

NUNO MIGUEL TORRES PILOTO DE ALBUQUERQUE

A utilização da rhEPO no *doping*

**– Estudo dos efeitos cardiovasculares e metabólicos em
ratos submetidos a exercício físico –**

Universidade de Coimbra

2009

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina Legal e Ciências Forenses**

**Orientador: Doutor Flávio Reis
Co-orientador: Doutora Helena Teixeira**

**Trabalho experimental realizado no
Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra**

Director: Prof. Doutor Frederico Teixeira

Agradecimentos

Ao Sr. Professor Doutor Frederico Teixeira quero manifestar a minha profunda gratidão, não só por ter tornado possível a realização deste trabalho de Mestrado mas também pela sábia orientação científica e pelo rigor dos conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor Flávio Reis quero transmitir um agradecimento muito especial, pela confiança depositada, pelos valiosos ensinamentos, pelo apoio inesgotável e pela relação de amizade fomentada.

À Doutora Helena Teixeira quero expressar o meu reconhecimento pela orientação e incentivo manifestados ao longo do trabalho.

À Doutora Edite Lemos, o meu muito obrigado, pelo exemplo, colaboração e dedicação que sempre evidenciou.

Aos Drs. Margarida Lourenço, Carlos Alberto Tavares e Carlos Ferrer-Antunes do Laboratório de Hematologia dos HUC, pela disponibilidade dispensada para os estudos hematológicos, o meu agradecimento.

À Professora Doutora Lina Carvalho e aos seus colaboradores do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina de Coimbra, em particular à Dra. Patrícia Couceiro, bem como à Dra. Fernanda Xavier da Cunha e sua colaboradora Dra. Paula Neto, do Serviço de Anatomia Patológica dos HUC, pela preciosa ajuda no processamento das amostras e interpretação dos resultados de histomorfologia, o meu reconhecimento.

Aos Professores Doutores Alice Santos Silva, Rui Alves, Petronila Rocha Pereira e Rui Pinto, o meu agradecimento pelo apoio dado para a concretização da parte experimental.

À minha colega Patrícia o meu reconhecido tributo pela amizade, colaboração e camaradagem. Um franco agradecimento, de igual modo, a todos os colegas e funcionários que no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental me acolheram de forma sempre simpática e familiar, colaborando ainda no solucionar das mais diversas situações.

A todos os que, com os seus gestos, uma palavra de incentivo e amizade, contribuíram de forma significativa para a consecução deste trabalho.

À minha família, uma menção particular, por serem o que de mais importante existe para mim.

Índice Geral

Lista de abreviaturas	15
Resumo	17
Abstract	23
Parte I – Revisão da literatura	27
Capítulo I – A ERITROPOIETINA (EPO)	29
1 – Biologia e caracterização físico-química	29
2 – Funções a nível fisiológico	30
3 – A eritropoietina recombinante humana (rhEPO)	31
Capítulo II – O EXERCÍCIO FÍSICO: FISIOLOGIA E PATOLOGIA	37
1 – O exercício físico e a performance cardiovascular	37
2 – Benefícios <i>versus</i> efeitos adversos: “o paradoxo do exercício físico”	40
3 – O exercício físico e o risco cardiovascular	42
3.1 – O exercício físico e a reactividade plaquetar	42
3.1.1 – O papel das plaquetas na fisiopatologia cardiovascular	42
3.1.2 – Influência do exercício físico na activação plaquetar	46
3.2 – Metabolismo do ferro no exercício físico	48
3.3 – O exercício físico e o perfil lipídico	51
3.3.1 – O perfil lipídico como indicador de risco cardiovascular	51
3.3.2 – Influência do exercício físico no metabolismo lipídico	52
3.4 – O exercício físico e o sistema nervoso simpático (SNS)	56
3.4.1 – O SNS e a fisiopatologia cardiovascular	56
3.4.2 – Influência do exercício físico no SNS	58

3.5 – O exercício físico e o sistema serotoninérgico periférico (SSP)	60
3.5.1 – O papel da serotonina na actividade cardiovascular	60
3.5.2 – Influência do exercício físico no SSP	63
3.6 – O exercício físico e a inflamação	65
3.7 – O exercício físico e o stresse oxidativo	67
3.7.1 – A formação de ROS e o risco cardiovascular	67
3.7.2 – Influência do exercício físico no stresse oxidativo	69
Capítulo III – A ERITROPOIETINA COMO <i>DOPING</i>	73
1 – O <i>doping</i> : resenha histórica e perspectivas actuais	73
2 – <i>Doping</i> : substâncias e métodos proibidos	75
3 – A utilização de EPO e substâncias afins no exercício aeróbio	78
4 – Efeitos adversos da utilização de EPO	82
Parte II – Objectivos	87
Parte III – Compartmento Experimental	93
Capítulo I – MATERIAL E MÉTODOS	95
1 – Animais e condições disponibilizadas	95
1.1 – Características dos animais	95
1.2 – Acondicionamento	95
1.3 – Protocolos experimentais	95
Estudo 1 – <i>Efeito da rhEPO no exercício crónico</i>	
Estudo 2 – <i>Efeito da rhEPO no exercício agudo: comparação de 2 tipos de exercício</i>	
Estudo 3 – <i>Varição da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada</i>	
2 – Monitorização de peso corporal e das pressões arteriais e frequência cardíaca	100
2.1 – Determinação do peso corporal	100
2.2 – Medição das pressões arteriais e da frequência cardíaca	100

3 – Colheita de sangue e recolha de órgãos	101
3.1 – Anestesia	101
3.2 – Colheita e preparação das amostras de sangue	101
3.3 – Recolha, pesagem e preparação de órgãos	103
3.4 – Homogeneização de tecidos	103
4 – Avaliação dos parâmetros hematológicos	104
5 – Avaliação dos parâmetros bioquímicos	104
6 – Avaliação do metabolismo do ferro	105
7 – Determinação da concentração sérica de EPO	105
8 – Doseamento de catecolaminas em circulação e em alguns tecidos periféricos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	106
8.1 – Recolha de sangue e preparação das amostras	106
8.2 – Recolha de órgãos	106
8.3 – Doseamento de catecolaminas (CAs)	107
A – Extração de catecolaminas (CAs)	
B – <i>Condições cromatográficas para o doseamento de catecolaminas</i>	
C – <i>Quantificação das catecolaminas presentes nas amostras</i>	
D – <i>Reagentes</i>	
9 – Doseamento de serotonina (5-HT) e de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no plasma e nas plaquetas	111
9.1 – Colheita de sangue e preparação das amostras	111
9.2 – Condições cromatográficas para doseamento de 5-HT e 5-HIAA	111
9.3 – Quantificação das concentrações de 5-HT e 5-HIAA das amostras	111
10 – Doseamento do conteúdo cerebral de CAs, de 5-HT e 5-HIAA	112
10.1 – Protocolo para obtenção de CAs, de 5-HT e 5-HIAA cerebrais	112
10.2 – Condições cromatográficas para doseamento de CAs, 5-HT e 5-HIAA ...	112
10.3 – Quantificação das concentrações de CAs, 5-HT e 5-HIAA das amostras	112
11 – Quantificação de marcadores de inflamação	113
11.1 – Fundamento geral do método ELISA em <i>sandwich</i>	113
11.2 – Proteína C reactiva de alta sensibilidade (<i>hs-PCR</i>)	113
11.3 – Interleucina 2 (IL-2) e interleucina 1 β (IL-1 β)	114

11.4 – Factor de necrose tumoral α (TNF- α)	114
11.5 – Factor de transformação de crescimento β (TGF- β)	114
12 – Avaliação do equilíbrio oxidativo	115
12.1 – Doseamento de TBARS (“ <i>Tiobarbituric Acid Reactive Substances</i> ”)	115
12.2 – Quantificação do estado antioxidante total (TAS) pelo método de FRAP (“ <i>Ferric reducing ability of plasma</i> ”)	116
12.3 – Medição da concentração de 3-nitrotirosina (3-NT)	117
13 – Estudo histomorfológico	117
13.1 – Obtenção das amostras	117
13.2 – Protocolo para processamento das amostras para histopatologia	118
13.3 – Obtenção das secções	119
13.4 – Técnicas histológicas	119
13.4.1 – Hematoxilina-Eosina (H&E)	119
13.4.2 – Método do Ácido Periódico de Schiff (PAS)	120
14 – Tratamento estatístico	121
Capítulo II – APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS	123
1 – Efeitos da rhEPO no exercício crónico (treino)	123
A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo EPO <i>versus</i> grupo controlo)	123
A.1 – Pressão arterial, frequência cardíaca e trofismo tecidual	123
A.2 – Parâmetros hematológicos e concentração sérica de EPO	125
A.3 – Metabolismo do ferro	126
A.4 – Bioquímica: função renal, hepática e perfil lipídico	127
A.5 – Sistema nervoso simpático	128
A.5.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas	128
A.5.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas	129
A.6 – Sistema serotoninérgico	131
A.6.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA	131
A.6.2 – Conteúdo de 5-HT e 5-HIAA no cérebro	132

A.7 – Marcadores inflamatórios e de proliferação celular	132
A.8 – Equilíbrio oxidativo	133
A.8.1 – Concentração sérica de 3-nitrotirosina	133
A.8.2 – MDA e TAS em soro e músculo	134
B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crônico (natação) ...	136
B.1 – Variação do peso corporal ao longo do tempo	136
B.2 – Pressão arterial, frequência cardíaca e trofismo tecidual	137
B.3 – Parâmetros hematológicos	139
B.4 – Concentração sérica de EPO	141
B.5 – Metabolismo do ferro	141
B.6 – Bioquímica	142
B.7 – Sistema nervoso simpático	143
B.7.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas	143
B.7.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas	145
B.8 – Sistema serotoninérgico	146
B.8.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA	146
B.8.2 – Conteúdos de 5-HT e de 5-HIAA no cérebro	148
B.9 – Marcadores de inflamação e de proliferação celular	148
B.10 – Equilíbrio oxidativo	150
B.10.1 – Peroxidação lipídica (formação de MDA) no soro e no músculo ..	150
B.10.2 – Concentração sérica de 3-nitrotirosina	151
B.10.3 – Capacidade antioxidante total (TAS) em soro e músculo	151
B.10.4 – Relação MDA/TAS no soro e músculo	152
B.11 – O caso do rato que sucumbiu em pleno esforço físico durante a sessão de treino	154
B.11.1 – Histomorfologia do tecido renal	154
B.11.2 – Histomorfologia do tecido pulmonar	155
B.11.3 – Histomorfologia do tecido cardíaco	156
B.11.4 – Histomorfologia do tecido cerebral	157
B.11.5 – Histomorfologia do tecido hepático	157

2 – Efeitos da rhEPO em diferentes formas de exercício agudo (natação <i>versus</i> corrida)	159
.....	
1 – Duração dos exercícios por grupos	159
2 – Hemograma	159
3 – Concentração sérica de EPO	162
4 – Metabolismo do ferro	163
5 – Bioquímica	165
6 – Sistema nervoso simpático	166
6.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas	166
6.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas	167
7 – Sistema serotoninérgico	169
7.1 – Conteúdo plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA	169
7.2 – Conteúdo de 5-HT e de 5-HIAA no cérebro	170
8 – Equilíbrio oxidativo	171
3 – Efeitos da rhEPO no exercício (natação) crónico <i>versus</i> agudo	175
.....	
1 – Hemograma	175
2 – Concentração sérica de EPO	178
3 – Metabolismo do ferro	179
4 – Bioquímica	181
5 – Sistema nervoso simpático	182
5.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas	182
5.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas	183
6 – Sistema serotoninérgico	185
6.1 – Conteúdo plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA	185
6.2 – Conteúdo de 5-HT e de 5-HIAA no cérebro	186
7 – Equilíbrio oxidativo	187

4 – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada	191
1 – Variação da concentração sérica de EPO	191
2 – Variação do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e % de reticulócitos	192
3 – Variação das concentrações de ferro, ferritina e transferrina	194
Capítulo III – DISCUSSÃO	197
Estudo 1 – Efeitos da rhEPO no exercício crônico	
A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo Epo versus grupo controlo)	
B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crônico (natação)	
Estudo 2 – Efeitos da rhEPO no exercício agudo: comparação de 2 tipos de exercício	
Estudo 3 – Efeitos da rhEPO no exercício (natação) crônico versus agudo	
Estudo 4 – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada	
Advertências a reter para a prática desportiva humana	
Capítulo IV – CONCLUSÕES	229
PARTE IV – Referências Bibliográficas	231

Lista de abreviaturas

- 3-NT** – 3-Nitrotirosina
- 5-HIAA** – Ácido 5-hidroxiindolacético
- 5-HT** – 5-hidroxitriptamina (serotonina)
- AD** – Adrenalina
- ADP** – 5'-difosfato de adenosina (“*Adenosine Diphosphate*”)
- BHT** – Butil-hidroxitolueno
- CAs** – Catecolaminas
- COMT** – Catecol-*O*-metil transferase
- Ctrl** – Controlo
- CVE** – Coeficiente de variação eritrocitária
- CVP** – Coeficiente de variação plaquetar
- CHCM** – Concentração de hemoglobina corpuscular média
- CK** – Creatina cinase (“*Creatine Kinase*”)
- DA** – Dopamina
- DHBA** – Dihidroxibenzilamina
- EPO** – Eritropoietina
- FC** – Frequência cardíaca
- FEMT** – Feniletanolamina N-metiltransferase
- GVs** – Glóbulos vermelhos
- Hb** – Hemoglobina
- HCM** – Hemoglobina corpuscular média
- HDL-c** – Lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol (“*High density lipoprotein*”)
- HPLC** – Cromatografia líquida de alta resolução (“*High Performance Liquid Chromatography*”)
- HTC** – Hematócrito
- IL-1 β** – Interleucina 1 β
- IL-2** – Interleucina 2
- LDL-c** – Lipoproteína de baixa densidade ligada ao colesterol (“*Low density lipoprotein*”)

- Lp(a)** – Lipoproteína (a)
MAO – Monoaminoxidase
MDA – Malonaldeído bis(dimetilacetal)
NA – Noradrenalina
PA – Pressão arterial
PAD – Pressão arterial diastólica
PAM – Pressão arterial média
PAS – Pressão arterial sistólica
PC – Peso corporal
PCR – Proteína C reactiva
PCT – Plaquetócrito
PLT – Plaquetas
PPP – Plasma pobre em plaquetas
PRP – Plasma rico em plaquetas
RET (%)– Percentagem de reticulócitos
rhEPO – Eritropoietina recombinante humana (*“recombinant human Erythropoietin”*)
ROS – Espécies reactivas de oxigénio (*“Reactive Oxygen Species”*)
SNS – Sistema nervoso simpático
SRs – Suprarrenais
SSP – Sistema serotoninérgico periférico
TAS – Capacidade antioxidante total (*“Total Antioxidant Status”*)
TBA – Ácido tiobarbitúrico (*“Thiobarbituric acid”*)
TGs – Triglicéridos
TGF- β – Factor de transformação de crescimento β (*“Transforming Growth Factor”*)
TGO – Transaminase Glutâmico-Oxaloacética
TGP – Transaminase Glutâmico-Pirúvica
Total-c – Colesterol total
TNF- α – Factor de necrose tumoral α (*“Tumor Necrosis Factor”*)
VCM – Volume corpuscular médio
VPM – Volume plaquetar médio

Resumo/Abstract

Resumo

A tenebrosa sombra do *doping* tem pairado e obscurecido, através da constante suspeição, o mundo do desporto, seus resultados e proezas.

A eritropoietina (EPO), uma hormona natural produzida principalmente a nível renal, estimula (regula) a produção de eritrócitos que, pela cooperação da hemoglobina, transportam o oxigénio para os tecidos periféricos. Aumentar a entrega de oxigénio aos músculos é importante para otimizar a actividade muscular e melhorar a *performance* atlética, particularmente em modalidades de *endurance*, nas quais a componente aeróbia predomina. Segundo uma estimativa de 2002, o *doping* com rhEPO estava a ser praticado por 3-7% dos melhores atletas de *endurance* (Wilber, 2002).

Um dos principais riscos do uso abusivo de rhEPO prende-se com o possível aumento da pressão arterial, o que, conjuntamente com a policitemia (aumento do número de glóbulos vermelhos) induzida, potencia a probabilidade de incidência de eventos cerebrovasculares ou de enfartes do miocárdio que se poderão correlacionar ao cada vez mais recorrente e consternante fenómeno de morte súbita com a prática desportiva.

Neste contexto, neste estudo, pretendeu-se avaliar os efeitos bioquímicos, a nível cardiovascular e metabólico, resultantes da administração de rhEPO, enquanto *doping* em ratos Wistar sujeitos a protocolo de treino crónico (natação) e aeróbio de intensidade moderada. Para tal, idealizou-se um protocolo experimental com os seguintes grupos em estudo: grupo Controlo (Ctrl); grupo tratado com rhEPO (EPO); grupo exercício (Ex) e grupo exercício com administração concomitante de rhEPO (Ex+EPO). Foi estipulado um período experimental de 10 semanas, que se seguiu a um intervalo prévio de 3 semanas para adaptação à actividade física.

No decorrer do trabalho, alargaram-se horizontes e estabeleceram-se novos protocolos. Assim, os objectivos específicos deste projecto foram os seguintes:

1º Estudo – Avaliar os efeitos da rhEPO no exercício crónico (treino)

A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo EPO *versus* grupo controlo)

B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crónico (natação)

Para isso, consideraram-se os seguintes parâmetros: i - peso corporal; ii - pressão arterial, frequência cardíaca e trofismo tecidual; iii - parâmetros hematológicos: eritrocitários, plaquetares, reticulocitários e leucocitários; iv - concentração sérica de EPO; v - metabolismo do ferro, através das concentrações séricas de ferro, ferritina e transferrina; vi - parâmetros bioquímicos: glicemia, função renal e hepática, creatina cinase (CK) e perfil lipídico; vii - actividade do sistema nervoso simpático (SNS): através da concentração de catecolaminas em circulação (plasmáticas e plaquetares) e em tecidos periféricos (suprarrenais, rim, aorta, ventrículo esquerdo) e no cérebro; viii - actividade do sistema serotoninérgico: via concentração de 5-HT e 5-HIAA em circulação (plasmáticas e plaquetares) e no tecido neuronal; ix - marcadores de inflamação: pelas concentrações séricas de PCR, IL-2, IL-1 β , TNF- α e TGF- β ; x - indicadores do equilíbrio oxidativo: peroxidação lipídica (formação de MDA) no soro e no músculo, concentração sérica de 3-nitrotirosina (3-NT), capacidade antioxidante total (TAS) em soro e músculo, relação MDA/TAS; xi - estudo histomorfológico de tecidos.

