cavalos condições propícias para o máximo desenvolvimento e desempenho. Assim, os prebióticos surgem como uma estratégia nutricional capaz de promover a manipulação da microbiota

intestinal para melhorar a saúde do hospedeiro. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência da adição de prebiótico MOS no incremento da resposta imune de cavalos submetidos a protocolos de treinamento físico intenso.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido no Jockey Clube de Sorocaba, na cocheira do treinador Rivail Rosa. Os animais permaneceram estabulados em baias individuais durante o estudo. Foram utilizados 20 cavalos da raça Quarto de Milha, com idade média três anos e peso médio 450 kg, vermifugados e imunizados contra tétano, influenza, herpesvírus e encefalomielite. Foram formados dois grupos experimentais compostos cada um por 10 equinos: O grupo teste recebeu suplementação com prebiótico à base de MOS via oral misturado à ração no primeiro trato da manhã, na dosagem indicada para animais em treinamento de 10g por animal por dia. A suplementação ocorreu por 90 dias. O grupo controle não recebeu a suplementação. Os animais foram treinados todos os dias na mesma intensidade, seguindo o protocolo do treinador, sendo 30 minutos no total.

Para avaliação da resposta imune humoral específica, sessenta dias após o início da suplementação foi realizada a imunização com uma proteína de alto peso molecular (Keyhole limpet hemocyanin – KLH) extraída do molusco *Megathura crenulata* que tem sido largamente utilizada como imunógeno em estudos com animais (LANCE et al., 2007). Os animais foram imunizados pela via intramuscular com 1mg de KLH (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) diluídos em 1 ml de água deionizada estéril.

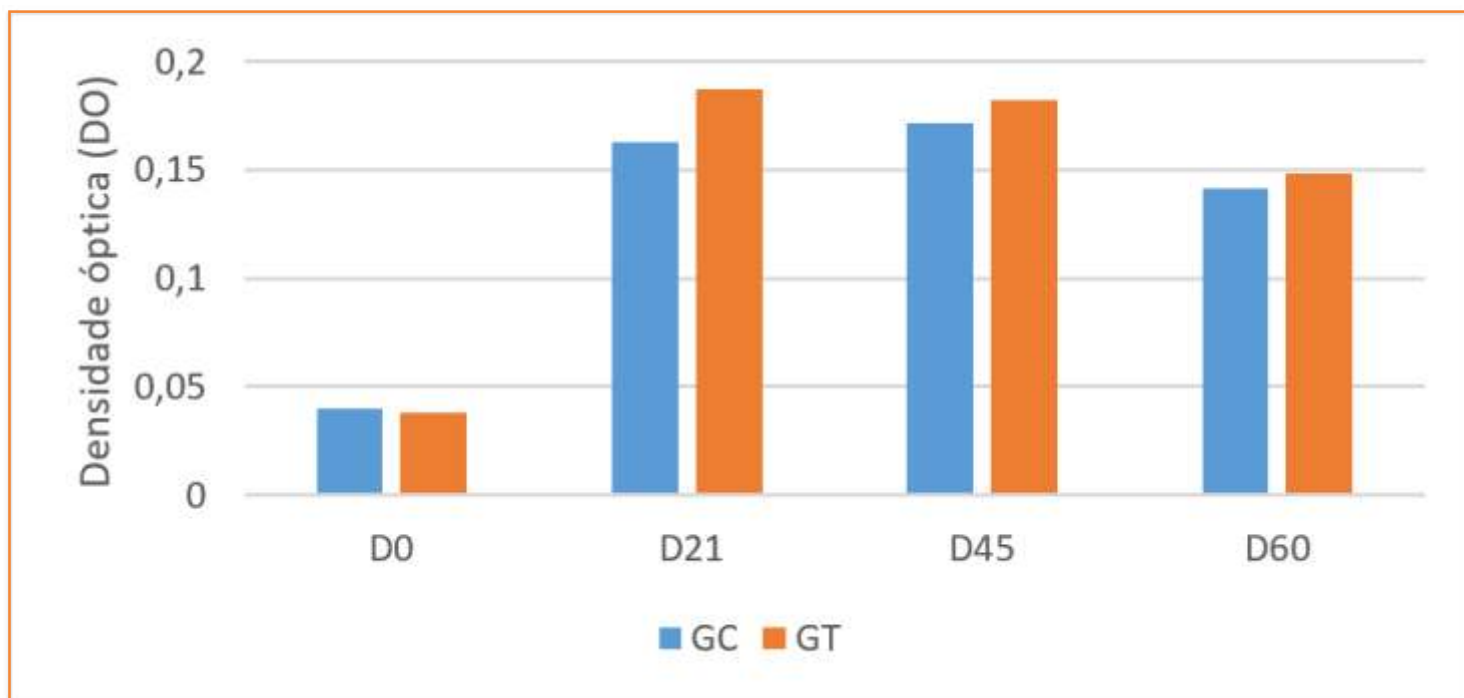
A coleta de sangue foi realizada pela via intravenosa através da punção da veia jugular, em tubos “vacutainers” sem anticoagulante nos dias da imunização, 21, 45, e 60 dias após a imunização. As amostras foram encaminhadas imediatamente ao laboratório da UNISO. Para a separação do soro, o sangue foi centrifugado após colheita a 1500g por 5 minutos sendo o soro transferido para microtubos para posterior análise imunológica. Para dosagens de imunoglobulinas no soro foi realizado o ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para verificar a presença de anticorpos IgG capazes de

