



ESTRESSE OXIDATIVO E DANO MUSCULAR EM EQUINOS ATLETAS DE VAQUEJADA

Erik A. B. Guedes¹; Rayane C. M. Nascimento¹; Islany T. I. Cerqueira¹; Amylly S. Martins¹; Cláudio C. S. Freire²; Orlando R. P. Araujo¹; Fabiana A. Moura³; Pierre B. Escodro²; Marília O.F. Goulart¹

¹ Instituto de Química e Biotecnologia - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL.

² Centro de Ciências Agrárias- Universidade Federal de Alagoas, Campus Viçosa, Viçosa, AL.

³ Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL.

Palavras-Chave: Biomarcadores; Atividade física; Equinos Quarto de Milha.

Introdução

A presença de oxigênio é fundamental para o funcionamento celular, e durante o exercício, é comum a absorção de oxigênio pela respiração celular e mitocondrial. Contudo, em excesso pode provocar alterações nos parâmetros bioquímicos do organismo e desregular a homeostase, gerando um desequilíbrio redox e aumentando a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse estresse, em resposta ao desajuste no sistema redox, leva ao acúmulo dessas EROs e espécies radiculares como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO^{\bullet}) e radical hidroxila (HO^{\bullet}), que se tornam os principais responsáveis por interrupções na sinalização redox e danos às biomoléculas (KERKSICK & WILLOUGHBY, 2005; FERNANDES *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2022; MINAMI, 2011; SIES *et al.*, 2017).

Durante o exercício, há um aumento no fluxo de oxigênio para os músculos esqueléticos, essenciais para a produção de energia. Em exercícios extenuantes, a produção de EROs pode exceder a capacidade antioxidante do corpo, causando estresse oxidativo. Esse processo, chamado de eustress em níveis moderados, pode se tornar distress quando sob sobrecarga, levando a danos celulares e inflamação (KINNUNEN *et al.*, 2005).

Na vaquejada, esporte tradicionalmente praticado no Nordeste do Brasil, destaca-se a raça de cavalos Quarto de Milha, conhecida por sua capacidade de realizar largadas rápidas e alcançar altas velocidades em curtas distâncias. Essa raça é amplamente empregada em diversas modalidades além da vaquejada, como laço, rédeas e três tambores. Entretanto, essa atividade física intensa realizada nas competições aumentam significativamente os níveis de EROs nos equinos atletas, resultando em maior peroxidação lipídica das membranas celulares, danos às proteínas e ácidos nucleicos, além do incremento dos processos inflamatórios nos animais (LOPES, 2009; KINNUNEN *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2022).

Atualmente com o aumento da popularidade do esporte e alterações na legislação, ocorreram mudanças significativas na prática do esporte, resultando em melhorias nas condições das competições, principalmente no quesito bem-estar animal, exigindo melhora na performance dos animais que, frequentemente sofrem danos no sistema imunológico, inflamatório e redox relacionados ao exercício intenso e prolongado. É uma maneira eficaz de



avaliar o estresse oxidativo, defesa antioxidante e inflamação nesses atletas é através da mensuração dos biomarcadores séricos, podendo monitorar a saúde, manter os equinos em alto rendimento e performance, bem como prolongar sua vida atlética (LOPES, 2009; COELHO, 2011; LAMPRECHT & WILLIAMS, 2012).

Portanto, no presente trabalho, objetiva-se avaliar a presença de estresse oxidativo e dano muscular em equinos atletas de vaquejada e animais não atletas.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-UFAL sob protocolo nº 01/2024). Selecionaram-se 70 equinos Quarto de Milha, sendo 60 animais atletas (GA) e 10 não atletas formando o controle (GC). Para participar do estudo, os cavalos precisavam ter entre 4-8 anos, pesar 350-550 kg, serem saudáveis e avaliados na escala de bem-estar da UFAL. Animais com doença recente, uso de anti-inflamatórios, gestantes ou lactantes foram excluídos. Todos os tutores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O sangue foi coletado por contenção física, por venopunção da veia jugular, feita com Vacutainer® e agulhas 25x8. O sangue foi dividido em tubos com EDTA para análises de estresse oxidativo e inflamação, e tubo com gel separador para análises bioquímicas. As amostras foram armazenadas em caixa térmica e enviadas ao laboratório. O sangue com EDTA foi centrifugado a 4000 rpm, 4 °C, por 10 minutos e o plasma foi transferido para microtubos e armazenado a -80 °C para posterior análise. Os tubos com ativador de coágulo foram centrifugados a 4000 rpm, por cinco minutos e retirado o soro para a análise bioquímica (CK).