2º Estudo – Efeitos da rhEPO em diferentes formas de exercício agudo (natação *versus* corrida): através da análise dos parâmetros anteriormente mencionados, acrescentando-se os dados relativos à duração da sessão extenuante.

3º Estudo – Efeitos da rhEPO no exercício (natação), crónico *versus* agudo: através dos grupos Ex e EPO+Ex da natação, dos estudos anteriores, elaborou-se este estudo comparativo crónico *versus* agudo.

4º Estudo – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada: através do qual foram avaliados os efeitos da administração de rhEPO sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos, concentração de EPO e metabolismo do ferro.

A administração de rhEPO, por si só, por um período de 10 semanas, na dose de 50 UI/kg/semana, promoveu aumento da pressão arterial, frequência e massa cardíaca, originou hiperlipidemia (sobretudo de LDL-c e TGs), provocou aumento do conteúdo plaquetar e neuronal de 5-HT, desencadeou, ainda, elevação dos marcadores inflamatórios (TNF- α e TGF- β), conferindo aumento do stresse oxidativo muscular, mas protecção antioxidante em circulação (aumento de TAS e redução de 3-NT).

Os ratos submetidos a exercício físico continuado e tratamento com rhEPO (durante 10 semanas) obtiveram um aumento da concentração de GVs, da hemoglobina e do hematócrito, o que sugere um aumento da viscosidade sanguínea, acompanhado por hipertensão arterial, hiperactivação simpática e serotoninérgica, stresse oxidativo (sobretudo muscular) e inflamação, firmando um risco cardiovascular acrescido. A morte de um rato no grupo Ex+EPO (provavelmente devido a uma ocorrência cardíaca em função das modificações funcionais/estruturais verificadas), num universo de oito animais administrados com rhEPO (50 UI/kg/sem), estabelece uma probabilidade superior a 10%, o que constitui um sinal expressivo sobre os perigos de vida associados à prática de *doping* continuado com rhEPO em atletas.

A prova aguda desencadeou efeitos distintos consoante a modalidade: a corrida proporcionou, essencialmente, reduções benéficas do perfil lipídico (Total-c e LDL-c) e aumentos danosos dos marcadores pró-oxidantes, enquanto a natação favoreceu maior activação do SNS. A administração prévia de rhEPO (durante 3 semanas) resultou em: no exercício físico agudo, maior resistência física, hiperglicemia, melhoria do perfil lipídico e protecção ampliada contra o stresse oxidativo. Na natação, em particular, a rhEPO exacerbou a activação do sistema nervoso simpático e serotoninérgico.

A comparação entre o treino crónico e o exercício agudo, nos grupos administrados com rhEPO, permitiu demonstrar um efeito muito mais nefasto em ratos submetidos a exercício crónico. Com efeito, verificou-se um aumento da concentração de GVs, da hemoglobina e do hematócrito, sugerindo um aumento da viscosidade sanguínea que, conjuntamente com o desenvolvimento de hipertensão arterial, hiperactivação simpática e serotoninérgica, stresse oxidativo e inflamação, enfatizou o risco cardiovascular. Por outro lado, o efeito da rhEPO no exercício agudo manifestou-se, principalmente, por propiciar activação plaquetar, aumento da glicemia e enérgica activação serotoninérgica, sem fornecer modificações de relevo ao nível do SNS e inflamação, fomentando mesmo uma melhoria do perfil oxidativo.

Conclui-se que os atletas em treino regular e *doping* concomitante com rhEPO se encontram altamente sujeitos às complicações cardiometabólicas resultantes da utilização ilegal desta substância e apresentam um elevado risco de sofrer episódios do foro cardio/cerebrovascular.

Abstract

The terrible shadow of doping has been storming and darkening, through the constant suspicion, the world of the sport, its accomplishments and remarkable achievements.

Erythropoietin, a natural hormone produced mainly in the kidneys, stimulates (and regulates) the production of red blood cells, which, in association with hemoglobin, carry the oxygen to the peripheral tissues. Increasing the delivery of oxygen to muscles is important to optimize the muscular activity and improve the athletic performance, especially in endurance sports, in which the aerobic component is essential. According to an estimation of 2002, rhEPO doping was being used by 3-7% of the best athletes of endurance sports (Wilber, 2002).

One of the main risks of abusive use of rhEPO gathers with the possible increase of the arterial pressure, which, together with the polycythemia (more red blood cells), potentate the probability of the incidence of cerebrovascular events or myocardial infarctions, that might be connected to the more common and outrageous phenomenon of sudden death in sport practice.

In this context, we pretended, in this study, to evaluate the biochemical effects of rhEPO treatment at cardiovascular and metabolic level, as doping in Wistar rats under a chronic and aerobic training protocol (swimming) of moderate intensity. To do so, we have idealized an experimental protocol with the following study groups: Control group (Ctrl); rhEPO supplanted group (EPO); exercise group (Ex) and exercise with co-administration of rhEPO (Ex+EPO). It has been stipulated an experimental period of 10 weeks, after a prior interval of adaptation to the physical activity of 3 weeks.

In the course of the study, we have opened horizons and established new protocols. Therefore, the specific objectives of this project were:

- 1° Study – Evaluate the effects of rhEPO in chronic exercise (training)
 - A – Effects of rhEPO by itself (EPO group versus control group)
 - B – Effects of rhEPO in rats under aerobic and chronic training (swimming)

To fulfill that desire, we have consider the follow parameters: i - body weight; ii - arterial pressure, heart rate and tissue trophy; iii - hematological parameters: from erythrocytes, platelets, reticulocytes and leucocytes; iv - serum EPO concentration; v - iron metabolism, through the serum concentrations of iron, ferritin and transferrin; vi - biochemical parameters: glycaemia, renal and hepatic function, creatinine kinase concentration and lipid profile; vii - sympathetic nervous system (SNS) activity: by the concentration of catecholamines in circulation (in plasma and in platelets) and in peripheral tissue (adrenals, kidney, aorta and left ventricle) and brain; viii - serotonergic system activity: via concentration of 5-HT and 5-HIAA in circulation (in plasma and in platelets) and in the neuronal tissue; ix- inflammation markers: serum concentrations of PCR, IL-2, IL-1 β , TNF- α and TGF- β ; x - oxidative equilibrium indicators: lipid peroxidation (MDA formation) in serum and muscle, serum 3-nitrotyrosine (3-NT) concentration, total antioxidant status (TAS) in serum and muscle and MDA/TAS relationship; xi - histomorphological study of some tissues.

2° Study – Effects of rhEPO in different forms of acute exercise (swimming versus running): through the analysis of almost all the above mentioned parameters, along with the information about the duration of the strenuous session.

3° Study – Effects of rhEPO in exercise (swimming), chronic versus acute: using the Ex and EPO+Ex groups of swimming above referred, we have designed comparative study between chronic and acute exercises.

4° Study – EPO serum concentration and haemogram variations along the timeline and depending of the rhEPO dosage: evaluation of the effects of the subcutaneous application of rhEPO in hematological and biochemical parameters, in EPO serum concentration and iron metabolism.

The use of rhEPO, *per se*, for a 10 week period, in a 50 UI/kg/week dosage, has promoted an increase in blood pressure, heart rate and mass, originated hyperlipidaemia (mainly LDL-c and TGs), elevation of platelet and neuronal 5-HT content, developed, yet, elevation of inflammatory markers (TNF- α e TGF- β), increment in muscular oxidative stress, but antioxidant protection in circulation (raise in TAS and reduction in 3-NT).

The rats under continued physical exercise and rhEPO treatment (for 10 weeks) have obtained an increase in the RBCs concentration, hemoglobin and haematocrit, that suggests a rise in blood viscosity, accompanied by arterial hypertension, sympathetic and serotonergic hyperactivation, oxidative stress (mostly muscular) and inflammation, consubstantiating a higher cardiovascular risk. The death of a rat belonging to the Ex+EPO group (most likely to a cardiac episode as we can forecast by the functional/structural modifications), in a eight animals universe administered with rhEPO (50 UI/kg/week), sets a probability superior than 10%, that represents a meaningful alert about the life dangers with the practice of continuous rhEPO doping in athletes.

The acute session handled different effects according to the modality: the running practice launched, essentially, beneficial reductions of lipid profile (Total-c and LDL-c) and harmful increases of pro-oxidants markers, while swimming favored superior SNS activation. Prior administration of rhEPO (during 3 weeks) promoted: in acute physical exercise, higher physical resistance, hyperglycaemia, improvement of lipid profile and enlarged protection against oxidative stress. In swimming, activation of sympathetic and serotonergic systems was increased.

The comparison between chronic training and acute exercise, in the groups under rhEPO treatment, allowed the perception of a much worsen effect in the rats under continued physical exercise (chronic training). Therefore, there was an increase in RBCs concentration, hemoglobin and haematocrit, suggesting a rise in blood viscosity which, alongside with the development of arterial hypertension, sympathetic and serotonergic hyperactivation, oxidative stress and inflammation, emphasizes the injurious cardiovascular risk. In contrast, the effect of rhEPO in the acute exercise privileged, mainly, platelet activation, increased glycaemia and strong serotonergic activation, without relevant changes in SNS and inflammation, even inducing a healthier oxidative profile.

In conclusion, athletes under regular training and rhEPO doping are highly exposed to the cardiometabolic complications underlying the illegal use of this substance and present an elevated risk for a cardio/cerebrovascular event.

Parte I – *Revisão da literatura*

Capítulo I – A ERITROPOIETINA (EPO)

1 – Biologia e caracterização físico-química

A eritropoietina (EPO) é uma hormona endógena de natureza glicoproteica, com peso molecular de 30,4 kDa, sendo sintetizada principalmente em células epiteliais específicas que revestem os capilares peritubulares renais (Adamson, 1996). Os rins apresentam, assim, função preponderante na sua síntese, visto serem responsáveis pela secreção de cerca de 90% de toda a EPO em circulação, pertencendo ao fígado a contribuição para os 10% remanescentes da produção total de EPO (Ekblom, 2002).

Inicialmente, é produzida como uma pré-hormona, possuindo uma sequência total de 193 aminoácidos, sendo os 27 primeiros expressos apenas para proporcionar o reconhecimento e a posterior secreção da hormona, não contendo relevância na actividade biológica (River e col., 2003). Ao entrar na circulação sanguínea, há também a perda do aminoácido arginina na posição carboxiterminal, passando então a possuir 165 aminoácidos alinhados em uma única cadeia polipeptídica, dispondo duas ligações dissulfeto intramoleculares e quatro cadeias polissacarídicas independentes, ligadas a resíduos de aminoácidos específicos. As cadeias polissacarídicas constituem cerca de 40% da massa molecular da EPO, sendo de grande importância na função hormonal. De modo a evitar a rápida depuração hepática da EPO antes que esta alcance o seu alvo fisiológico, a macromolécula possui um sinalizador biológico, formado por resíduos terminais de ácido siálico, situado em posições estratégicas na cadeia polissacarídica (Choi e col., 1996). Estima-se que a semi-vida da EPO, após lançamento na circulação sanguínea, seja da ordem de seis a oito horas (Adamson, 1996).

2 – Funções a nível fisiológico

A EPO é a principal reguladora da eritropoiese, ou seja, do processo onde ocorre estimulação dos precursores das células eritróides, promovendo proliferação e ulterior diferenciação em glóbulos vermelhos.

A produção de EPO pelas células específicas renais e seu subsequente lançamento no sangue advém da percepção, por estruturas celulares renais sensitivas, da redução da taxa de oxigénio circulante ou pela deficiência na produção eritrocitária (Alberts e col., 1994).

As moléculas de EPO em circulação são conduzidas até à medula óssea, onde se encontram células progenitoras eritrocitárias. Constatase que o aumento da taxa de novos eritrócitos ocorre cerca de um ou dois dias após o aumento dos níveis de EPO no plasma (Oliveira, 2000). Devido ao curto espaço de tempo entre o pico de EPO no plasma e o aumento da concentração de novos eritrócitos, conclui-se que ela actua em células precursoras próximas dos eritrócitos completamente desenvolvidos, e não em células mais primitivas na génese eritrocitária. Essas células precursoras são denominadas de células formadoras de colónia de eritrócitos (CFC-E) e apresentam a particularidade de só responderem à EPO. Possuem também receptores específicos, pertencentes a uma grande família de receptores para factores de crescimento hematopoiéticos, conseguindo responder a baixíssimas concentrações desta hormona, da ordem de 10^{-12} mol/l (Alberts e col., 1994).

A ligação da EPO ao seu receptor provoca uma dimerização na superfície extracelular do mesmo, desencadeando uma autofosforilação e activação intracelular de proteínas cinases (Constantinescu e col., 1999). O estímulo hormonal mantém-se até que o nível de oxigénio reverta da situação de hipóxia e volte a valores normais.

As CFC-Es, activadas pela EPO, geram eritrócitos maduros após seis ciclos de divisões celulares. Nesse estadio, as CFC-Es não contêm hemoglobina, metaloproteína responsável pelo transporte de oxigénio e maior constituinte, em volume, do eritrócito final. As CFC-Es produzidas dependem unicamente da EPO para sobreviver e proliferar. Estudos *in vitro* demonstraram que a remoção de EPO numa cultura de CFC-

Es acarreta rápido processo de morte celular programada, acção também designada de apoptose (Dine e col., 2001).

Os eritrócitos produzidos durante a eritropoiese não possuem material genético e maquinaria celular para a sua replicação, pois tanto o núcleo como os organelos citoplasmáticos importantes (retículo endoplasmático, mitocôndria e ribossomas) são removidos do compartimento intracelular, para permitir um maior armazenamento de hemoglobina. Portanto, o único modo de produção eritrocitária é através do estímulo hormonal nas células CFC-Es provenientes de células-tronco-pluripotentes hematopoiéticas (*stem cells*) (Alberts e col., 1994).

Encontra-se EPO e seus receptores em diferentes regiões do sistema nervoso central: córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, hipófise e medula espinhal. Sendo proposto um mecanismo neuroprotector, decorrente dos seguintes aspectos: redução da toxicidade do glutamato, aumento da produção de factores anti-apoptose, redução das lesões causadas por óxido nítrico, efeitos anti-inflamatórios, propriedades antioxidantes.

Para além disso, a sua presença no tecido vascular e cardíaco tem suscitado o seu interesse e envolvimento em fisiopatologia cardíaca. Mais concretamente, tem sido apontada como uma hormona protectora, designadamente por acção antioxidante, anti-inflamatória e anti-apoptótica.

3 – A Eritropoietina recombinante humana (rhEPO)

A produção de EPO em quantidades comercialmente viáveis e com elevado grau de pureza só se tornou possível graças às técnicas de engenharia genética.

O marco inicial foi a preparação altamente purificada da proteína a partir da urina de um doente com anemia aplásica no ano de 1977. Entretanto, a produção de EPO à escala industrial a partir da purificação da forma endógena humana, visando o uso terapêutico, mostrou-se inviável devido ao facto de, no organismo humano, essa hormona estar presente em baixíssimas concentrações.

Os passos que viabilizaram uma nova era na produção de EPO sintética consistiram no isolamento e caracterização da região do DNA humano que codifica a EPO endógena e a criação de uma cópia molde complementar a essa mesma região (cDNA). A incorporação deste cDNA em plasmídeos bacterianos que foram transferidos para uma bactéria *E. coli* hospedeira foi o passo final para a produção de EPO.

Desde então, clones de cDNA de EPO fisiológica foram isolados em diversos laboratórios para obter eritropoietina recombinante humana (rhEPO) em maior quantidade. A expressão de clones de cDNA de EPO também pode ser obtida por incorporação no material genético de células de mamífero isoladas, como as células ovárias de hamster chinês (CHO), ou de rim de filhote de hamster (BHK) (Choi e col., 1996). Esses tipos de células são os preferidos para a produção de rhEPO, pois a estrutura complexa da proteína contém ligações biologicamente essenciais do tipo dissulfeto e padrões de glicosilação que somente podem ser reproduzidos mediante a expressão em culturas de células de mamíferos. A rhEPO produzida deste modo é homogênea em relação à sequência peptídica da EPO natural mas, ainda assim, possui um arranjo heterogêneo na posição do hidrato de carbono. A rhEPO tornou-se o primeiro biomedicamento produzido a partir de células heterólogas de mamífero (Rendic, 1997).

Actualmente, a rhEPO vem sendo produzida por diversos fabricantes e, apesar da sua actividade biológica ser idêntica à da sua forma nativa, as estruturas químicas em duas e três dimensões das rhEPO manufacturadas nem sempre apresentam analogias completas, seja quando comparadas entre si ou quando confrontadas com a EPO de ocorrência natural. A síntese em diversas fontes e em diferentes regiões do mundo origina variações na composição e na disposição da estrutura polissacarídica. Estudos realizados demonstraram que, como ocorre com várias hormonas glicoproteicas a pH fisiológico, a sua estrutura apresenta heterogeneidade de carga isoeléctrica devido exactamente a pequenas variações no conteúdo polissacarídico. O desenvolvimento de um mercado negro para a rhEPO durante os últimos anos acentuou bastante essa discrepância, por conta da qualidade flutuante e variabilidade de composição de cada produto comercializado (River e col., 2003).

Evidências experimentais apontam que a eritropoietina apresenta uma constância de acção não somente sobre a população de células eritrocitárias do sangue, mas também sobre o músculo estriado esquelético e o músculo cardíaco, além de estimular a angiogénese. Exibe uma singular actividade sobre as células satélite da musculatura estriada, denotando uma potencialidade clínica no tratamento de distúrbios de distrofia. Em especial, o atleta de alto rendimento experimenta um duplo benefício, melhoria das condições hemodinâmicas locais da musculatura estriada, bem como, recuperação histológica mais rápida do tecido após esforços repetidos.