reconhecer a proteína KLH. Placas de poliestireno de 96 poços (NUNC, Inc. Naperville USA) foram incubadas com a preparação de KHL (1%) em tampão carbonato de sódio 0,2M, pH 9,6 (50µL/poço). Após 24 horas de incubação a 4°C, o conteúdo líquido de cada poço foi removido através de lavagens sucessivas com PBS (tampão fosfato) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T/Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), seguindo-se bloqueio (100µL/poço) com gelatina a 3% diluída em PBS-T, por 1 hora a 37°C, em banho maria. As placas foram lavadas uma vez com PBS-T e incubadas com as amostras do soro antes e após a imunização, em diferentes diluições na solução de bloqueio (gelatina 1%), por 2 horas a 37°C.

Após 4 lavagens com PBS-T, foi incubado com anticorpos anti-IgG de equino conjugado a peroxidase (Bethyl Laboratories INC, Montgomery, Texas, USA) (100µL/poço). Após 1 hora de incubação a 37°C, os poços foram lavados 4 vezes com PBS-T e em seguida a reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de 100µL/poço da solução reveladora [peróxido de hidrogênio 0,1% (30 vol, 19µL) (Merck S.A., Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, BR), ortofenilenodiamina (5mg) (p/v) (Sigma), ácido cítrico 0,1M (3mL), fosfato de sódio 0,2M (3,2mL) pH 5,5 e água destilada (6,25mL)], com incubação por 10 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 2M. A leitura de absorvância foi feita em comprimento de onda de 490nm em leitor automático de ELISA (Multiskan MMC/340 P, Version 2.20).

## Resultados e discussão

Os animais foram alimentados com alfafa e feno, além de 7 kg de ração por dia, divididos em duas refeições. A água foi consumida *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo, sem intercorrências. O soro coletado antes da imunização não apresentou anticorpos capazes de reconhecer o antígeno (D0). Já 21 dias após a imunização foi possível observar a produção de anticorpos antígenos específicos em ambos os grupos, de maneira mais acentuada no grupo suplementado, porém sem apresentar diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais do grupo controle. Até o último dia analisado, foi possível observar presença de anticorpos antígeno específicos, de maneira mais pronunciada nos animais



**Figura 1.** Representação gráfica da produção de anticorpos antes (D0) e após a imunização (D21, D45, D60) dos animais suplementados (GT) ou não com MOS (GC)

do grupo teste (Figura 1).

Foi possível observar a produção de anticorpos por animais de ambos os grupos, mesmo sendo submetidos a exercícios de alta intensidade, o que sugere que o treinamento proposto não influenciou de maneira significativa na resposta imune adaptativa. Isso contraria observações relatadas em outros estudos nos quais se observa que o exercício de alta intensidade, com uma duração curta em seres humanos, causa uma imunossupressão transitória, com tendência a exacerbar conforme aumentam a intensidade e a duração do exercício (FERRY, et. al., 1990). Relata-se que a imunossupressão associada ao estresse é consequência do aumento na secreção do cortisol, resultado da ativação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal. O cortisol diminui a proliferação de linfócitos, interfere na comunicação entre eles, inibe a migração de granulócitos e inibe a produção de anticorpos entre outros efeitos (KENDAL, et. al., 1990; MACNEIL, et. al., 1991; NIEMAN, et. al., 1992; ALVES, et. al., 2007).