Os níveis de malondialdeído (MDA) foram medidos por HPLC com detecção UV a 270 nm, usando coluna C18 e fase móvel de acetonitrila e tampão Trizma (pH 7,4) (1:9) conforme Tatum et al. (1990). As amostras, preparadas com plasma, tampão Trizma, BHT e acetonitrila, foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 min a 4 °C, filtradas (0,22 µm) e 20 µL injetadas no HPLC.

A concentração de H₂O₂ foi determinada por método colorimétrico adaptado de Pick e Keisari (1980), baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂, mediada pela peroxidase de rabanete, com leitura a 610 nm e resultados expressos em nmol/mL.

A mensuração da creatinaquinase (CK) foi feita por testes bioquímicos automatizados, usando ensaios colorimétricos pelo método cinético (MAIA et al., 2020). Os resultados, em unidades por litro (U/L), são essenciais para avaliar o dano muscular no contexto clínico .

Para Catalase, as análises do desequilíbrio redox foram realizadas por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde foi determinada pelo método adaptado de Aebi (1974) a $\lambda = 374$ nm, com resultados expressos em U de CAT/min.



A mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO) foi realizada por meio da adaptação do método proposto por Bradley *et al.* (1982), em um $\lambda = 460$ nm, marcador ligado diretamente à atividade inflamatória. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade de H_2O_2 (μmol) decomposta por min e expressos em U/ μL de plasma.

A comparação entre grupos foi feita pelo teste t para amostras independentes após análise de variância pelo teste de Levene (dados com distribuição normal) ou teste Mann-Whitney (distribuição não normal pelo teste de Shapiro-Wilk). A significância foi assumida quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Neste estudo, verificou-se as médias de MDA no grupo atleta (GA) e controle (GC) foram $2,95 \pm 1,60 \mu\text{g}/\mu\text{L} \cdot 10^{-3}$ e $0,18 \pm 0,21 \mu\text{g}/\mu\text{L} \cdot 10^{-3}$, respectivamente, como mostra a Tabela 1. Observou-se aumento significativo de MDA ($p = 0,000$) no sangue do GA em comparação ao GC. Esses valores foram menores que os $1,17 (0,76-2,66) \mu\text{mol/L}$ encontrados por Fernandes *et al.* (2012) em cavalos de trote, possivelmente devido a diferenças amostrais e características específicas dos cavalos Quarto de Milha e do esporte. Os resultados sugerem que os atletas têm maior desbalanço redox, com redução dos mecanismos antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos marcadores de estresse oxidativo/inflamação e lesão muscular em equinos da raça quarto de milha atletas de vaquejada e não atletas.

	Grupo Atleta		Grupo Controle		p
	Média	DP	Média	DP	
CAT (UCAT/min)	10	2,2	15,3	6,2	0,026
MPO (UMPO/mL)	10,3	2,5	16,2	1,8	<0,001
MDA ($\mu\text{g}/\mu\text{L} \times 10^{-3}$)	2,95	1,6	0,18	0,21	<0,001
H202 ($\eta\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mL}$)	57,4	31,1	63	36,4	0,656
CK (U/L)	285	190	126	86	0,003

Legenda: CK: creatina quinase; MDA: malonaldeído; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; CAT: catalase; MPO: mieloperoxidase. * teste de Mann-Whitney.

Comparando esses achados com os dados de Yamazaki *et al.* (2015), que relataram níveis de CK, observadas na tabela 1, de $231 \pm 74,0$ U/L em cavalos em repouso, e valores de $290 \pm 83,0$ U/L imediatamente após a corrida, observa-se que os níveis de CK no GA 285 ± 190 U/L, comparados com valores de 126 ± 86 do GC ($p = 0,003$), onde estão dentro da faixa esperada para situações de estresse físico elevado. Além disso, Yamazaki *et al.* (2015) documentou que os níveis de CK aumentaram ainda mais uma hora após a corrida, atingindo $306 \pm 71,0$ U/L, e continuaram a subir até 385 ± 142 U/L três horas após o exercício, antes de



retornar a $228 \pm 77,0$ U/L após 24 horas. Esses dados sugerem que o dano muscular induzido pelo exercício é um processo dinâmico, com elevações transitórias nos níveis de CK que indicam estresse muscular seguido por uma recuperação gradual, também descritos por Tidball (2005) e Brancaccio *et al.*, (2010). Isso corrobora a observação de que, apesar do aumento inicial de CK, a integridade da membrana muscular tende a ser restaurada, sem evolução para necrose do tecido isquêmico. Dessa forma, os níveis de CK observados no GA são consistentes com um quadro de estresse muscular agudo, mas transitório, semelhante ao descrito na literatura.