Constata-se, no uso da rhEPO, além do aumento na contagem total de glóbulos vermelhos, uma melhora na capacidade de trabalho. Ela exerce influência sobre a efectividade funcional de várias proteínas membranares, especulando-se sobre a sua provável ascendência no fluxo de iões de hidrogénio. Sugere-se que o influxo de lactato nos eritrócitos de atletas utilizando rhEPO esteja aumentado, ocasionando assim, uma diminuição da acumulação de lactato. Este efeito potencializa a capacidade de trabalho, uma vez que o ácido láctico produzido no decorrer do exercício físico será mais prontamente metabolizado, contribuindo desta forma para uma elevação do limiar de trabalho.

Inicialmente, o seu uso na prática clínica restringia-se a pacientes que necessitavam de sucessivas transfusões de sangue ou que apresentavam quadros de anemia por insuficiência renal crónica. Ultimamente também vem sendo utilizada em vários outros tipos de anemia, como a gerada nos estadios iniciais de neoplasias, ou a decorrente de terapia com AZT em pacientes HIV positivos, entre outras.

A dosagem usual de rhEPO no tratamento da anemia varia geralmente entre 20 a 240 UI/kg, três vezes por semana, dependendo da resposta do paciente e da taxa óptima pretendida de concentração plasmática de hemoglobina e hematócrito (River e col., 2003). Na prática clínica, as formas comuns de administração de rhEPO são as vias intravenosa, subcutânea e intraperitoneal. A escolha depende de considerações farmacocinéticas aliadas a aspectos de ordem prática. Em doentes submetidos a hemodiálise, a rhEPO pode ser administrada endovenosamente durante ou no final do procedimento, reduzindo o sofrimento do doente. Aos doentes em terapia conservadora para insuficiência renal, transplantados renais ou em diálise peritoneal, é recomendada a

utilização de rhEPO por via subcutânea, de modo a poupar as veias periféricas para futuro acesso vascular. A administração intraperitoneal deve ser reservada para situações clínicas especiais em doentes em diálise peritoneal, particularmente em crianças com traumas a injecções (Suassuna, 2000). A baixa disponibilidade por essa via exige doses semanais mais elevadas do que as restantes vias de administração. Verifica-se que a eritropoiese é mais eficaz em resposta a injecções frequentes com doses fraccionadas de rhEPO do que a aplicações intermitentes com grandes dosagens. No entanto, nenhuma das modalidades consegue reproduzir o padrão fisiológico de secreção ou o ritmo circadiano da hormona natural.

Após administração intravenosa, picos máximos de concentração de rhEPO no plasma são obtidos em questão de minutos, enquanto valores máximos para a administração subcutânea podem ser obtidos entre 5 a 24 horas após a aplicação (Goldberg, 1995). Estudos clínicos realizados em meados da década de 90, com o intuito de analisar e comparar as formas de administração intravenosa e subcutânea, não mostraram diferença de eficácia no tratamento ou na pressão sanguínea. A administração subcutânea possui uma biodisponibilidade baixa e variável, entre 20 a 40%. Porém, ainda assim, gera altos níveis séricos de rhEPO (Jansen e col., 1996).

Existem poucos estudos a respeito da farmacocinética dos produtos da eritropoietina em atletas. Em 2003, Varlet-Marie e colaboradores observaram que, em dosagens variando de 50 mg/kg (3x semana) até 100 mg/kg (3x semana), o comportamento do fármaco se mostrou linear e respeitou os parâmetros definidos com não atletas. Contudo, em doses baixas, 10 mg/kg (3x semana), o comportamento não foi uniforme, sugerindo que a sua utilização em doses baixas é verdadeiramente uma armadilha, uma vez que pode derivar num caso positivo de *doping* sem extrair resultados benéficos para o rendimento motor.

A rhEPO aplicada por via subcutânea apresentou uma semi-vida superior à obtida quando utilizada por via endovenosa. Estes valores mostraram-se sensivelmente maiores em atletas do que em não atletas. Fisher (2003) aponta que, embora a via subcutânea tenha uma certa eficiência farmacológica, somente 25% do medicamento é absorvido.

Apesar de no passado se acreditar que a concentração urinária de EPO endógena fosse aproximadamente proporcional ao seu nível sérico e resultasse em uma taxa de eliminação diária inferior a 10% do total administrado, hoje em dia sabe-se que a excreção urinária de rhEPO após administração em voluntários saudáveis é negligenciável, sendo menor do que 1% da dose administrada (Jansen e col., 1995) e que, através da presença de produtos de degradação hepática, o fígado está efectivamente envolvido no processo de catabolização da rhEPO, após remoção gradual de resíduos de ácido siálico terminais da molécula (desialação *in vivo*), tornando-se, então, o passo limitante na taxa de depuração da EPO circulante (Dunn e Markham, 1996).

Epoetina alfa, epoetina beta e epoetina omega são as denominações comerciais para algumas das formas de rhEPO disponíveis no mercado para uso terapêutico. Tal classificação é dependente do método de fabricação, sendo as duas primeiras sintetizadas a partir de células ováricas de hamster chinês (CHO), enquanto a última é produzida em células de rim de filhote de hamster (BHK). Apesar de as células de CHO e BHK glicosilarem proteínas de modo bastante similar ao que ocorre na célula humana, algumas zonas hidrocarbonatadas não são sintetizadas por estas células devido à ausência de enzimas açúcar-transferases específicas.

Comparações efectuadas entre diversos lotes de epoetina alfa e beta evidenciaram actividade biológica distinta, devida a diferentes valores encontrados para as razões de potência relativa *in vivo:in vitro* para cada uma dessas formas, sendo tais valores mais elevados para a epoetina beta do que para a forma alfa (Storring e col., 1998). Estas formas de rhEPO são compostas por diversos tipos de isoformas, devido à micro-heterogeneidade na estrutura da hormona provocada pela variação na composição polissacarídica. As isoformas da rhEPO alfa e beta diferem parcialmente na sua composição quando analisadas pela técnica de focalização isoelétrica, com a qual é possível visualizar não só maior número de bandas referentes às isoformas beta, significando maior quantidade de isoformas, bem como uma região com bandas extras em valores de pH mais elevados, conferindo-lhes características mais básicas (Storring e col., 1998).

Além de variações quanto à actividade biológica e à composição estrutural, as duas formas de rhEPO possuem ainda perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes, sendo o volume de distribuição e a semi-vida de eliminação superiores em 7,7 e 20%, respectivamente, para a epoetina beta em relação à epoetina alfa (Helstenson e col., 1991). Contudo, a *clearance* de ambas as formas não apresenta diferenças significativas.

Em relação à administração subcutânea, observa-se atraso na absorção da epoetina beta quando comparada com a forma alfa, encontrando-se valores mais baixos para as concentrações plasmáticas da forma beta durante as primeiras horas após a administração. Já no intervalo de tempo entre as 44 e 66 horas, os valores de concentração da forma beta aumentam de modo a suplantar os da alfa. Valores de concentração máxima de EPO no soro (C_{max}), de tempo para C_{max} (t_{max}) e de área sob a curva (AUC) não apresentam diferenças significativas entre as duas formas, mostrando biodisponibilidade similar (Storring e col., 1998).

Capítulo II – O EXERCÍCIO FÍSICO: FISIOLOGIA E PATOLOGIA

1 – O exercício físico e a *performance* cardiovascular

O exercício físico é uma actividade realizada com repetições sistemáticas de movimentos orientados, com conseqüente aumento no consumo de oxigénio devido à solicitação muscular, gerando, portanto, trabalho (Barros e col., 1999). O exercício representa um subgrupo de actividade física planeada com a finalidade de manter o condicionamento (Wilmore e Costill, 2003). Pode também ser definido como qualquer actividade muscular que gere força e interrompa a homeostase (Silverthorn, 2003).

O exercício físico provoca uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais e, em especial, no sistema cardiovascular. Com o objectivo de manter a homeostasia celular, face ao aumento das necessidades metabólicas, alguns mecanismos são accionados (Araújo, 2001). Esses mecanismos funcionam sob a forma de arcos reflexos constituídos por receptores, vias aferentes, centros integradores, vias eferentes e efectores. Muitas etapas desses mecanismos ainda não foram completamente elucidadas (I CNRC, 1997).

Os mecanismos responsáveis pelos ajustes do sistema cardiovascular ao exercício e as limitações da função cardiovascular constituem aspectos básicos relacionados com o entendimento das funções adaptativas. Esses mecanismos são multifactoriais e permitem ao sistema operar de maneira efectiva nas mais diversas circunstâncias. Os ajustes fisiológicos são feitos a partir das necessidades metabólicas, cujas informações chegam ao tronco cerebral através de vias aferentes, até à formação reticular bulbar, onde se situam os neurónios reguladores centrais (Barros e col., 1999).

Os efeitos fisiológicos do exercício físico podem ser classificados em agudos imediatos, agudos tardios e crónicos. Os efeitos agudos, denominados respostas, são os que acontecem em associação directa com a sessão de exercício; os efeitos agudos imediatos são os que ocorrem nos períodos peri e pós-imediato do exercício físico, como elevação da frequência cardíaca e da ventilação pulmonar; já os efeitos agudos tardios acontecem ao longo das primeiras 24 ou 48 horas (às vezes até 72 horas) que se seguem a uma sessão de exercício e podem ser identificados pela discreta redução dos

níveis tensionais, pela expansão do volume plasmático, pela melhoria da função endotelial (Araújo, 2001) e pela potencialização da acção e aumento da sensibilidade insulínica na musculatura esquelética (Arpad e col., 1996; Rondon e Brum, 2003). Por último, os efeitos crónicos, também denominados adaptações, resultam da exposição frequente e regular às sessões de exercícios e representam aspectos morfo-funcionais que diferenciam um indivíduo fisicamente treinado de outro sedentário, tendo como exemplos típicos a bradicardia relativa de repouso, a hipertrofia muscular, a hipertrofia ventricular esquerda fisiológica e o aumento do consumo máximo de oxigénio ($VO_{2máx}$) (Araújo, 2001). O exercício também é capaz de promover a angiogénese, aumentando o fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos e para o músculo cardíaco (Silverthorn, 2003; Irigoyen e col., 2003).

O exercício físico realizado regularmente provoca importantes adaptações autonómicas e hemodinâmicas que vão influenciar o sistema cardiovascular (Rondon e Brum, 2003), com o objectivo de manter a homeostasia celular em resposta ao incremento das necessidades metabólicas (Fig. 1). Nos exercícios dinâmicos, como as contracções são seguidas de movimentos articulares, não existe obstrução mecânica do fluxo sanguíneo, observando-se um aumento de actividade nervosa simpática, desencadeada pela activação do comando central e receptores musculares (Brum e col., 2004). Em resposta ao aumento da actividade simpática, observa-se aumento da frequência cardíaca, do volume sistólico e do débito cardíaco, redistribuição no fluxo sanguíneo e elevação da perfusão circulatória para os músculos em actividade (Araújo, 2001) (Fig. 1). A pressão arterial sistólica aumenta proporcionalmente ao aumento do débito cardíaco. A pressão arterial diastólica reflecte a eficiência do mecanismo vasodilatador local dos músculos em actividade, que é tanto maior quanto maior for a densidade capilar local (Barros e col., 1999; Pássaro e Godoy, 1996). A vasodilatação do músculo esquelético diminui a resistência periférica ao fluxo sanguíneo, enquanto a vasoconstrição concomitante que ocorre nos tecidos não exercitados, em resultado de estimulação do SNS, compensa a vasodilatação. Consequentemente, a resistência total ao fluxo sanguíneo cai drasticamente quando o exercício começa, alcançando um mínimo a aproximadamente 75% do $VO_{2máx}$ (Silverthorn, 2003).

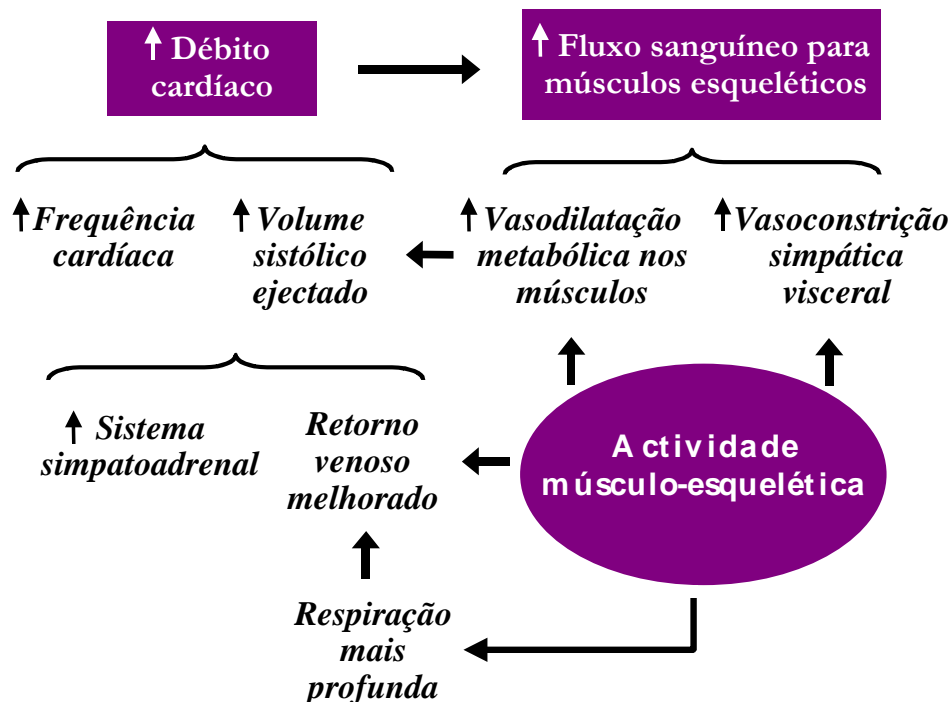


Fig. 1 – Adaptações cardiovasculares ao exercício físico. (Adaptado de Araújo, 2001)

Em resumo, pode dizer-se que, durante um período de exercício, o corpo humano sofre adaptações cardiovasculares e respiratórias com o objectivo de responder às necessidades energéticas aumentadas dos músculos activos e, à medida que essas adaptações são repetidas, ocorrem modificações nesses músculos, permitindo que o organismo melhore o seu desempenho. Entram em acção processos fisiológicos e metabólicos, optimizando a distribuição de oxigénio pelos tecidos em actividade (Wilmore e Costill, 2003). Portanto, os mecanismos que norteiam a queda de pressão pós treino físico estão relacionados com factores hemodinâmicos, humorais e neuronais (Negrão e col., 2001).

2 – Benefícios *versus* efeitos adversos: “o paradoxo do exercício físico”

O exercício físico tem sido recomendado como uma medida terapêutica com um papel significativo na medicina preventiva e na saúde cardíaca (Grandjean e col., 2000; Meilhac e col., 2001; Taylor e col., 2003). O uso do exercício como um tratamento médico é um conceito antigo, mas que não teve aplicação prática imediata. Hoje, os investigadores do exercício estão a explorar os limites do exercício de forma a usá-lo como terapia médica (Moore, 2004). A *American Heart Association* recomenda a prática de exercício físico na maioria dos dias da semana, se possível todos os dias, com intensidade de moderada a extenuante, de acordo com a capacidade física de cada um, por um período de trinta minutos ou mais (Pearson e col., 2002).

Apesar do exercício moderado promover a saúde física, há quem aponte benefícios no perfil lipídico resultantes de exercício de alta intensidade ou extenuante (Kraus e col., 2002). Mas este dado não é consensual. Segundo outros trabalhos, o exercício físico extenuante poderá induzir efeitos nefastos no organismo. Assim sendo, é questionável se todos os programas de treino são realmente seguros em relação à função cardíaca. Treino aeróbio regular parece melhorar a *performance* miocárdica (Palmer e col., 1998), e exercício exaustivo pode contribuir para alterações nos processos cardíacos, resultando em maior dano (Józko e col., 1996; Kumar e col., 1992).

O paradoxo do exercício físico consiste no facto de, embora a sua prática ser altamente recomendada, poder estar associado a um aparecimento de stresse oxidativo, potencialmente lesivo.

Espécies reactivas de oxigénio (ROS) e radicais livres são mediadores de várias formas de dano tecidual, como as lesões isquémicas e danos cardíacos (Diniz e col., 2003; Faine e col., 2002). Sistemas celulares de defesa antioxidante protegem contra ou minimizam o dano oxidativo induzido pelas ROS, mas existe informação conflitual sobre os efeitos de exercício e do treino nas defesas antioxidantes (Józko e col., 1996; Kim e col., 1996; Kumar e col., 1992).

O exercício regular é geralmente associado a alterações favoráveis no risco de morte cardiovascular, mas o exercício extenuante tem sido implicado na patogênese da morte súbita (Maron e col., 1996; Albert e col., 2000) (Fig. 2). O mecanismo que está por trás deste facto não é claro. O exercício afecta tanto a coagulação como a fibrinólise, e a relação entre a activação dos dois processos tem implicações em pacientes em risco de desenvolver trombo intravascular. Se o exercício activa preferencialmente a fibrinólise, então ele pode ser benéfico para estes indivíduos; mas se a coagulação é activada preferencialmente, pode potenciar oclusão devastante para os vasos coronários e cerebrais.