Foi possível observar uma produção mais pronunciada de anticorpos nos animais suplementados com o aditivo prebiótico comparado ao grupo controle. Tal resultado está de acordo com o observado por Gouveia et al., (2006) onde observaram que a suplementação diária de cães com 2 g de MOS e 2 g de FOS, conjuntamente na dieta, apresentou os melhores resultados em relação à saúde dos cães, com aumento da

Foi possível observar a produção de anticorpos por animais de ambos os grupos, mesmo sendo submetidos a exercícios de alta intensidade, o que sugere que o treinamento proposto não influenciou de maneira significativa na resposta imune adaptativa. Isso contraria observações relatadas em outros estudos nos quais se observa que o exercício de alta intensidade, com uma duração curta em seres humanos, causa uma imunossupressão transitória, com tendência a exacerbar conforme aumentam a intensidade e a duração do exercício (FERRY, et. al., 1990). Relata-se que a imunossupressão associada ao estresse é consequência do aumento na secreção do cortisol, resultado da ativação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal. O cortisol diminui a proliferação de linfócitos, interfere na comunicação entre eles, inibe a migração de granulócitos e inibe a produção de anticorpos entre outros efeitos (KENDAL, et. al., 1990; MACNEIL, et. al., 1991; NIEMAN, et. al., 1992; ALVES, et. al., 2007).

Foi possível observar uma produção mais pronunciada de anticorpos nos animais suplementados com o aditivo prebiótico comparado ao grupo controle. Tal resultado está de acordo com o observado por Gouveia et al., (2006) onde observaram que a suplementação diária de cães com 2 g de MOS e 2 g de FOS, conjuntamente na dieta, apresentou os melhores resultados em relação à saúde dos cães, com aumento da resposta imune local, caracterizada por uma maior

produção de anticorpo.

Novos estudos serão realizados para avaliar a influência do suplemento em outros componentes da resposta imune, já que é sabido que os MOS são capazes de induzir a ativação de macrófagos, incrementando a resposta imunológica adquirida (MACARI, et. al., 2000).

## Conclusão

Conclui-se que a utilização do aditivo prebiótico MOS pode incrementar a resposta imune em equinos submetidos a exercício intenso.

aumento da resposta imune local, caracterizada por uma maior produção de anticorpo.

Novos estudos serão realizados para avaliar a influência do suplemento em outros componentes da resposta imune, já que é sabido que os MOS são capazes de induzir a ativação de macrófagos, incrementando a resposta imunológica adquirida (MACARI, et. al., 2000).

## Referências

1. ABQM. **Associação dos Criadores de Cavalo Quarto de Milha de Corrida**. Disponível em: <www.abqm.com.br>. Acesso em 18/02/2016.
2. ALVES, G.J., PALERMO, N. J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29 n. 4 p. 363-369, 2007.
3. CNA. **Estudo do complexo agronegócio do cavalo**. 2010. Disponível em: [http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo\\_resumo.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo_resumo.pdf). Acesso em: 22 de fevereiro de 2016.
4. FERRY, A; PICARD, F; DUVALLET, A; WEILL, B; RIEU, M. Changes in blood leucocyte populations induced by acute maximal and chronic submaximal exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 6, p. 435-442, 1990.
5. FERRAZ, G. C. **Respostas endócrinas, metabólicas, cardíacas e hematológicas de equinos submetidos ao exercício intenso e à administração de cafeína, aminofilina e clenbuterol**. Dissertação. UNESP, Jaboticabal, 2006.
6. FOSS, M.L.; KETEVIAN, S.J. Fox: Bases fisiológicas do exercício e do esporte. 6.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000.
7. GARCIA, F. **Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. 2008. 100f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
8. GOUVEIA, E.M.F. et al. Uso de mannanoligossacarídeos fosforilados (Bio-MOS(R)) como adjuvante em doenças gastrointestinais em cães. **Revista Pet South América**, jan-fev, 2006.
9. KENDALL, A; HOFFMAN-GOETZ, L; HOUSTON, M; MACNEIL, B; ARUMUGAM, Y. Exercise and blood lymphocyte subset responses: intensity, duration and subject fitness effects. **Journal of Applied Physiology**, v. 69, n. 1, p. 251-260, 1990.
10. LANCE W.; U'REN; BILLER, B. J.; ELMSLIE, R. E.; THAMM, T. H.; DOW, S. W. Evaluation of a Novel Tumor Vaccine in Dogs with Hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 21:113-120, 2007.
11. MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO'2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000. **Anais...** Campinas: FACTA, v.2, p.161-174, 2000.
12. MACNEIL, B; HOFFMAN-GOETZ, L; KENDALL, A; HOUSTON, M; ARUMUGAM, Y. Lymphocyte proliferation responses after exercise in men: fitness, intensity and duration effects. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, n. 1, p. 179-185, 1991.
13. MARQUES, M.S. Influência do exercício físico sobre os níveis de lactato plasmático e cortisol sérico em cavalos de corrida. 70 f. **Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária)**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.
14. NIEMAN, D. C.; HENSON, D. A.; JOHNSON, R.; LEBECK DAVIS, J. M.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L.; Effects of brief, heavy exertion on circulating lymphocyte subpopulations and proliferative response. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 24, n. 12, p. 1339-1345, 1992.
15. ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Diagnosis Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.