O oxigênio singlete é um radicalar que proporciona a formação de dois elétrons desemparelhados, que será um dos causadores de danos infligidos pelos fagócitos aos seus alvos, e que também são produzidos por meio da reação entre o peróxido de hidrogênio e um halogênio oxidado descritos por Steinbeck *et al.*, (1992) e Bernard, (2000). Além disso, de acordo com Frenket e Chrzan (1987), os mecanismos de dano ao DNA induzidos por ERO's podem ser avaliados por meio da quantificação dos níveis de H_2O_2 , que atua como um mediador chave na sinalização celular. Dessa forma, o H_2O_2 não apenas contribui para o estresse oxidativo, mas também desempenha um papel fundamental na modulação de vias de sinalização, uma vez que Deaton *et al.* (2004) explicam que essa modulação pode levar à resposta ao dano no DNA e das vias aéreas, influenciando processos como reparo celular, apoptose e inflamação por meio da peroxidação lipídica (OLSZEWSKI & LABER, 1993; BROSSI, 2014).

Diante disso, os valores de peróxido de hidrogênio apresentados na Tabela 1, obtidos neste estudo, permitiram avaliar os níveis de inflamação associados ao estresse oxidativo em equinos. Os grupos GA e GC apresentaram, respectivamente, $57,4 \pm 31$ e $63,0 \pm 36,4$ U/L ($p = 0,656$). Esses resultados sugerem que, apesar das variações individuais, a exposição ao oxigênio pode desempenhar um papel significativo nos danos inflamatórios causados pelos fagócitos aos tecidos. Isso pode contribuir para uma inflamação mais pronunciada nas vias aéreas, conforme descrito na literatura (FRENKET & CHRZAN, 1987; BERNARD, 2000; DEATON *et al.*, 2004). Assim, apesar das pesquisas sobre H_2O_2 forneçam informações valiosas sobre o quadro inflamatório e os danos celulares associados ao estresse oxidativo, sua mensuração ainda não é amplamente padronizada, e há uma falta de consenso nas metodologias utilizadas. As investigações sobre o assunto são limitadas, e os métodos de avaliação variam consideravelmente entre os estudos.

Em relação à catalase (CAT), observou-se que os equinos atletas apresentaram uma média/mediana de 10,0 UCAT/min com DP/IIQ de 2,2, enquanto o grupo controle apresentou uma média/mediana de 15,3 UCAT/min com DP/IIQ de 6,2, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p = 0,026$). Isso sugere que os equinos atletas, submetidos a maior estresse oxidativo, possuem uma capacidade antioxidante reduzida, possivelmente devido ao consumo excessivo de catalase para neutralizar as espécies reativas de oxigênio geradas durante a atividade física intensa (OTT *et al.*, 2022).

Quanto à mieloperoxidase (MPO), a média/mediana foi de 10,3 UMPO.mL no grupo atleta, com DP/IIQ de 2,5, enquanto no grupo controle foi de 16,2 UMPO.mL com DP/IIQ de

1,8, com uma diferença altamente significativa ($p = 0,000$). A redução na atividade de MPO nos atletas pode indicar uma adaptação ao estresse oxidativo, modulando a resposta inflamatória para evitar danos excessivos aos tecidos durante o exercício (BALOGH *et al.*, 2001).

A creatina quinase (CK) apresentou valores de 285 U/L no grupo atleta, com DP/IIQ de 190, e de 126 U/L no grupo controle, com DP/IIQ de 86, também com diferença significativa ($p = 0,003$). Esse aumento nos níveis de CK nos atletas sugere maior dano muscular, comum em atividades físicas intensas como a vaquejada, onde microlesões musculares são frequentes.

Tabela 2: Correlações entre marcadores de estresse oxidativo/inflamação de equinos de vaquejada.

	CK (U/L)	
MDA ug/uL x 10 ⁻³	r	0,209
	p	0,083
H ₂ O ₂ (ηM H ₂ O ₂ /mL)	r	-0,048
	p	0,691
CAT (UCAT/min)	r	-0,124
	p	0,307
MPO (UMPO/mL)	r	-0,014
	p	0,91

Legenda: CK: creatina quinase; MDA: malonaldeído; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; CAT: catalase; MPO: mieloperoxidase.