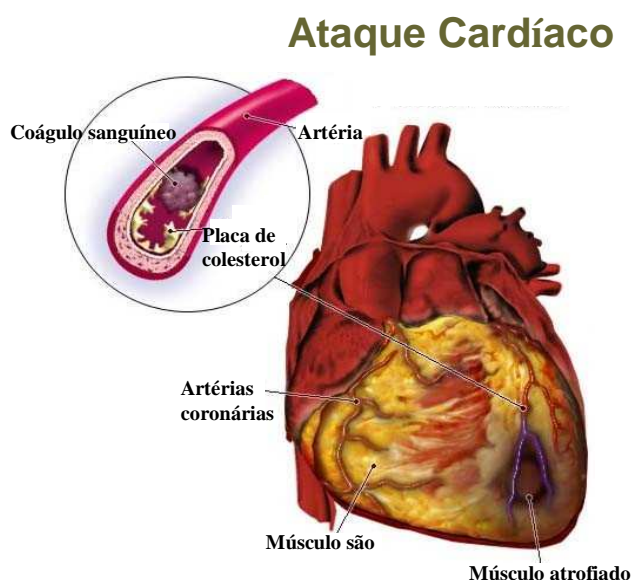


Fig. 2 – Processos fisiopatológicos eventualmente associados à ocorrência de ataques cardíacos. (Adaptado de Albert, 2000)

A actividade física, incluindo treino de resistência e *endurance* apropriado, é uma modalidade terapêutica essencial para a diabetes tipo 2, sendo o seu possível benefício mais substancial no que se refere ao controlo glicémico. Numa amostra diversa de adultos com diabetes, caminhar foi associado com uma diminuição de 39% na mortalidade geral e de 34% na mortalidade por doença cardiovascular (Gregg e col.,

2003). Foi estimado que podia ser evitada uma morte por ano por cada 61 pessoas que caminhassem pelo menos duas horas por semana (Henriksen, 2002), um objectivo facilmente tangível pela maioria das pessoas. Níveis de exercício mais exigentes afiguram-se importantes na prevenção da diabetes tipo 2 e condição metabólica associada. Homens que durante três ou mais horas por semana tiveram uma actividade física de intensidade moderada, por lazer, viram reduzir para metade o risco de desenvolver a síndrome metabólica após quatro anos de cumprimento deste programa (Laaksonen e col., 2002). Após 14 anos de actividade física, constatou-se risco reduzido de doença cardiovascular, de morte cardiovascular e mortalidade total em homens com diabetes tipo 2 (Tanasescu e col., 2003). Num estudo multiracial sobre a resistência à insulina na aterosclerose (Mayer-Davis e col., 1998), níveis aumentados de actividade física moderada e intensa foram associados com maior sensibilidade à insulina. Para além da diabetes e da síndrome metabólica, o exercício físico pode melhorar a saúde cardiovascular em termos genéricos, verificando-se uma melhoria na função vasodilatadora endotelial, na função diastólica do ventrículo esquerdo e na estrutura arterial (Stewart, 2002). Outro dos benefícios, frequentemente desprezado mas actualmente cada vez mais valorizado, é a redução da gordura visceral abdominal e total. Estas alterações na composição corporal, com a prática de exercício, parecem mediar favoravelmente a pressão sanguínea e a sensibilidade à insulina.

Em suma, o exercício físico está associado a importantes modificações metabólicas e, especialmente, cardiovasculares, estando a sua prática geralmente ligada a melhoria da condição física e bem-estar do indivíduo. Contudo, o exercício físico pode também originar efeitos nefastos a nível cardiovascular, designadamente se realizado em circunstâncias extenuantes ou desadequadas. Esta dualidade de efeitos é conhecida como “o paradoxo do exercício físico”.

3 – O exercício físico e o risco cardiovascular

Conhecendo-se já alguns dos mecanismos subjacentes à influência benéfica do exercício físico na *performance* cardiovascular, é, no entanto, menos explorada a sua influência nas hipotéticas perturbações cardiovasculares associadas ao exercício mal orientado ou desapropriado. No entanto, algumas alterações fisiopatológicas têm sido sugeridas, designadamente: a nível da vascularização do miocárdio; dos factores de coagulação; da pressão arterial; dos lipídeos séricos; da activação do SNS; da formação de ROS; da produção de vasoconstrictores (como a 5-HT, entre outros); da agregação plaquetar, entre outros.

Neste estudo serão analisadas algumas destas possibilidades, sendo no ponto seguinte desta introdução feita uma caracterização fisiológica dessas vias, bem como dos dados já conhecidos das alterações associadas ao exercício físico.

3.1 – O exercício físico e a reactividade plaquetar

3.1.1 – O papel das plaquetas na fisiopatologia cardiovascular

As plaquetas são o elemento mais pequeno dos constituintes do sangue. Sendo anucleadas, não são designadas células propriamente ditas, e têm origem em fragmentos de megacariócitos que se encontram na medula óssea.

Possuem a forma de discos redondos ou ovais com 2 a 4 μm de diâmetro, assegurada por um citoesqueleto e um anel de microtúbulos existentes nas imediações da membrana plasmática, a qual possui algumas glicoproteínas que se pensa serem componentes dos receptores presentes na sua superfície (Morian e col., 1990).

As plaquetas apresentam um sistema canalicular aberto que representa um local de entrada/extrusão de substâncias, constituindo também uma reserva membranar, designadamente para a emissão de pseudópodos durante a activação plaquetar e para a alteração da sua forma. Interligado a este sistema, denota-se o sistema tubular denso que

é um local de armazenamento de Ca^{2+} , disponível para ser libertado aquando da activação plaquetar (Morian e col., 1990).

A obtenção de energia metabólica ocorre essencialmente por glicólise e não por fosforilação oxidativa, dado que possuem grânulos de glicogénio e poucas mitocôndrias. Contêm ainda: a) grânulos densos, com elevadas concentrações de nucleótidos de adenosina (ADP e ATP), de amins biológicas (especialmente 5-HT) e Ca^{2+} que, quando libertados, podem afectar tanto a actividade das plaquetas como o tónus vascular; b) grânulos α que possuem proteínas que podem influenciar a função vascular e a cascata de coagulação, entre elas o fibrinogénio, com papel fundamental quer no processo de agregação plaquetar como no da coagulação; c) lisossomas que, através das hidrolases ácidas, desempenham um importante papel na eliminação do tampão plaquetar (Morian e col., 1990).

As plaquetas, quando activadas, sintetizam prostaglandinas, o tromboxano A_2 e o factor de activação plaquetar, entre outros compostos, que são depois libertados, activando outras plaquetas e influenciando também o tónus vascular.

A principal função das plaquetas é a hemostase. Em situações em que um vaso se encontre danificado, ocorre exposição do tecido sub-endotelial ao qual as plaquetas vão aderir libertando os conteúdos armazenados nos seus grânulos, resultando na activação de um maior número de plaquetas, formando o tampão hemostático. A activação plaquetar também promove a cascata de coagulação, resultante da activação de trombina e de factores de coagulação, permitindo assim a formação de fibrina e a consolidação do tampão, bem como a amplificação do processo hemostático. O objectivo do coágulo é fortalecer o tampão de plaquetas de modo a resistir à pressão do sangue. A etapa final, a dissolução do coágulo de fibrina (fibrinólise), procura o estabelecimento da circulação sanguínea e o funcionamento do vaso em condições normais.

A adesão e a alteração de forma são as primeiras respostas fisiológicas que as plaquetas desenvolvem após a sua estimulação e, conjuntamente com a agregação primária, constituem as respostas plaquetares reversíveis. A agregação plaquetar requer a exposição dos receptores de fibrinogénio a agonistas plaquetares. Agonistas de grande potência agregante promovem agregação irreversível, dada a ocorrência da reacção de libertação, constituindo estas as respostas irreversíveis.

- Estruturalmente, as plaquetas possuem um conjunto de características em comum com os neurónios monoaminérgicos, especialmente serotoninérgicos, e com as células musculares lisas (Pletscher, 1988).

A importância das plaquetas para a fisiopatologia cardiovascular decorre da sua influência no tónus vascular, em alterações tromboembólicas e no processo aterosclerótico:

- As plaquetas produzem e/ou armazenam um conjunto de substâncias que, uma vez libertadas, podem afectar tanto o endotélio como o músculo liso vasculares e condicionar as suas respostas. Nelas se incluem a serotonina, o tromboxano A₂, o ADP, a adrenalina e a noradrenalina, entre outras;

- As plaquetas participam na formação e consolidação do tampão hemostático, responsável pelo tamponamento da superfície de um vaso lesado que impede a perda de sangue, bem como na dissolução do coágulo que permite o restabelecimento da normal circulação sanguínea e o funcionamento do vaso (Fig. 3). Conjuntamente com o endotélio vascular, as plaquetas têm um papel fundamental na hemostase e estão envolvidas nas alterações que conduzem às complicações tromboembólicas;

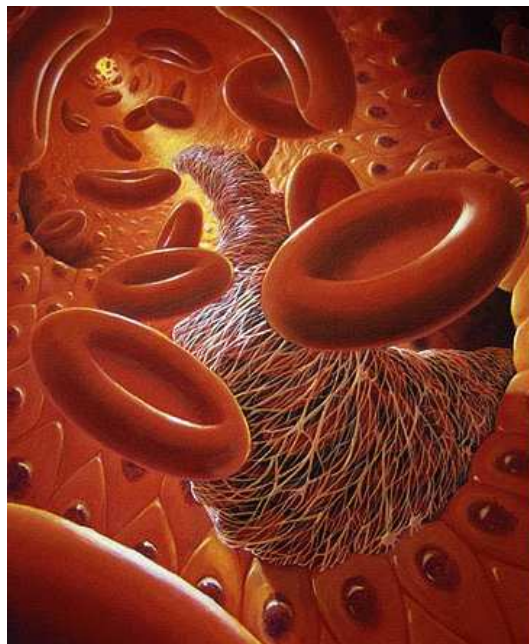


Fig. 3 – Plaquetas envolvidas na hemostase.
(Adaptado de Gifford, 2002)

▪ Desempenham um papel igualmente importante no processo aterosclerótico, uma vez que participam decisivamente não só na formação do trombo, como também na migração e proliferação das células musculares lisas, através da libertação do factor de crescimento derivado das plaquetas (Baumgartner e Hosang, 1988; White, 1994).

As plaquetas, devido às suas características e ao facto de serem fácil e rapidamente obtidas, são modelos de grande utilidade e fiabilidade para o estudo de alterações fisiopatológicas relacionadas com os vasos, sendo sugerido que as plaquetas integram certas influências hormonais, iónicas e farmacológicas que controlam ou interferem na regulação cardiovascular.

Estudos clínicos e patológicos demonstraram que as plaquetas desempenham um papel importante na patogénese e progressão das doenças cardiovasculares (Hirsh e col., 1981; Fitzgerald e col., 1986; Davies e col., 1986). Um estudo prospectivo sugeriu que existe uma relação entre a concentração de plaquetas no sangue e agregabilidade e incidência a longo prazo de doença coronária fatal em homens aparentemente saudáveis (Thaulow e col., 1991). É conhecido o papel dos agentes antiplaquetares na redução da incidência de eventos isquémicos cardiovasculares em algumas experiências terapêuticas (Lewis e col., 1983; Cairns e col., 1985).

3.1.2 – Influência do exercício físico na activação plaquetar

Estudos epidemiológicos sugeriram que o exercício físico regular parece desempenhar um importante papel na prevenção e tratamento de várias doenças cardiovasculares (Paffenbarger e col., 1975; Morris e col., 1980; Arraiz e col., 1992). Um estudo animal demonstrou que o exercício regular pode reduzir a tendência trombótica induzida por lesão via laser das veias sanguíneas (Yamamoto e col., 1989).

Estudos prévios sugeriram que o risco primário de paragem cardíaca é transitoriamente aumentado durante exercício vigoroso, enquanto exercício físico habitual é associado com decréscimo geral do risco primário de paragem cardíaca (Siscovick e col., 1984). Portanto, é importante distinguir eventos fisiológicos que ocorrem entre pequenos períodos de curta duração de exercício e treino físico. Outro

estudo sugeriu que a adesividade e agregabilidade plaquetares, mas não a libertação, podem tornar-se sensíveis ao exercício extenuante de curta duração e podem ser suprimidas pelo exercício moderado de curta duração, assim como os efeitos do exercício de curta duração tendem a ser mais pronunciados em homens sedentários que nos homens activos (Wang e col., 1994).

Contudo, os efeitos do treino na adesividade plaquetar ainda não foram cabalmente estudados. O exercício físico extenuante, de curta duração, estimulou a adesividade e a agregabilidade plaquetares mas não a reacção de libertação; por sua vez, com exercício moderado não se verificou essa estimulação (Wang e col., 1994). Contudo, os efeitos do treino físico na agregação plaquetar são controversos ou incompletos (Rauramaa e col., 1986; Lehmann e col., 1986; Davis e col., 1990; Golyshenkov e col., 2004).

O treino físico de intensidade moderada diminuiu a adesividade e agregabilidade plaquetares, o que pode por sua vez reduzir o risco de eventos trombóticos e pode explicar, pelo menos em parte, como o exercício físico regular nos pode proteger de doenças cardiovasculares (Wang e col., 1995).

A contagem de plaquetas tem mostrado repetidamente um aumento após exercício agudo (Hawkey e col., 1975; Rock e col., 1997; Bartsch e col., 1995). Isto presume-se que seja devido à mobilização de plaquetas do baço, medula e outros órgãos reticuloendoteliais em resposta à estimulação das CAs libertadas durante o exercício (Gonzales e col., 1996). No entanto, o efeito do exercício na função plaquetar é menos claro, com algumas evidências de aumento da agregação e outras a reportarem decréscimos (El-Sayed, 1996). Descobriu-se que a β -tromboglobulina parece estar aumentada após exercício ajustado, com maiores valores depois de exercício mais extenuante (Weiss e col., 1998) e menores em indivíduos treinados (Gonzales e col., 1996). Ambos, o factor plaquetar 4 e a β -tromboglobulina estavam aumentados depois de uma maratona (Rock e col., 1997; Lin e col., 1999). Contudo, num estudo da maratona, apesar dos níveis aumentados de β -tromboglobulina, a agregação plaquetar estava diminuída após o exercício (Rock e col., 1997), sugerindo que as plaquetas tinham sido activadas, libertando β -tromboglobulina, revertendo depois para um estado menos reactivo. Os mecanismos subjacentes à activação plaquetar durante o exercício

não estão completamente elucidados, mas podem estar relacionados com o stresse da torção causando dano endotelial, aumentos nas CAs plasmáticas, geração de trombina e mobilização de plaquetas mais activas do sistema reticuloendotelial.

3.2 – Metabolismo do ferro no exercício físico

Tem sido anunciado em vários estudos que atletas, especialmente atletas de *endurance*, que estão envolvidos em treino muito intenso, podem estar mais susceptíveis a deficiências no seu conteúdo de ferro (Clement e Sawchuck, 1984; Newhouse e Clement, 1988). Tal facto é de admitir em virtude dos níveis séricos de ferritina, uma proteína transportadora de ferro cujos níveis no sangue reflectem as reservas de ferro existentes no organismo, se encontrarem abaixo do normal. A existência de uma deficiência de ferro, conjuntamente com a diminuição de hemoglobina e do hematócrito, deu origem ao conceito de “anemia do desportista”. Contudo, enquanto os baixos níveis séricos de ferritina descobertos em atletas são amplamente aceites, tal já não sucede para o seu significado (Eichner, 1992; Sherman e Kramer, 1990), ou seja, se representam uma verdadeira deficiência em ferro ou uma resposta fisiológica ao treino. Outro ponto por esclarecer é se o desenvolvimento da deficiência de ferro em atletas é relacionado especificamente com as suas actividades desportivas.

O ferro é um mineral que existe em quantidades ínfimas na natureza, que em humanos é um componente essencial da hemoglobina dos glóbulos vermelhos (eritrócitos) e da mioglobina das células musculares, sendo que ambas funcionam como proteínas transportadoras de oxigénio (McDonald e Keen, 1988; Whitmire, 1991). O ferro faz também parte de muitas enzimas contendo o grupo heme (componente de ligação ao oxigénio da hemoglobina) (exemplos: citocromos, catalase e peroxidase) e de muitas outras onde este não está presente (exemplos: NADH, desidrogenase succínica e xantina oxidase), tendo todas estas enzimas um papel vital no metabolismo muscular.

O conteúdo total de ferro no corpo humano varia entre 3 a 5 gramas, e está presente, em percentagem do conteúdo total, como ferro activo (hemoglobina-67%;

mioglobina-3,5%; enzimas e proteínas-0,2%), como transportador de ferro (transferrina-0,08%), como depósito de ferro (hemossiderina-ferritina-27%), e como uma *pool* lábil (2,2%).

O desenvolvimento de uma deficiência em ferro indica uma instabilidade na homeostasia do ferro. O que pode resultar de um desequilíbrio entre as necessidades fisiológicas e a ingestão de ferro, de perdas de ferro aumentadas, ou da combinação destes dois factores. O treino estimula um aumento quer da massa quer do conteúdo enzimático do músculo, fomentando, conseqüentemente, um aumento nas demandas de ferro dos atletas (Sherman e col., 1990).

O desequilíbrio entre a absorção e a excreção origina uma deficiência de ferro. A absorção está inversamente relacionada com os depósitos de ferro do organismo, sendo a concentração sérica de ferritina um indicador dessas reservas. A disponibilidade de ferro em atletas pode decrescer, sem as reservas de ferro terem sido afectadas. Atletas de *endurance* tendem a sofrer um aumento da hemólise intravascular, o que habitualmente não é significativo para o desenvolvimento de uma anemia aguda. A hemoglobina que é libertada através da hemólise intravascular, liga com a haptoglobina para formar o complexo hemoglobina-haptoglobina, o qual é metabolizado por hepatócitos (células do fígado). Por seu lado, a hemoglobina libertada durante o processo normal de senescência dos eritrócitos é metabolizada pelo sistema monócito-macrófago. O metabolismo da hemoglobina produz ferro hémico que é reutilizável em nova eritropoiese. A velocidade à qual o ferro é libertado dos hepatócitos é inferior à apresentada pelo sistema monócito-macrófago, logo, um aumento da hemólise intravascular reverte numa diminuição da biodisponibilidade do ferro (Magnusson e col., 1984).

Apesar de não haverem publicadas diferenças significativas entre os parâmetros hematológicos dos atletas de vários desportos, sabe-se que as perdas de ferro estão aumentadas durante actividades de *endurance*. A recolha imediata de sangue logo após uma sessão de treino atestou que todos os parâmetros hematológicos estavam alterados, o que é principalmente devido à hemoconcentração (concentração de eritrócitos e outros componentes sanguíneos devido à perda de constituintes do plasma).

No caso da ferritina do soro, esta parece aumentar depois do exercício devido à hemoconcentração, e deve ser referido que o stresse do exercício físico por si só, bem como numa inflamação aguda, vai, em resposta, produzir uma elevação aguda que pode perdurar por 2 ou 3 dias. Existem factores para além da deficiência em ferro que podem provocar níveis baixos de ferritina. Por exemplo, o treino crónico induz um aumento do volume plasmático, coexistindo um alto grau de hemólise intravascular, ocorrendo uma redução dos níveis de ferritina.

O papel do ferro e do grupo heme na função biológica e capacidade de trabalho tem sido elucidado através de estudos em humanos e animais (Finch e Huebers, 1982; Dallman, 1982).

Não é surpreendente que o ferro da hemoglobina, quando em falta, possa alterar profundamente a *performance* física, subordinada a uma menor capacidade de transporte de oxigénio para os músculos em exercício. O que é intrigante, no entanto, é que embora o ferro não hémico associado a sistemas enzimáticos compreenda apenas 1% do total de ferro no organismo, profundas deficiências destes compostos por si só possam ter efeitos nocivos para o desempenho atlético. Estudos ilustraram que o consumo máximo de oxigénio é determinado, primeiramente, pela capacidade de transporte de oxigénio do sangue e, conseqüentemente, está também correlacionado com o grau de anemia. A *performance* de *endurance* a intensidades reduzidas, está mais intimamente associada aos níveis de ferro dos tecidos, dada a forte conexão existente entre a capacidade de manter exercícios submáximos prolongados e a actividade da enzima oxidativa, piruvato oxidase.

Há um desacordo nos resultados de estudos em humanos no que concerne ao fenómeno de limiar de hemoglobina. Edgerton e colaboradores (1981) sugeriram que a diminuição da *performance* em sujeitos anémicos (deficitários em ferro) foi o reflexo do nível de anemia, em vez de outras mudanças bioquímicas não relacionadas com a hemoglobina. Já Perkkio e seus colaboradores (1985), avançaram com uma relação mais linear entre hemoglobina e *performance* e, por isso, não defendem necessariamente a presença de um limiar de hemoglobina.

Vários estudos conduzidos cerca de duas décadas atrás documentaram alterações no *status* do ferro de atletas, ainda que desconhecemos o hipotético prejuízo dessas

alterações para o desempenho físico. Foram evidenciadas reduções significativas do número de eritrócitos e da hemoglobina, e investigações subsequentes obtiveram idênticas reduções na hemoglobina e também do hematócrito em certas populações de modalidades atléticas.

Inúmeros investigadores propuseram mecanismos através dos quais o equilíbrio do ferro poderia ser afectado pelo exercício físico intenso (Weaver e Rajaram, 1992). As explicações incluíam perdas de sangue gastrointestinais e hematúria (sangue na urina) como resultado da ruptura de eritrócitos, após corrida de longa duração (Cook, 1994).

3.3 – O exercício físico e o perfil lipídico

3.3.1 – O perfil lipídico como indicador de risco cardiovascular

Entre os factores de risco que provocam o desenvolvimento da doença arterial coronária encontram-se as dislipidemias, que são distúrbios do metabolismo lipídico, com repercussões sobre os níveis das lipoproteínas na circulação sanguínea, bem como sobre as concentrações dos seus diferentes componentes (Giannini, 1998). Mais especificamente, as dislipidemias com níveis anormais de colesterol total, triglicérides, lipoproteínas de alta densidade ligada ao colesterol (HDL-colesterol), lipoproteínas de baixa densidade ligada ao colesterol (LDL-colesterol) e lipoproteína a (Lp(a)), estão directamente associadas à génese e evolução da aterosclerose (II CBD, 1996; Yu e col., 2000). A elevada concentração de LDL-colesterol e Lp(a), assim como a baixa concentração de HDL-colesterol, têm sido consideradas como factores de risco independentes para o desenvolvimento da aterosclerose (Giannini, 1998; McArdle e col. 1998). Além dessas alterações lipídicas, o estilo de vida sedentário é outro factor de risco que concorre para o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Fig. 4). A prática de exercícios físicos é aconselhada actualmente como parte profiláctica e terapêutica de todos os factores de risco da doença arterial coronária. O combate à dislipidemia através de exercícios físicos tem sido alvo de inúmeros estudos e debates científicos em todo o mundo e, actualmente, está a ser recomendado como parte integrante do seu tratamento

(Ziogas e col., 1997). Sabe-se que esta discussão surgiu devido à existência de um grande número de pessoas com alterações lipídicas/lipoproteicas sujeitas à doença arterial coronária e às consequências sócio-económicas causadas pelo seu internamento em unidades hospitalares por doenças cardiocirculatórias em todo o mundo, com grandes repercussões financeiras. Desta forma, a procura de alternativas que pudessem ser menos dispendiosas, coloca, actualmente, o exercício físico como um grande aliado no combate a essas doenças. Porém, as melhores formas de se exercitar, a fim de promover alterações benéficas no perfil lipídico, ainda constituem um desafio a toda a comunidade científica.

As LDL-colesterol minimamente modificadas desempenham um papel relevante no aparecimento da disfunção endotelial e no início da aterosclerose. As LDL-colesterol acumulam-se no espaço extracelular das artérias, onde se oxidam e modificam, o que desencadeia a produção de citocinas pelas células vasculares locais, que promovem a migração através das paredes arteriais. As LDL-colesterol oxidadas são reconhecidas pelos receptores dos macrófagos activados e convertidas em células esponjosas. Sabe-se que os pacientes com aterosclerose na carótida apresentam maior nível de anticorpos contra as LDL-colesterol oxidadas que os indivíduos normais.

3.3.2 – Influência do exercício físico no metabolismo lipídico

Altos níveis de gordura corporal constituem um factor de risco independente para doença cardíaca e têm sido relacionados com outros problemas de saúde tais como hiperlipidemia, diabetes tipo 2 e hipertensão arterial. O exercício físico, em contrapartida, pode ser utilizado, associado ou não à dieta alimentar, na promoção da perda de peso e manutenção de níveis lipídicos normais.

O interesse pelo estudo das alterações metabólicas ligadas ao exercício físico surgiu nas últimas décadas quando se começou a verificar que a mortalidade e morbidade por doença cardiovascular aterosclerótica era menor na população fisicamente activa do que na sedentária (Morris e col., 1973; Paffenbarger e Hale, 1975). Não se sabendo nessa altura o mecanismo através do qual o exercício físico

influenciava a doença cardiovascular, várias hipóteses foram propostas para explicar a sua acção benéfica: a protecção vascular pelo sistema neuronal; o aumento da vascularização do miocárdio; a protecção ao nível dos factores de coagulação; a diminuição da pressão arterial; o efeito benéfico sobre os lipídeos séricos. Esta última parecia ser a hipótese mais consistente uma vez que se verificava que o colesterol total e os triglicérides tendiam a ser mais baixos nos grupos fisicamente mais activos, e, pelo contrário, o colesterol das lipoproteínas de alta densidade era mais elevado, havendo já nessa altura evidência que os níveis séricos de HDL-colesterol se correlacionavam inversamente com a doença coronária aterosclerótica. Parecendo aceitável esta teoria, restava contudo a dúvida se estas variações eram exclusivamente devidas ao efeito do exercício físico ou se eram consequência de outros factores não controlados nestes primeiros estudos, como as variações da alimentação e da gordura corporal. Mudanças benéficas nos níveis plasmáticos da HDL-colesterol ocorreram em homens com faixa etária variando de 23 a 63 anos, com níveis lipídicos normais, após um programa de um ano de exercício aeróbio (intensidade de 60 a 80% da frequência cardíaca) e com redução da percentagem da gordura corporal (Leaf e col., 1997). Desta forma, a associação da dieta ao exercício parece ter um papel importante para tais alterações.

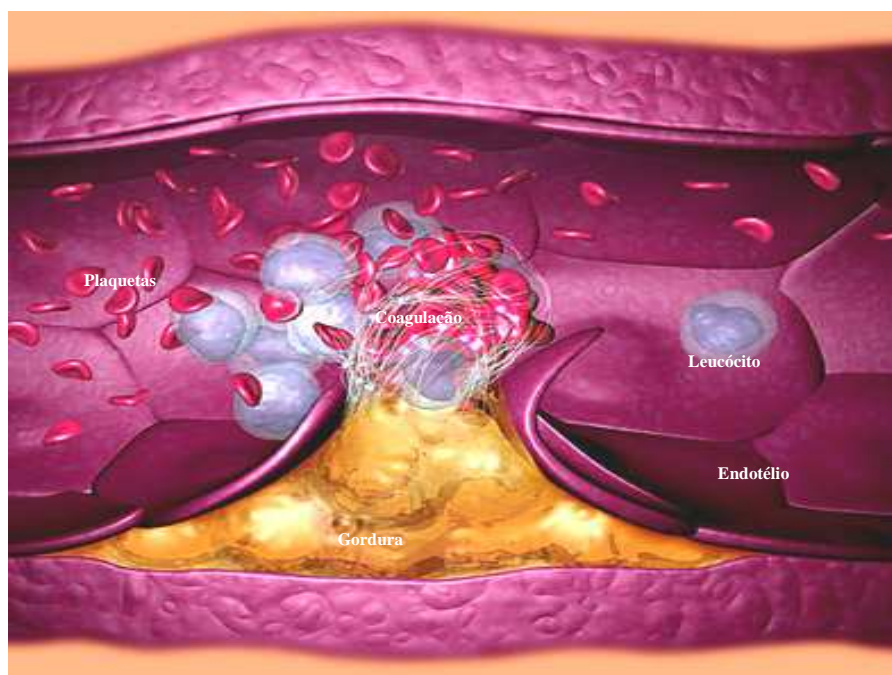


Fig. 4 – Desenvolvimento do processo aterosclerótico.
(Adaptado de Grandjean, 2000)

Modificações benéficas na LDL-colesterol foram encontradas em homens com idades entre 30 e 64 anos e mulheres com idades entre 45 e 64 anos, todos com níveis baixos de HDL-colesterol e moderadamente elevados de LDL-colesterol, quando praticavam exercícios aeróbios associados a uma dieta. Aqueles indivíduos foram divididos em quatro grupos que realizaram: apenas exercício aeróbio, somente dieta, exercício aeróbio mais dieta e um grupo controle que não efectuou nenhuma das actividades, verificando-se que os níveis de LDL-colesterol foram significativamente reduzidos no grupo de exercício físico mais dieta quando comparados com o grupo controle e entre homens desse mesmo grupo (dieta mais exercício) quando comparados com homens do grupo que realizou apenas exercício físico (Fig. 4). O grupo que fez apenas dieta não reduziu significativamente o LDL-colesterol em ambos os sexos, embora somente este grupo e o do exercício mais dieta tenham reduzido o peso corporal. Nenhuma mudança significativa dos níveis de HDL-colesterol foi encontrada entre os grupos sujeitos às actividades (dieta e exercício) para ambos os sexos. Assim, este estudo demonstrou a importância do controle dos níveis elevados da LDL-colesterol, não só com a dieta mas com exercício físico aeróbio associado, onde também ocorreu perda de peso corporal (Stefanick e col., 1998).

Desde então, e principalmente nos anos mais recentes, vários estudos foram efectuados procurando um melhor esclarecimento da relação entre os lipídeos séricos e o exercício físico. E, se é verdade que actualmente não há grandes dúvidas sobre o efeito benéfico global desta relação, não é menos verdade que muita controvérsia permanece em torno de algumas fracções lipídicas, como do próprio tipo de exercício praticado. Por exemplo, alguns estudos transversais mostraram que há diminuição significativa do LDL-colesterol e aumento significativo do HDL-colesterol em atletas quando comparados com não atletas, enquanto outros estudos mostraram pouca variação no LDL-colesterol.

O tipo de exercício físico tem também muita importância nas modificações lipídicas. Segundo a maioria dos trabalhos publicados o exercício de *endurance* ou aeróbio parece ter bons resultados sobre o perfil lipídico, o mesmo não acontecendo com o exercício anaeróbio que se associa a modificações desfavoráveis. Quando se compararam diferentes níveis de intensidade de exercícios físicos aeróbios em 149

homens e 120 mulheres sedentários e sem doenças cardiovasculares, com idades entre 50 e 65 anos, verificou-se, após dois anos de programa de treino, um aumento dos níveis de HDL-colesterol em diferentes intensidades do exercício, sendo que o grupo de indivíduos que treinava com uma intensidade mais baixa (60 a 73% da frequência cardíaca máxima), cinco vezes por semana, alcançou aumentos mais significativos na HDL-colesterol do que o grupo de indivíduos que treinava a uma intensidade maior (73 a 88% da frequência cardíaca máxima), três vezes por semana. Assim constata-se que a prática de exercícios aeróbios de intensidade moderada, por indivíduos de meia-idade, pode resultar em alterações benéficas nos níveis lipoproteicos, salientando-se que a frequência do exercício pode ser importante na produção dessas mudanças (King e col., 1995). Do mesmo modo, a quantidade de exercício físico influencia os lipídeos séricos havendo evidência, principalmente em relação ao HDL-colesterol, de que a resposta poderá estar directamente relacionada com a carga de treino aplicada, ressaltando daqui a necessidade de determinar a partir de que quantidade existe benefício e até que limite ele se verifica. Há constatações na literatura científica de que exercícios aeróbios intensos poderiam tornar susceptível a oxidação da LDL por radicais livres, provocando maiores danos à parede arterial coronária; porém, alguns trabalhos não demonstraram esse acontecimento. Um estudo comparou os níveis lipoproteicos de um grupo de 38 atletas treinados com outro composto por 38 indivíduos sedentários, todos normolipidemicos. Os resultados mostraram que a LDL-colesterol dos atletas era mais resistente às modificações oxidativas do que a dos sedentários, não encontrando, assim, aumento oxidativo da LDL-colesterol em atletas por aumento de radicais livres, além de estes apresentarem um nível mais elevado de HDL-colesterol (Sanchez-Quesada e col., 1997). A explicação para essas alterações benéficas das lipoproteínas nos níveis plasmáticos da HDL-colesterol, LDL-colesterol e suas subfracções, além da LDL-oxidada, com o exercício aeróbio nas suas diferentes intensidades, durações e frequências, reside no melhor funcionamento dos processos enzimáticos envolvidos no metabolismo lipídico, mais especificamente, no aumento da actividade enzimática da lipase lipoproteica. Esta favorece um maior catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, formando menos partículas LDL aterogénicas e elevando a produção de HDL nascente. O aumento da aciltransferase de lecitina e a diminuição da actividade da

lipase hepática podem também ser relevantes, uma vez que ambas favorecem a formação de subfracções de HDL₂-colesterol. A redução com o exercício aeróbio da actividade da proteína de transferência de colesterol esterificado também parece ocorrer, permitindo uma prevenção na formação de partículas LDL pequenas e ricas em colesterol (Halle e col., 1999; Grandjean e col., 2000).

3.4 – O exercício físico e o sistema nervoso simpático

3.4.1 – O SNS e a fisiopatologia cardiovascular

As catecolaminas são sintetizadas a partir do aminoácido L-tirosina (Fig 5), com auxílio da enzima tirosina-hidroxilase que promove a adição de um grupo hidroxilo, originando L-dopa que, por acção da enzima L-dopa descarboxilase, leva à formação de dopamina (DA). Este é o precursor das duas catecolaminas de maior relevo no funcionamento do ramo adrenérgico do SNS: a noradrenalina (NA) e a adrenalina (AD). Nos neurónios adrenérgicos a DA, após entrada para o interior de vesículas, é convertida em NA, por acção da enzima β -hidroxilase. Na medula suprarrenal, a NA pode ainda converter-se em AD, através da enzima feniletanolamina N-metil transferase (FEMT).

A NA, o principal neurotransmissor dos nervos simpáticos adrenérgicos, é libertada pelas terminações nervosas após estimulação simpática. Após actuar nos receptores pós-sinápticos, grande parte é recaptada pela célula neuronal (*uptake 1*), sofrendo degradação pela monoamina oxidase A (MAO-A), e eventualmente pelo tecido não-neuronal, onde é rapidamente degradada pela enzima Catecol-O-metiltransferase (COMT). A pequena fracção libertada para a circulação na forma livre, sobretudo da suprarrenal, é condicionada pela rápida sulfo e glucorono conjugação, captação pelas plaquetas e/ou pelos tecidos periféricos, como o coração, a aorta, e o restante sistema vascular; e pela sua eliminação pela urina.

A AD é essencialmente uma neurohormona produzida e libertada pela medula suprarrenal, sendo sujeita ao mesmo conjunto de factores descritos anteriormente que restringem a quantidade de NA livre em circulação. É de salientar que, nos tecidos

periféricos, estes dois neuromediadores desempenham o seu papel fisiológico ou fisiopatológico, através da interacção com receptores adrenérgicos pós-sinápticos.

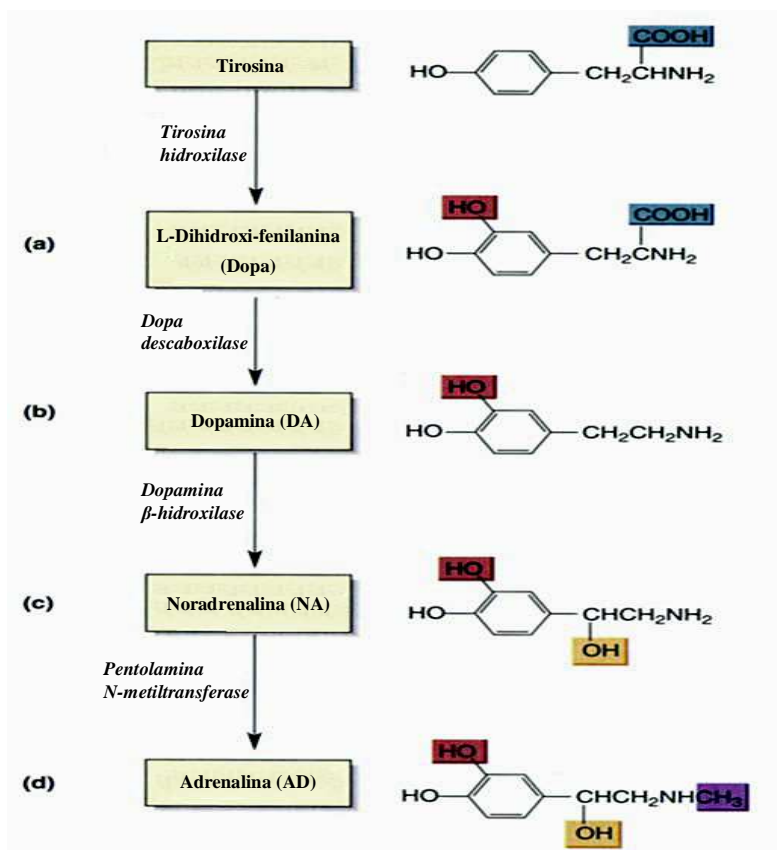


Fig. 5 – Resumo da síntese das catecolaminas e principais enzimas intervenientes no processo. (Adaptado de Iaccarino, 2001)

As plaquetas assemelham-se aos neurónios monoaminérgicos porque armazenam as catecolaminas em circulação nos seus grânulos densos, de onde são libertadas na sequência de processos de activação, através da reacção de libertação; dada a inexistência da COMT, no seu interior, são ou metabolizadas pela MAO-B ou ainda, sofrer sulfo e glucorono conjugação.