A correlação positiva na Tabela 2 indica uma tendência em que níveis mais altos de CK se associam a níveis elevados de MDA. Segundo Marañón *et al.* (2008) e Rodrigues (2013), isso pode ocorrer devido ao aumento da liberação de MDA causada por lesões na membrana celular. No entanto, essa relação é muito fraca e não significativa, sugerindo uma conexão mínima e inconsistente. Fatores como variabilidade individual ou a natureza da relação entre esses marcadores podem explicar essa inconsistência, indicando a necessidade de parâmetros mais adequados para validação (MOURA *et al.*, 2007; SPÍNDOLA, 2017).

Os valores de peróxido de hidrogênio e CK na tabela 2 indicam uma correlação negativa muito fraca, sugerindo que níveis mais altos de CK podem estar relacionados a níveis mais baixos de H₂O₂, porém, essa relação não é estatisticamente significativa. Spindola (2017) também encontrou uma correlação negativa fraca entre a enzima no soro e na saliva. Esses achados sugerem que a atividade inflamatória pode elevar proteínas de fase aguda e que a peroxidação lipídica se relaciona com a lesão hepática. Entretanto, as correlações fracas não



permitem estabelecer uma relação causal clara. Mcmeniman e Hintz (1992) também observaram uma correlação negativa entre níveis de vitamina E e lipoperoxidação, destacando a prevenção do estresse oxidativo.

Portanto, este estudo demonstrou que uma maior atividade inflamatória está associada a um aumento na produção de proteínas plasmáticas de fase aguda positiva em resposta ao processo inflamatório, e que a elevação da peroxidação lipídica é proporcional ao grau de lesão nas células hepáticas. Além disso, os resultados reforçam a complexidade das interações entre estresse oxidativo, inflamação e biomarcadores, destacando a necessidade de pesquisas adicionais para esclarecer essas relações de maneira mais aprofundada.

Conclusões

Os dados demonstram que os equinos atletas apresentam maiores sinais de estresse oxidativo e dano muscular em comparação ao grupo controle, evidenciando o impacto fisiológico das competições de vaquejada sobre a saúde dos equinos, especialmente no que se refere ao estresse oxidativo e inflamação.

Este estudo apresenta resultados inéditos que destacam a importância de considerar os potenciais efeitos a longo prazo do desequilíbrio redox em equinos atletas de vaquejada. O estresse oxidativo identificado nos cavalos, pode ser exacerbado por treinamentos intensivos e disputas frequentes, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e a uma resposta inflamatória mais intensa. Isso pode impactar diretamente o desempenho esportivo dos animais.

Dessa forma, torna-se essencial avaliar a dieta dos equinos, particularmente no que se refere à necessidade de antioxidantes, com o objetivo de mitigar o desequilíbrio redox e alcançar níveis plasmáticos mais próximos da normalidade entre as competições. Este estudo justifica a importância de investir em pesquisas voltadas para a terapia antioxidante, visando melhorar o desempenho, a saúde e prolongar a vida atlética desses animais.

Portanto, esta pesquisa proporcionou uma compreensão do nível de estresse ao qual os equinos de vaquejada estão submetidos e sugeriu a necessidade de estratégias preventivas e diagnósticas futuras para monitorar o desequilíbrio redox, auxiliando na otimização do desempenho e na preservação da saúde dos animais.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pelos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPEAL e UFAL. Os autores agradecem o apoio científico.