As catecolaminas não conseguem passar através da barreira fosfolipídica da membrana plasmática da célula alvo, resultando a maioria dos seus efeitos da sua ligação aos receptores alfa (α) e beta (β) adrenérgicos, receptores de membrana. A activação dos diferentes receptores pela ligação da NA e AD consuma-se

frequentemente em efeitos contrários, com a vasoconstrição associada aos receptores α e a vasodilatação aos β (Begonha e col., 1995; Guimarães e Moura, 2001). É a distribuição tecidual destes receptores que modula a actividade do SNS nas diferentes regiões do organismo. No entanto, em traços gerais, a NA e AD actua, sobre o músculo vascular liso essencialmente através dos receptores α_1 (pós-sinápticos), originando vasoconstrição por aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (via fosfolipase C); enquanto que a AD pode também ligar-se aos receptores β_2 induzindo vasodilatação (via proteína G activadoras), acção esta menos relevante para a NA. Os principais efeitos da AD são também visíveis ao nível cardíaco onde, por intermédio dos receptores β , induz um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (conduzido via adenilciclase e estimulação da produção de AMPc) que promove o aumento da força de contracção do músculo cardíaco e taquicardia.

A hiperactivação simpática, a nível hemodinâmico, resulta assim, por um lado, em vasoconstrição e em taquicardia; por outro lado, em aumento do hematócrito e da activação plaquetar, favorecendo o estado pró-coagulante. Contribui ainda para a dislipidemia, disfunção endotelial e hipertrofia cardíaca e vascular (Corry e Tuck, 1999; Iaccarino e col., 2001; Grassi, 2004).

3.4.2 – Influência do exercício físico no SNS

O exercício físico representa um bom exemplo fisiológico da utilização do sistema nervoso simpático. No geral, a estimulação do SNS permite:

- uma adaptação cardiovascular que favorece o fornecimento de oxigénio ao nível dos tecidos, o aumento dos processos oxidativos e a produção de energia; essa adaptação passa por um aumento do débito cardíaco e uma redistribuição dos fluxos vasculares;
- um incremento da glicogenólise e da gluconeogénese que permite a manutenção da glicemia em níveis apropriados ao funcionamento cerebral, com, em paralelo, uma inibição da secreção de insulina, da qual resulta um aumento do tónus antilipolítico e um aumento da produção hepática de glicose;

- uma estimulação da lipólise no tecido adiposo que permite o fornecimento de substratos energéticos, essencialmente os ácidos gordos que serão, em parte, oxidados no músculo esquelético e o glicerol que poderá participar na gluconeogénese;

Para os exercícios musculares superiores a 30% da potência aeróbia máxima, as concentrações plasmáticas das catecolaminas aumentam de forma exponencial com a intensidade do exercício. Em função da duração do exercício, as concentrações de NA e de AD evoluem diferentemente. No decorrer de um exercício prolongado, a concentração de AD aumenta mais que a de NA, em virtude de uma diminuição relativa da glicemia. Da mesma maneira, em função do tipo de exercício (*resistência vs. endurance*), das populações estudadas (*adultos vs. adolescentes, sedentários vs. desportistas*) as respostas simpáticas podem ser diferentes.

A resposta varia também em função do nível de treino. O aumento da aptidão ao exercício, para uma mesma carga absoluta, resulta numa menor activação nervosa simpática e num aumento das capacidades secretórias da medula suprarrenal ao esforço. Contudo, o treino modifica também a sensibilidade dos tecidos alvo às catecolaminas. Deste modo, ao nível do tecido adiposo, a resposta lipolítica é mais elevada após treino nos indivíduos sedentários. Esse aumento da resposta lipolítica parece mais marcado no tecido adiposo subcutâneo abdominal que no tecido adiposo subcutâneo femoral mas as relações entre tamanho celular e níveis de expressão dos receptores α_2 -adrenérgicos podem justificar essa diferença. Essas modificações de sensibilidade são mais importantes no homem que na mulher. A resposta antilipolítica α_2 -adrenérgica está mais marcada nas mulheres treinadas que nas sedentárias.

A suspensão do treino leva a uma rápida diminuição destas adaptações, visível após alguns dias. Depois de 50 dias de interrupção, a resposta lipolítica à adrenalina é comparável à existente antes do treino.

A estimulação da medula suprarrenal durante o exercício resulta maioritariamente na libertação de AD das células cromafins, fazendo com que estejam bem descritos os efeitos periféricos metabólicos e circulatórios. No entanto, também NA e vários neuropeptídeos são libertados da medula adrenal durante a actividade física.

O treino físico induz pelo menos três diferentes adaptações da medula adrenal: 1º-treino de *endurance* que aumenta $VO_{2m\acute{a}x}$, resulta numa menor concentração plasmática

de AD a uma intensidade de exercício absoluta submaximal, provavelmente relacionada com a inervação simpática diminuída da medula adrenal; 2º- para uma carga de trabalho relativa idêntica bem como resposta a vários estímulos não relacionados com exercício, os atletas têm uma maior capacidade de secreção de AD que os indivíduos sedentários, o que revela a existência de uma adaptação a longo prazo das glândulas endócrinas ao treino de *endurance* – o desenvolvimento da denominada “medula adrenal do desportista”; 3º- estudos longitudinais em animais indicam que tanto o volume medular adrenal como o conteúdo adrenal de AD aumentam como resultado de treino físico de longa duração.

Dado que a AD tem vários efeitos benéficos no coração, músculo-esquelético e sistema nervoso central, na relação com a *performance* no exercício, a maior capacidade para secretar AD nos indivíduos bem treinados constitui uma vantagem no mundo do desporto de alta competição. Por último, tendo em conta que a capacidade de secreção de AD diminui com a idade, o treino físico pode causar um rejuvenescimento biológico da medula adrenal da mesma forma que se passa no coração e no músculo-esquelético.

Apesar dos efeitos benéficos relatados, a presença de níveis exagerados de AD em circulação pode ter efeitos nefastos, designadamente pela sua influência sobre a actividade cardíaca, vascular e plaquetar. A AD promove vasoconstrição cardíaca e periférica, bem como, potencia a agregação plaquetar, podendo estes efeitos resultar em risco cardiovascular acrescido em determinadas circunstâncias.

3.5 – O exercício físico e o sistema serotoninérgico periférico

3.5.1 – O papel da serotonina na actividade cardiovascular

O aminoácido aromático essencial L-triptofano é um precursor do neurotransmissor serotonina, sendo transportado para os tecidos onde ela é sintetizada, como os neurónios serotoninérgicos e as células enterocromafins do intestino. O triptofano, não podendo ser produzido pelo organismo, é obtido a partir da degradação das proteínas cerebrais ou da circulação plasmática (pool aminoacídico), sendo este

fornecido através da ingestão dietética normal ou da degradação proteica corporal. No plasma, o triptofano pode circular livre (10%), ou, principalmente, ligado a uma proteína de transporte: a albumina (90%). Na barreira hematoencefálica, o triptofano livre compete com outros cinco aminoácidos (neutros) pelo transporte, após o que ocorre a síntese de serotonina cerebral. O processo de síntese inicia-se com a hidrólise do triptofano pela enzima triptofano-5-hidrolase a 5-hidroxitriptofano, com subsequente descarboxilação a 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Stahl, 1985) (Fig. 6).

As plaquetas podem captar e armazenar serotonina, apesar de não a sintetizarem (Sneddon, 1973), funcionando como um “tampão” do excesso circulante. A serotonina é captada na sua maioria por um transportador dependente de energia existente na membrana plasmática e o seu armazenamento ocorre nos grânulos densos. A reacção de libertação, por fusão dos grânulos densos com a membrana externa, desencadeada pela acção de vários agonistas com os receptores da membrana, constitui um dos processos fisiológicos mais importantes que ocorrem nas plaquetas (Mills e col., 1968; Holmsen e col., 1969).

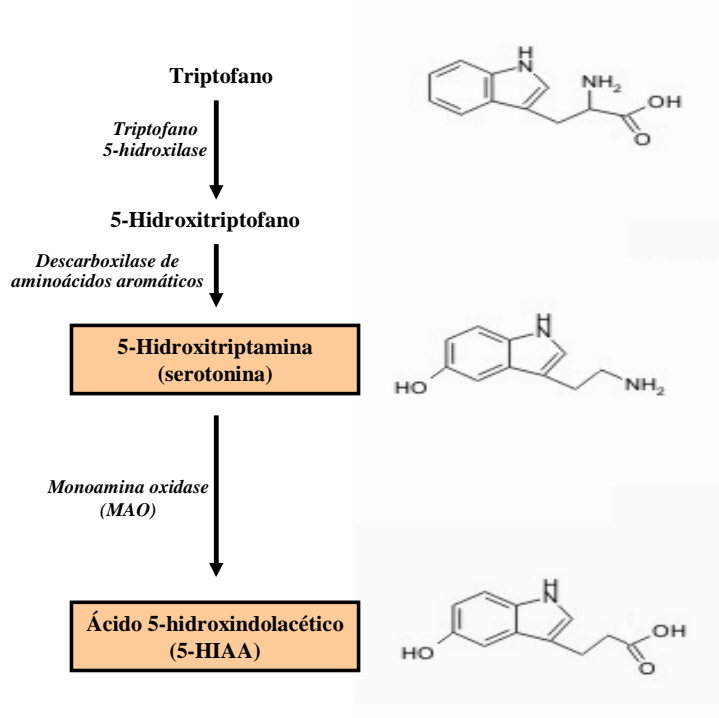


Fig. 6 – Processo de síntese e metabolização de serotonina. (Adaptado de Rossi e Tirapegui, 2004)

A metabolização da serotonina é efectuada pela monoaminaoxidase (MAO) existente nas mitocôndrias das plaquetas e nas terminações dos neurónios pré-sinápticos, catalizando a sua desaminação oxidativa e formando como produto primário o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Stahl, 1985). No neurónio pós-sináptico a catecol-*O*-metil transferase (COMT) também participa na degradação enzimática das catecol e indolaminas, mas não se encontra nas plaquetas (Lahovaara e col., 1968).

Os principais efeitos periféricos da serotonina resultam da sua acção sobre as próprias plaquetas e sobre os vasos. A complexidade de efeitos vasculares da 5-HT resulta do facto da amina poder influenciar a função de vários tipos de células (como as células do músculo liso vascular, os neurónios do sistema nervoso autónomo e as células endoteliais) e das próprias plaquetas.

Quando estimuladas na sua membrana externa pela serotonina, as plaquetas sofrem um processo de activação que se traduz na alteração da sua forma e em agregação plaquetar (ainda que muito ténue) vendo ainda promovida, potenciada e amplificada a sua resposta.

A resposta vascular à serotonina libertada pelas plaquetas depende da integridade do endotélio (Vanhoutte, 1991). Se o endotélio se encontra intacto, ele constitui uma barreira à difusão da serotonina, podendo promover o seu armazenamento e/ou a degradação enzimática. A serotonina que atinge os receptores 5-HT₁ das células endoteliais promove a libertação do monóxido de azoto (NO) que, por sua vez, inibe a adesão plaquetar e, sinergisticamente com a prostaciclina, previne a agregação plaquetar. Estes efeitos contribuem para a acção protectora global do endotélio na prevenção de indesejada deposição e agregação plaquetar aos vasos sanguíneos em condições de normalidade fisiológica. Contudo, se o endotélio está lesado, a serotonina proveniente das plaquetas pode atingir os receptores 5-HT₂ do músculo liso vascular, provocando a vasoconstrição ou amplificando a vasoconstrição por outros vasoconstrictores. Paralelamente, a libertação de noradrenalina pelas terminações nervosas e o seu efeito contráctil vascular através dos receptores adrenérgicos α são amplificados (Vanhoutte, 1991). O resultado final é a ocorrência do processo hemostático e a agregação ao vaso traumatizado, o que impede adicional perda de sangue.

O aumento da concentração de serotonina em circulação poderá contribuir para a manutenção da hipertensão arterial, através do favorecimento da vasoconstrição conjuntamente com a diminuição dos efeitos vasorelaxantes (Vanhoutte, 1991).

3.5.2 – Influência do exercício físico no SSP

Os níveis de serotonina cerebrais estão relacionados a alterações de comportamento e humor, ansiedade, agressividade, depressão, sono, fadiga, supressão de apetite, entre outros. Os mecanismos bioquímicos precisos pelos quais os neurónios serotoninérgicos controlam estas funções ainda não estão totalmente esclarecidos (Bell e col., 2001).

Uma abordagem emergente e polémica está relacionada à fadiga durante a actividade física de curta e longa duração e sua relação com a função serotoninérgica cerebral. A fadiga pode ser definida como um conjunto de manifestações produzidas por trabalho ou exercício prolongado, e tem como consequência a redução ou o prejuízo na capacidade funcional de manter ou continuar o rendimento esperado (Rossi e col., 2000). Actua também como um sinalizador de que a intensidade de treino anteriormente tolerada deve ser reduzida (Cunliffe e col., 1997; Cunliffe e col., 1998).

Podemos distinguir dois tipos de fadiga: a fadiga periférica, relacionada com cansaço ou incapacidade muscular, onde a perda de força e potência muscular que ocorre é independente de acção neuronal; e a fadiga central, relacionada com sistema nervoso central, e caracterizada por uma redução progressiva do direccionamento voluntário para os neurónios motores durante o exercício (Rossi e Tirapegui, 2004).

Desde que o grupo de Eric Newsholme, em 1987, propôs a chamada “hipótese da fadiga central” durante actividades de longa duração, o triptofano como precursor da serotonina tem recebido especial atenção por investigadores da área. Segundo esta hipótese, o aumento na actividade serotoninérgica cerebral teria consequências no desenvolvimento de fadiga precoce nos atletas durante a realização de exercício de longa duração.

Durante a actividade física de longa duração, dois eventos contribuem para o maior influxo de triptofano através da barreira hematoencefálica e consequente síntese e actividade nervosa serotoninérgica: a) os aminoácidos de cadeia ramificada são captados pelo músculo-esquelético para serem oxidados para fins energéticos, diminuindo a competição na passagem da barreira hematoencefálica (Davis, 1995); b) com a continuação do exercício, o organismo começa a mobilizar ácidos gordos livres do tecido adiposo que, competindo pelos locais de ligação da albumina, fazem com que haja uma maior disponibilidade de triptofano livre (Curzon e Knott, 1974). O sinergismo entre estes dois factores desencadeia uma maior produção de serotonina cerebral e o aparecimento de fadiga central precoce (Rossi e Tirapegui, 2004).

Diversos estudos indiciavam que a serotonina poderia estar relacionada com a determinação do limiar de dor e a respostas comportamentais ao estímulo doloroso. Baseados nesta última visão, um grupo de investigadores conduziu uma experiência com a suplementação de 1,2g de triptofano em 20 atletas, durante corrida em tapete rolante, a 80% do $VO_{2máx}$. Os indivíduos suplementados foram capazes de, num segundo teste, aumentar em 49,4% o seu tempo total de exercício em relação ao grupo controlo. Os autores atribuíram este acentuado aumento no rendimento aos efeitos do triptofano e da serotonina no sistema opióide cerebral, fazendo que houvesse uma menor percepção do esforço (Segura e Ventura, 1988).

Em suma, em relação à actividade física, há envolvimento do triptofano tanto em exercícios de longa como de curta duração. Nos exercícios de longa duração, foi proposto o mecanismo da “hipótese da fadiga central” que se encontra por elucidar na sua totalidade. As dificuldades no estudo da determinação da serotonina residem na obtenção da sua concentração cerebral e dos seus metabolitos. Mas mesmo assim há evidências indirectas do seu papel dentro do desenvolvimento de fadiga associada a desportos de longa duração.

Relativamente a variações de serotonina na periferia, os dados existentes são escassos, mas é legítimo pensar que simultaneamente com as alterações centrais ocorram modificações na circulação periférica. Dado o papel da serotonina sobre os vasos e plaquetas, já atrás descrito, será importante avaliar as modificações resultantes de diferentes tipos de exercício físico no SSP.

3.6 – O exercício físico e a inflamação

Quando realizado de forma adequada, o exercício físico tem um impacto extremamente positivo sobre o indivíduo que o pratica. Além de melhorar uma série de parâmetros fisiológicos cardiovasculares, respiratórios e metabólicos, o exercício tem um poderoso efeito sobre o sistema nervoso central, favorecendo uma qualidade global de vida superior para todos que se exercitam. Dentro das alterações benéficas induzidas pela actividade física, uma das mais notáveis, talvez seja a sua capacidade de compelir robustez ao sistema imunológico (Vancini e col., 2005).

Estudos efectuados em animais mostram que o exercício físico aumenta a expectativa de vida em animais portadores de tumores, promove inibição do crescimento tumoral e reduz o risco de vários tipos de cancro, accionando a activação do sistema imunológico dos animais (Ortega, 1997; Singh, 2005).

Apesar de comprovadamente favorável para o organismo, o tipo de exercício, sua carga e duração influenciam sobremaneira os seus efeitos sobre o indivíduo. Existe um patamar óptimo de actividade-carga-duração para o qual os efeitos benéficos são máximos, ao contrário, o exercício extenuante ou de alta intensidade e longa duração tende a ser prejudicial o organismo, podendo desencadear, inclusive, depressão imunológica (Woods e col., 2000; Peijie e col., 2003).