Referências

- AEBI, H. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, v. 2, p. 673-684, 1974.
- BALOGH, N.; GAÁL, T.; PETRI, A. Biochemical and antioxidant changes in horses during pentathlon. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 49, n. 4, p. 413-424, 2001.
- BERNARD M.B. Phagocytes and oxidative stress. *109(1)*, p. 0-44, 2000.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BRANCACCIO, P.; LIPPI, G.; MAFFULLI, N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin. Chem. Lab. Med.* v. 48, p. 757-767, 2010.
- BROSSI, P. M. Investigação laboratorial dos efeitos antioxidantes do plasma processado autólogo nas principais enfermidades articulares de equinos após tratamento artroscópico. p. 287 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2014.
- CARVALHO A.C. et al. Effects of ozone therapy on hematological, biochemical, and oxidative stress parameters of vaquejada athlete horses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.74, n.6, p.1024-1038, 2022.
- COELHO, C.S.; LOPES, P.F.R.; PISSINATI, G.L.; RAMALHO L.O.; DE SOUZA, V.R.C. Influência do exercício físico sobre sódio e potássio séricos em equinos da raça Quarto de Milha e mestiços submetidos à prova de laço em dupla. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 18, n. 1, p. 32-35, 2011.
- DEATON, C.M. et al. Breath Condensate Hydrogen Peroxide Correlates with Both Airway Cytology and Epithelial Lining Fluid Ascorbic Acid Concentration in the Horse. *Free Radical Research*, v. 38 n2, p. 201-208, 2004.
- FERNANDES W.R. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária. *Pesq. Vet. Bras.* v. 32, n. 7, p. 677-680, 2012.
- FRENKET, K.; CHRZAN, K. Hydrogen peroxide formation and DNA base modification by tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes. *Carcinogenesis*, v. 8(3), p. 455-460, 1987.
- KERKSICK C. & WILLOUGHBY D. The antioxidant role of glutathione and n-acetyl-cysteine supplements and exercise induced oxidative stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* v.2, n. 2, p. 38-44, 2005.
- KINNUNEN S, A. M.; HYYPPÄ S.; LEHMUSKERO A.; HÄNNINEN O.; OKSALA N. Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. *J Sports Sci Med.* v. 4, n. 4, p. 415-21, 2005.
- LAMPRECHT, E. D.; WILLIAMS, C. A. Biomarkers of antioxidant status, inflammation, and cartilage metabolism are affected by acute intense exercise but not superoxide dismutase supplementation in horses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- LOPES, K.R.F.; BATISTA, J.S.; DIAS, R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Influência das competições de vaquejada sobre os parâmetros indicadores de estresse em equinos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 2, p. 538-543, 2009.
- MAIA et al. Análise de creatina quinase, glicose e lactato em equinos mangalarga marchador pré e pós-exercício. *PUBVET.* v.14, n.5, a565, p.1-6, Mai., 2020.
- MARAÑÓN, G.; MUÑOZ-ESCASSI, B.; MANLEY, W.; GARCÍA, C.; CAYADO, P.; MUELA, M.S.; OLÁBARRI, B.; LEÓN, R.; VARA, E. The effect of methyl sulphonyl methane supplementation on biomarkers of oxidative stress in sport horses following jumping exercise. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.50, n.45, p.01-09, 2008.
- McMENIMAN, N. P.; HINTZ, H. F. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. *Journal of Animal Science*, v. 24, n. 6, p. 482-484, 1992.
- MINAMI Y. et al. Free radical formation after intensive exercise in thoroughbred skeletal muscles. *J. Equine Sci.* v. 22, n.2, p.21-28, 2011.
- MOURA, S.A.B.; MEDEIROS, A.M.C.; COSTA, F.R.H.; MORAES, P.H.; OLIVEIRA FILHO, S.A., Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura, *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v.7, n.2, p.187- 194, maio/ago. 2007.



OTT, E. A.; HOFFMAN, R. M.; WILLIAMS, C. A. The role of oxidative stress in athletic horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 109, 2022.

OLSZEWSKI, M. & LABER, G. Production of free oxygen radicals by phagocytes lavaged from respiratory tract as well as from peripheral blood of horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Wien Tierarztl Monatsschr*, v. 80, p. 332–337, 1993.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.

SIES H. BERNDT C. & JONES D.P. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* v. 86 p.715–48, 2017.

SOUSA, R.A. et al. Effect of vaquejada exercise on the physiological and biochemical profiles sporadic competitors and athletic horses. *Acta Vet. Bras.*, v.12, p.17-23, 2018

SPÍNDOLA, B.F. Biomarcadores de estresse oxidativo e do metabolismo muscular na saliva de equinos. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

STEINBECK, M.J.; KHAN, A.U.; KARNOVSKY, M.J.; HEGG G.G. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem.* V.267, p.13425–13433, 1992.

TATUM, V.L.; CHANGCHIT, C.; CHOW, C.K. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids*, v. 25, n. 4, p. 226-229, 1990.

TIDBALL J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v. 288, p. 345–353, 2005.

YAMAZAKI, M.; KUSANO, K.; ISHIBASHI, T.; KIUCHI, M; KOYAMA, K. Intravenous infusion of H₂-saline suppresses oxidative stress and elevates antioxidant potential in Thoroughbred horses after racing exercise. *Scientific reports*, v. 5, p. 15514, 2015.