A maioria dos programas de exercício físico estudados experimentalmente e aplicados a seres humanos refere-se a protocolos de actividade física envolvendo exercícios físicos praticados cronicamente e de forma moderada. Contudo, os mecanismos exactos pelos quais a actividade física regular é capaz de avivar a função imunológica permanecem largamente desconhecidos (Costa Rosa, 2004).

É notável que uma série de diferentes protocolos de exercício sejam capazes de arrastar rápidas alterações imunológicas, como a leucocitose, isto é, aumento na quantidade de leucócitos circulantes algumas horas após o cumprimento de exercícios físicos. A actividade física aguda promove o aumento de mais de 50% na quantidade de monócitos no sangue periférico, numa resposta que depende da intensidade e duração do exercício (Woods e col., 2000). Tendo em vista que o exercício físico induz grandes aumentos no consumo de oxigénio, estimulando a produção de radicais livres e espécies

reactivas de oxigénio, e que as células do sistema imunitário são sensíveis às alterações do estado redox celular, não se pode descartar esta possibilidade como causa dessa modificação.

Após exercícios de longa duração, observou-se que a contagem de linfócitos decresceu abaixo do limite inferior da normalidade. Ostrowski e colaboradores (1999) aperceberam-se que o exercício intenso fazia aumentar a circulação de mediadores pró-inflamatórios. Em 2002, Mooren e colaboradores, verificaram, em trabalhos realizados com exercício extenuante e moderado, que após o exercício poderia ocorrer apoptose, e que este processo poderia contribuir para regular a resposta imunológica após exercício extenuante. Experiências realizadas com seis semanas de treino muito intenso mostraram que o exercício induz disfunção imunológica dependente de resposta neuro-endócrina (Perjie e col., 2003). O exercício desencadeia um stresse no indivíduo, proporciona uma resposta como a uma infecção, envolvendo a produção de citocinas que são libertadas aquando do fenómeno inflamatório. Algumas citocinas facilitam um influxo de linfócitos, neutrófilos e monócitos, entre outras células, e algumas participam na destruição dos antígenos na recuperação tecidual (Fig. 7).

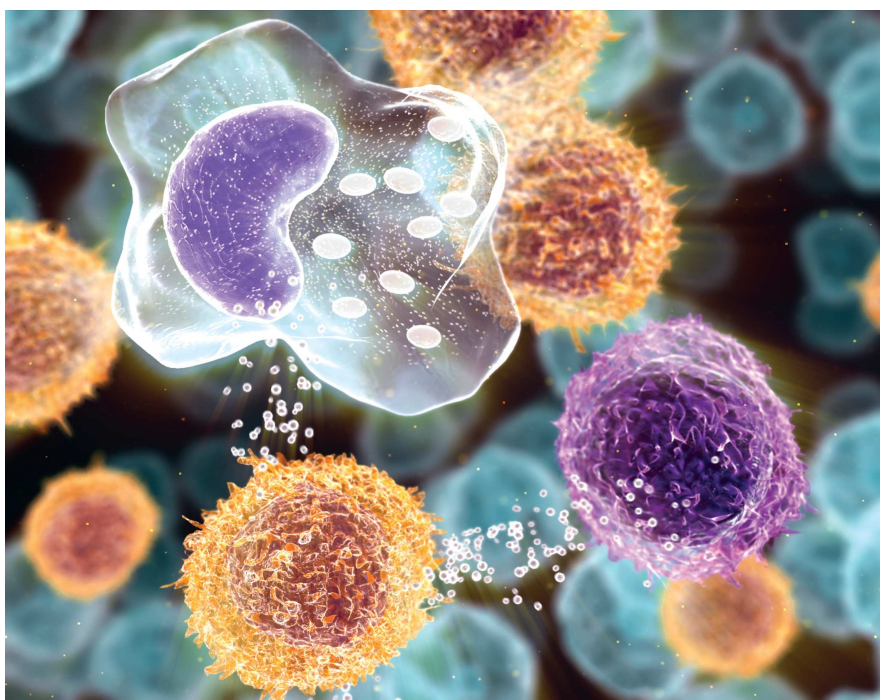


Fig. 7 – Linfócitos comunicam através de citocinas com macrófagos e células T para manutenção e amplificação do ciclo da inflamação.
(Adaptado de <http://www.farmacia.com.pt>)

3.7 – O exercício físico e o stresse oxidativo

3.7.1 – A formação de ROS e o risco cardiovascular

Um radical livre representa qualquer espécie química (atómica ou molecular) que possua um ou mais electrões desemparelhados na sua órbita externa, apresentando então uma configuração altamente instável que lhe confere uma forte reactividade com a maioria das moléculas. O anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidróxilo ($\bullet OH$) e o monóxido de azoto (NO^{\bullet}) são exemplos de radicais livres. Dada a existência de compostos igualmente reactivos mas que não se inseriam na classificação de radicais livres, designam-se de uma forma mais ampla como espécies reactivas de oxigénio (ROS) ou espécies reactivas de nitrogénio (RNS), incluindo assim o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o anião nitróxilo (NO^-), o peroxinitrito ($ONOO^-$), entre outras (Droge, 2002).

O desequilíbrio entre a produção de ROS/RNS e a remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é designado de stresse oxidativo. O sistema de defesa antioxidante inclui as enzimas superóxido-dismutase, catalase e glutathione-peroxidase e os compostos: endógenos como a bilirrubina, ceruplasmina, coenzima Q, ácido úrico, entre outros, e ainda os fornecidos através da dieta alimentar, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno e flavonóides.

O stresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ROS/RNS que causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (Droge, 2002) em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecidos adiposo (Goldfarb, 1993), vascular (Fenster e col., 2002) e cerebral (Keynes e Garthwaite, 2004). No entanto, o efeito lesivo do stresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (Niess e col., 1999).

Uma das principais consequências do stresse oxidativo é a peroxidação lípida, ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Esta ocorre em ácidos gordos polinsaturados e é iniciada por um radical OH^{\bullet} que captura um átomo de hidrogénio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido gordo. O facto de o O_2

ser muito mais solúvel em meio apolar, permite que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração na região hidrofóbica média, tornando a membrana a estrutura mais susceptível ao dano provocado pela peroxidação lipídica. Por isso, um ácido gordo com um electrão desemparelhado reage com O_2 gerando um radical peroxilo (ROO^\bullet), que é um produto altamente reactivo que se pode combinar com outros radicais semelhantes alterando as proteínas da membrana (Gaté e col., 1999). Um dos produtos da peroxidação lipídica da membrana é o malonaldeído (MDA) que, eventualmente, reage com o grupo amina das proteínas, fosfolipídeos ou ácidos nucleicos, induzindo modificações estruturais das moléculas biológicas (Mcbride e Kraemer, 1999).

Para além dos lipídeos membranares, o stresse oxidativo pode também produzir danos no DNA e em proteínas podendo alterar diversas funções celulares vitais.

O endotélio desempenha um papel fundamental na regulação da função vascular através da produção de factores parácrinos que mantêm o tónus vascular, inibem a adesão de plaquetas e células inflamatórias, promovem a fibrinólise e limitam a proliferação vascular. A disfunção endotelial refere-se a um estado fisiopatológico no qual as suas funções homeostáticas estão perturbadas, estando associada com factores de risco aterotrombóticos e servindo também como informação prognóstica acerca de risco cardiovascular aumentado. Os mecanismos subjacentes ao dano da função endotelial em doenças como a hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia e aterosclerose parecem ser multifactoriais. Havendo uma crescente evidência que o stresse oxidativo contribui para os mecanismos da disfunção vascular, estas observações estão de acordo com o reconhecimento de que o aumento de stresse oxidativo pode ser fulcral no processo aterogénico. Como consequência da peroxidação lipídica, os aldeídos e os óxidos de nitrogénio reactivos gerados, juntamente com a nitração de proteínas, suportam a modificação próaterogénica das LDL. A “hipótese da modificação oxidativa da aterosclerose” refere-se ao papel central das LDL oxidadas no processo aterosclerótico e fornece a base para uma ligação de mecanismos entre a hipercolesterolemia e a doença vascular.

Resumindo, o stresse oxidativo altera a função endotelial normal, fornecendo mecanismos pró-inflamatórios, pró-trombóticos, proliferativos e vasoconstritores que

apoiam o processo aterogénico. A produção exagerada ou desequilibrada (tendo em conta o nível de antioxidantes) de espécies reactivas e o consequente stresse oxidativo tem estado associado a diversas patologias, tais como enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose, cancro e envelhecimento.

3.7.2 – Influência do exercício físico no stresse oxidativo

O exercício físico está associado ao aumento da geração de radicais livres principalmente devido ao dramático aumento do consumo de O₂ pelos tecidos activos (Cooper e col., 2002; Cazzola e col., 2003). A maior parte do oxigénio consumido é utilizada na mitocôndria para a fosforilação oxidativa, onde é reduzido a água. Entretanto, uma fracção pequena, porém significativa, do O₂ consumido pode escapar da cadeia transportadora de electrões e produzir ROS (Di Meo e Venditti, 2001). Estima-se que entre 2 a 5% do oxigénio utilizado pela mitocôndria é convertido em radicais livres (Urso e Clarkson, 2003) (Fig. 8). A produção de radicais livres durante o exercício também está associada ao aumento da libertação de CAs e sua auto-oxidação (Cooper e col., 2002; Urso e Clarkson, 2003), bem como ao aumento do metabolismo de prostanóides, das enzimas xantina-oxidase e NADPH oxidase, da oxidação de bases purínicas, danos às hemoproteínas, distúrbios da homeostase de Ca²⁺ e outras fontes secundárias, tais como a libertação de macrófagos pelo sistema imunológico para a reparação de tecidos lesados (Mastaloudis e col., 2004).

Os danos associados ao stresse oxidativo induzido pelo exercício intenso estão relacionados com a diminuição do desempenho físico, fadiga e danos musculares (Konig e col., 2001), promovendo alteração do sistema imunitário (Vider e col., 2001) e do estado de treino dos indivíduos (Alessio e col., 2000). Em geral, os danos musculares causados pelo stresse oxidativo são mais acentuados em indivíduos pouco treinados que realizam exercícios com intensidade e duração acima da sua condição física (Lamprecht e col., 2004).

O exercício intenso pode induzir peroxidação lipídica, conduzindo a problemas como a inactivação de enzimas da membrana celular (Mastaloudis e col., 2001), diminuição da efectividade do sistema imunitário e progressão de doenças crónico-

degenerativas, como o cancro e doenças cardiovasculares (Viitala e col., 2004). O nível de peroxidação lipídica também se mostrou aumentado após exercício aeróbio exaustivo e exercícios de resistência (com carga/pesos) realizados de forma aguda (Miyazaki e col., 2001; Viitala e col., 2004). Porém, os resultados de diversos estudos envolvendo a determinação de peroxidação lipídica face ao stresse oxidativo induzido pelo exercício em órgãos e tecidos, e em diferentes modelos animais, são contraditórios (Turgut e col., 2003; Kinnunen e col., 2005). Os factores que estão relacionados com o aumento da peroxidação lipídica durante e após o exercício são a intensidade, o nível de aptidão física, estado antioxidante dos indivíduos (Baer e Ayres, 2001), o tecido, a dieta (Mataix e col., 1998), a recuperação (Leaf e col., 1997), além do sexo (Ginsburg e col., 2001).

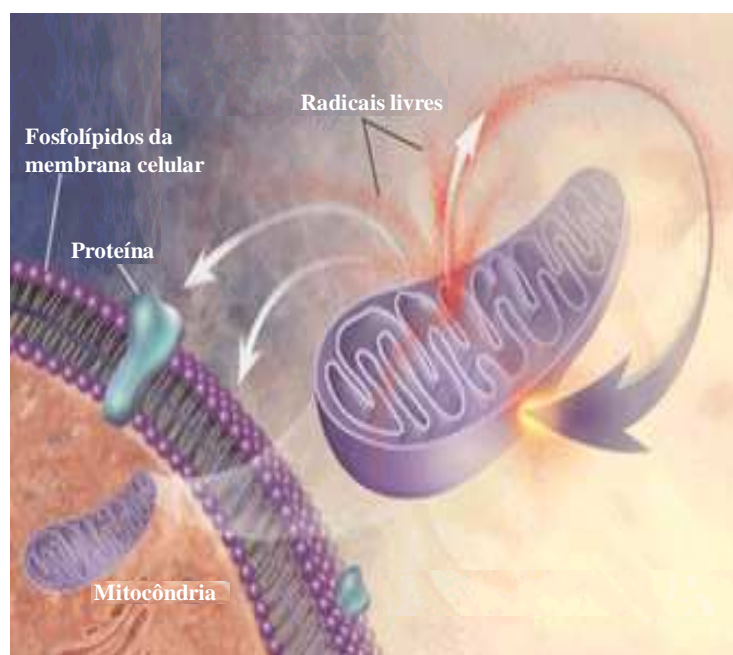


Fig. 8 – Geração de radicais livres associada à fosforilação oxidativa e ao exercício. (Adaptado de Cooper, 2002)

Por outro lado, o exercício crônico de intensidade moderada altera positivamente a homeostase oxidativa das células e tecidos, por diminuir os níveis basais de danos oxidativos e aumentar a resistência ao stresse oxidativo (Niess e col., 1999; Di Meo e Venditti, 2001; Cooper e col., 2002) e, neste sentido, é de grande benefício para a saúde.

De facto o exercício regular resulta em adaptações na capacidade antioxidante, as quais protegem as células contra os efeitos nefastos do stresse oxidativo, prevenindo danos celulares subsequentes (Aguilo e col., 2003). O exercício crónico aumenta a expressão das *heat shock proteins*, proteínas de stresse com a função de reparar e prevenir os danos tecidulares (Hamilton e col., 2003) no músculo-esquelético e cardíaco. Além disso, os indivíduos fisicamente activos apresentam enzimas antioxidantes mais activas e, conseqüentemente, um estado antioxidante aumentado, em comparação com indivíduos sedentários (Dekkers e col., 1996). Num estudo de Powers e col. (1999) afirma-se que o treino habitual de alta intensidade, que é necessário para o nível de competição de elite, é capaz de aumentar as defesas antioxidantes.

A actividade da enzima glutathiona-peroxidase (GPx) em eritrócitos estava aumentada nos corredores de longa distância quando comparada com a encontrada em levantadores de pesos, revelando diferenças adaptativas entre os exercícios aeróbios e anaeróbios (Selamoglu e col., 2000). Na mesma linha de trabalho (Inal e col., 2001) observou-se que a produção de radicais livres em exercício agudo de natação (metabolismo anaeróbio) foi maior do que a capacidade antioxidante. Por outro lado, a avaliação de esquiadores alpinos de elite após treino intenso não registou mudança nos marcadores de stresse oxidativo, supondo-se então que estes atletas tiveram uma adaptação positiva dos seus mecanismos antioxidantes com o treino (Subudhi e col., 2001). Após exercício em tapete rolante, verificou-se uma maior actividade eritrocitária da enzima GPx em atletas de triatlo treinados comparado com indivíduos não treinados e uma capacidade antioxidante plasmática total aumentada em ambos os grupos (Schneider e col., 2002). A maior actividade da GPx está de acordo com os diversos estudos que mostram adaptação do sistema de defesa enzimática (Tessier e col., 1995; Hellstein e col., 1996; Mastaloudis e col., 2001).

Concluindo, grande número de trabalhos têm vindo a sugerir fortemente que a produção de radicais livres está aumentada como resultado de exercício físico intenso. Os radicais livres causam danos aos lipídeos das membranas, proteínas, DNA e outros constituintes celulares. Em contrapartida, o exercício físico moderado pode proteger o organismo dos efeitos deletérios dos radicais livres, pois o mesmo aumenta a capacidade antioxidante celular, sendo portanto, benéfico à saúde.

Capítulo III – A ERITROPOIETINA COMO *DOPING*

1 – O *doping*: resenha histórica e perspectivas actuais

A palavra *doping* tem as suas raízes na palavra holandesa “*Dop*” que era o nome de uma bebida alcoólica produzida pela utilização da pele das uvas. Supostamente actuava como estimulante e aprimorava as proezas dos guerreiros *Zulu* sul-africanos que bebiam o elixir. No entanto, este termo apenas foi introduzido, como parte do vernáculo popular, nos finais século XIX, apesar de o conceito de adquirir uma vantagem, uma ajuda extra em batalha ou competição já existir desde os antigos Gregos e Romanos.

O primeiro caso documentado de *doping* desportivo conhecido ocorreu em 1865, quando nadadores holandeses usaram estimulantes. O desenvolvimento de drogas impulsionadoras de melhores prestações desportivas foi progredindo a uma velocidade constante mas baixa. Por volta de 1930, médicos Nazis, na procura de aumentar a agressividade das tropas germânicas, criaram os esteróides anabolizantes. Sintomaticamente ou não, nas Olimpíadas de 1936, a terem lugar em solo germânico, a Alemanha pulverizou a contagem total de medalhas, com 89 medalhas, quando quatro anos antes se tinha posicionado em nono lugar no ranking, contabilizando apenas 20 medalhas. Depois da 2ª Guerra Mundial, o panorama desportivo reflectia o clima político, com o despoletar de uma guerra fria atlética, entre U.R.S.S. e EUA, como ficou patenteado pelo capital de medalhas (71) da U.R.S.S., na sua estreia, nas Olimpíadas de Helsínquia, em 1952. Configurando um aquiescer desenfreado da rivalidade, o que contribuiu para equacionar e desenvolver versões mais potentes das drogas, facilitando que, no início da década de 60, atletas de todos os quadrantes estivessem a utilizar esteróides (Buti e Fridman, 2001).

A existência de uma opinião pública consciente face ao *doping*, e a sincronização de esforços para o combater, são passos ainda relativamente recentes, especialmente quando comparados com o longo historial da dopagem desportiva. A primeira tentativa de proibir o *doping* foi feita pela Federação Internacional de Atletismo Amador (FIAA) em 1928. Muitas outras federações internacionais procuraram seguir-lhe o exemplo,

mas todos esbarraram na falta de efectividade, dada a ausência de testes capazes de detectar o uso de substâncias proibidas. A morte de um ciclista dinamarquês, Knut Jensen, nos jogos Olímpicos de Roma em 1960, foi o ponto de viragem nesta situação, tendo a autópsia revelado vestígios de anfetaminas, o que compeliu a comunidade desportiva internacional a conduzir uma análise rigorosa e uma discussão séria sobre o tópico, assimilando-se a concepção de que o *doping* iria manchar a reputação e o prestígio da competição desportiva.

Em 1963, o Conselho da Europa estabeleceu uma definição de *doping* que o Comité Olímpico Internacional (COI) modificou ligeiramente e adoptou. Definiu *doping* como “A administração de ou o uso por um atleta de competição de qualquer substância estranha ao organismo ou de qualquer substância fisiológica tomada em quantidades exageradas ou com via de entrada no organismo pouco usual com a única intenção de obter aumento artificial e injusto da *performance* durante a competição”. Antigamente, o desporto era considerado um tributo da religião; mais tarde, nos tempos modernos, tornou-se um caminho de pacificação e de reforço do espírito de união entre nações. Actualmente, muitos atletas vêm o desporto apenas como um meio de alcançar sucesso económico e social, e, assim sendo, não têm pejo em recorrer à indústria farmacêutica para melhorar o seu desempenho.

A Agência Mundial Antidopagem (WADA), fundada em 1999, uma organização Internacional independente representada de forma equitativa pelo Comité Olímpico Internacional (COI) e Autoridades Públicas com a missão de unificar e coordenar a luta contra a dopagem, promulgou em 2003 o Código Mundial Antidopagem. O seu objectivo foi o de universalizar, harmonizar e padronizar, pela primeira vez, as regulamentações anti-*doping* de forma transversal para todos os desportos e para todos os países. Contemplando o Artigo 1: “*Doping* é definido como a ocorrência de uma ou mais violações à lei antidopagem, disposta no Artigo 2.1 através do 2.8 do Código”

Importa portanto, observar o articulado dos Artigos supracitados, que dispõem o que constitui uma violação da lei antidopagem:

2.1 - “A presença de uma substância proibida, ou dos seus metabolitos, ou dos seus marcadores num espécimen corporal do atleta”.

2.2 - “Administração ou tentativa tentada de administração de uma substância proibida ou método proibido para qualquer atleta (...) ou qualquer tipo de cumplicidade envolvendo uma violação da lei anti-*doping* ou qualquer tentativa tentada de violação”.

O que ilustra perfeitamente a definição prática de *doping*, especialmente importante para assegurar o cumprimento escrupuloso das directivas emanadas pelas autoridades e entidades governamentais, com a ajuda de uma lista exaustiva que enuncia claramente quais as substâncias susceptíveis de incorrer em violação.

Portanto, o uso de drogas para recolher benefícios na *performance* física e, citando o Código Médico do COI, “o uso de certas substâncias e métodos com a intenção deliberada de alterar a *performance* é uma prática contrária à ética médica”.

No entanto, como a própria lista de drogas banidas, a definição de *doping* é um alvo em movimento. Tendo mais recentemente sido denominado “como o uso de um artifício, seja substância ou método, potencialmente perigoso para a saúde dos atletas e/ou capaz de potencializar as suas *performances*; ou a presença no corpo do atleta de uma substância, ou a averiguação do uso de um método incluído na lista anexada ao Código Olímpico do Movimento Antidopagem (Tabela 1).

2 – *Doping*: substâncias e métodos proibidos

Doping é uma atitude/acção social indesejável, é sinónimo de controvérsia e, não surpreendentemente, é um comportamento extremamente secreto. As razões básicas para banir o *doping* são:

- Competição desleal
- Problemas/riscos para saúde
- Comportamento não desportivo

A proibição do *doping* visa a preservação dos princípios da verdade desportiva, dos valores intrínsecos característicos do desporto, da competição justa, onde o atleta, por esforço, sacrifício, afino, arrojo e talento, é recompensado. O espírito desportivo é a celebração da dedicação, da solidariedade, da coragem, da ética, *fair-play* e

Tabela 1 – Lista de substâncias e métodos de dopagem proibidos pela AMA

Lista de substâncias e métodos proibidos

Agentes anabolisantes – os esteróides anabolisantes são hormonas sintetizadas de forma natural e artificial que favorecem o crescimento e divisão celular de forma especial em músculos e ossos

exemplos: Testosterona, Nandrolona e Turinabol

Hormonas e substâncias relacionadas –

1. Eritropoietina
2. Hormona de crescimento
3. Gonadotrofinas
4. Insulina
5. Corticotrofinas

Beta-2 agonistas – substâncias usadas no tratamento da asma, aumentam a capacidade de incorporação de oxigénio na respiração ao relaxar os músculos dos brônquios

exemplo: Salbutamol

Agentes com actividades antiestrogénicas

- a. Inibidores de aromatase: impedem conversão de androgénios em estrogénios (exemplos: anastrozole e testolactona)
- b. Modeladores selectivos dos receptores de estrogénios (exemplo: tamoxifeno)
- c. Outras substâncias com actividade antiestrogénica (exemplo: clomifeno)

Diuréticos e outros agentes mascarantes – a eliminação de líquidos provocada pelo consumo de diuréticos pode favorecer a eliminação de outro agente dopante consumido e pode provocar uma perda de peso artificial proibida nos desportos de combate por categorias

exemplos: furosemida, clorotiazida

Estimulantes – exemplos: anfetaminas, efedrinas, cocaína

Narcóticos – exemplos: heroína, morfina, metadona

Canabinóides – exemplos: haxixe, marijuana

Glucocorticosteróides – actuam numa ampla gama de mecanismos fisiológicos: regulam o sistema imunitário, o metabolismo dos hidratos de carbono, catabolismo de proteínas e as inflamações

exemplo: estradiol

} proibidos em competição

Substâncias proibidas em determinados desportos:

Beta bloqueantes – reduzem a frequência cardíaca e intensidade do batimento cardíaco diminuindo tremores

proibidos em: tiro com arco, ginástica, automobilismo, (...)

Álcool – proibido em: aviação, tiro com arco, automobilismo, karate, pentatlo moderno, motociclismo, motonáutica, (...)

Métodos proibidos

1. Incremento do transporte de oxigénio: a) dopagem sanguínea; b) aumento artificial de captação, transporte ou libertação de oxigénio
2. Manipulação química e física - tentativa de ou adulteração das amostras recolhidas nos controlos
3. Dopagem genética

AMA – Agência Mundial Antidopagem (WADA)

(Adaptado de http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2009_Prohibited_List.pdf)

honestidade, do respeito pelas regras e pelos outros. O recurso ao *doping* contraria a essência do “jogo limpo”. As substâncias incluídas na lista do Comité Olímpico Internacional (COI) de produtos proibidos promovem um incremento no desempenho e *performance*, mas acarretam riscos para a saúde e, possivelmente, para a própria vida dos atletas. Atletas que eles próprios, devem ser modelos e exemplos para os mais jovens, pois são os ídolos de gerações e influenciam hábitos, modos de vida e formas de ser e estar.

O abuso da mais recente biotecnologia derruba as noções cristalizadas e cria a necessidade de definição, constantemente trabalhada e aceite, da palavra *doping*.

A lista de substâncias dopantes pode ela própria estimular a utilização do *doping*, ao ser considerada como uma lista de compras para atletas e treinadores. Considerar a vitória como o único objectivo que vale a pena na competição desportiva é uma filosofia que, ao ser aceite, facilita e permite justificar ou acreditar que devemos ganhar a todo e qualquer custo, neste momento o *doping* torna-se um comportamento muito racional, com o fim (ganhar) a justificar os meios (uso de produtos ilícitos).

Até ao presente, a batalha face ao *doping* tem sido perdida. Consequentemente, se usarmos o passado para prever o futuro do uso de substâncias ilegais no desporto, somos compelidos a não ser optimistas. O número de novas drogas cresce a uma taxa assustadora e bem para lá da resposta efectiva dada pelos laboratórios de análise/deteção e teste.

Se uma audiência em qualquer parte do mundo fosse questionada, sobre a sua posição relativamente ao *doping*, se estão contra, em resposta todos seríamos virtualmente unânimes “Sim”. No entanto, e se a questão fosse “Incomoda-o tanto, ao ponto de desligar a televisão e não ver eventos desportivos?”

3 – A utilização de EPO e substâncias afins no exercício aeróbio

A realização de uma tarefa motora de longa duração, como uma prova de triatlo, ciclismo, maratona ou *ski* de fundo, depende, entre outros aspectos, da capacidade do executante em processar energia a partir do metabolismo aeróbio, um volume maior e uma intensidade proporcionalmente menor. A energia requerida é proveniente da oxidação de substratos energéticos: hidratos de carbono, ácidos gordos ou aminoácidos.

Centesimais diferenças entre os melhores atletas incendeiam a luta de preparadores, dirigentes, coordenadores, na busca do elemento diferencial e que, por vezes, esbarra na utilização de recursos ergogénicos. Entre eles, ressalta a utilização de EPO (Diamant-Kandarakis, 2005; Scott e Phillips, 2005). O aumento da capacidade fisiológica de metabolização de substratos para produção de energia é uma das principais vertentes em que são implantados adjuvantes para o incremento da *performance*, sobretudo em provas de longa duração.

A capacidade aeróbia ou resistência aeróbia é uma forma de solicitação motora envolvida em uma gama muito grande de acções desportivas, desde aquelas em que aparece como base sólida e fomentadora até aquelas em que apresenta importância relativamente menor, em exercícios anaeróbios, das modalidades de futebol, andebol, basquetebol, uma vez que a reestruturação do ATP consumido durante o metabolismo anaeróbio é re-sintetizado durante períodos de predominância aeróbia.

O metabolismo aeróbio tem por base o catabolismo de hidratos de carbono (glicose), lípidos, na forma de ácidos gordos que são envolvidos na formação de acetil-CoA, sendo esta o maior substrato para o ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos dentro da mitocôndria. As proteínas (aminoácidos de origem cetónica ou glicogénica) são também uma fonte energética mas proporcionalmente bastante menor, podendo abastecer cerca de 5% do total da demanda energética (Maughan e col., 2000).

O ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos tem como principal função degradar a acetil-CoA em dióxido de carbono e átomos de hidrogénio que serão transportados para serem aproveitados na fosforilação oxidativa (NAD^+ e FAD). Durante os processos da cadeia de transporte de electrões, a passagem de electrões dos hidrogénios para o oxigénio molecular gera energia química, que é armazenada na forma de fosfatos de alta energia. Não havendo oxigénio suficiente para a manutenção da fosforilação oxidativa, esta parte do ciclo de regeneração de ATP, a partir de FAD e NAD^+ , fica bloqueada. Assim, podemos afirmar que a produção de energia, baseada no metabolismo aeróbio, está intimamente associada à quantidade de oxigénio fornecida aos músculos.

Uma função primária da hemoglobina, que reside dentro dos eritrócitos, é ligar-se ao oxigénio em condições de elevada concentração de O_2 (nos pulmões), desenvolver o seu transporte e libertá-lo nos tecidos onde o O_2 está a ser consumido (por exemplo, músculos e cérebro). Os eritrócitos são as células mais abundantes, representando aproximadamente 40-45% do volume sanguíneo total e 99% de todas as células circulantes. A hemoglobina constitui 99% da proteína citosólica em eritrócitos plenamente desenvolvidos. Esta grande quantidade de hemoglobina é consistente com a exigência de uma capacidade de transporte abundante que preencha um consumo considerável de oxigénio nos tecidos, dispêndio que aumenta dramaticamente com a prática de exercício físico aeróbio.

Sabe-se que existe uma relação directa entre níveis de hemoglobina e melhoria do desempenho desportivo (Ekblom, 1996). Em ratos submetidos a exercício, níveis aumentados de hemoglobina resultaram numa maior entrega de O_2 ao cérebro e aumento dos ácidos gordos e glicogénio musculares com reduzida acumulação de lactato (Lavoie e col., 1998). Um incremento entre 5-10% foi estimado em humanos (Birkeland e col., 2000; Wilber, 2002) devido ao aumento da capacidade máxima de

transporte e utilização de O_2 (VO_{2max}), velocidade a VO_{2max} e poder aeróbico máximo (Ekblom, 1996; Ashenden e col., 2001). Cada um dos ganhos pode ser directamente traduzível em reduções no tempo de execução das provas (Levine e col., 1997).

Vários produtos ou métodos ilegais que promovem uma melhoria na entrega de oxigénio aos tecidos são procurados e usados de forma abusiva (Fig. 9). A relação benefício/risco inerente a cada produto ou método difere, assim como diferem os métodos de detecção e as estratégias para evitar a detecção. Existem produtos que aumentam directamente o transporte de oxigénio (transfusões com sangue rico em eritrócitos ou administração de transportadores não naturais de oxigénio), administração de agentes estimuladores da eritropoiese que aumentam os níveis de eritrócitos (por exemplo: rhEPO ou terapia génica com genes da EPO), hipóxia ou substâncias que mimetizam hipóxia desencadeando o estímulo para produção de EPO endógena, e substâncias que alteram a afinidade do O_2 pela hemoglobina, logo disponibilizando mais oxigénio para os músculos e tecidos onde o suprimento é mais necessário.

A hipóxia é uma condição de reduzida concentração de oxigénio no ar respirado ou no sangue. A resposta natural a uma situação de hipóxia (que pode acontecer durante execução de exercício aeróbio ou por variação na altitude) é a síntese de EPO endógena, que, por sua vez, estimula a eritropoiese. Portanto, esforços no sentido de estimular a capacidade transportadora de oxigénio através da exposição a tensões de O_2 reduzidas foram cultivados. O benefício fisiológico associado ao treino em altitude para aumentar os níveis de hemoglobina é restringido pela reduzida capacidade de treinar vigorosamente devido à baixa tensão de O_2 a alturas elevadas.

O mecanismo pelo qual a hipóxia dirige e altera o metabolismo da EPO endógena é agora parcialmente conhecido. O factor induzido pela hipóxia (FIH) é um heterodímero constituído por duas subunidades (α e β) e é uma proteína reguladora da expressão do gene EPO. Uma enzima dependente de O_2 (FIH-prolil hidroxilase) desencadeia a hidroxilação do FIH em resíduos de prolinas específicos envolvidos na degradação de O_2 (Bruick e col., 2001; Epstein e col., 2001; Ivan e col., 2001; Masson e col., 2001). FIH hidroxilado é ubiquinado por uma ligase formando um complexo com a proteína Hippiel-Lindau, que sinaliza o FIH para degradação pelo proteossoma (Hon e col., 2002). As elevadas tensões de O_2 , os níveis do FIH são reduzidos e a síntese de

EPO endógena é interrompida. A baixas tensões de O₂, o FIH, que é formado constitutivamente, vai-se acumulando devido à reduzida actividade da enzima FIH-prolil hidroxilase, originando uma síntese de EPO endógena aumentada.

Compostos que actuam como simuladores de hipóxia e, portanto, estimulam a síntese de EPO endógena podem ter utilidade no tratamento de anemia. Vários têm sido considerados, incluindo a desferroxiamina e o cobalto.

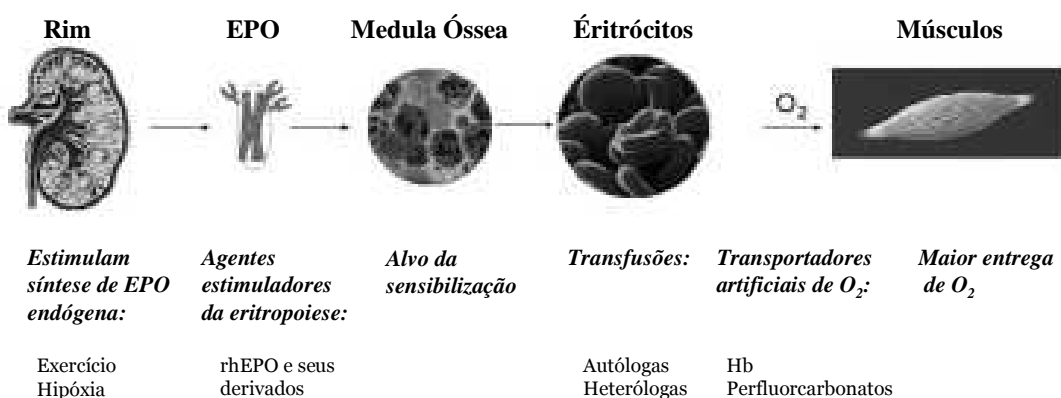


Fig. 9 – Métodos que promovem o transporte de oxigênio. (Adaptado de Elliott, 2008)

Transfusões de sangue carregadas com eritrócitos têm sido usadas para tratar doentes com anemia ou para substituir a perda de glóbulos vermelhos durante cirurgias ou por acidentes. Transfusões podem ser autólogas (doação de sangue pela e re-infusão na mesma pessoa) ou homólogas (infusão do sangue de outra pessoa). A primeira opção é mais segura (não há risco dos tipos de sangue serem desiguais e despoletar reacções imunitárias). Para ambas, eritrócitos danificados podem descarregar hemoglobina livre configurando alterações súbitas na pressão sanguínea. Ferro livre e hemoglobina podem produzir espécies reactivas de O₂ que conseguem catalizar oxidação lipídica, promovendo aterosclerose e maior dano oxidativo para os tecidos cardiovasculares e outros órgãos. Transfusões repetidas de eritrócitos podem levar a uma sobrecarga de ferro e suscitar complicações sérias, como disfunções/anomalias nos neutrófilos, na resposta das células T e funcionamento dos macrófagos e complicações ainda mais graves relacionadas com a deposição de ferro no coração, fígado, pâncreas e outros órgãos essenciais. Elevadas concentrações de ferro podem inflacionar a susceptibilidade

a infecções e accionar a virulência de algumas bactérias patogénicas (Kletzmayer e col., 2002; Puntarulo, 2005; Bullen e col., 2006; McCullough e col., 2007).

Transportadores artificiais de O₂ como os transportadores de oxigénio à base de hemoglobina e os perfluorcarbonatos podem ligar e entregar O₂ aos tecidos. Estes agentes foram desenvolvidos, como substitutos do sangue, para melhorar a entrega de O₂ a doentes com perda de sangue aguda ou com carência urgente de oxigénio; por exemplo, numa operação cardíaca (Schubert, 2001). Em solução, o tetrâmero de hemoglobina expeditamente se dissocia em monómeros e dímeros que são rapidamente eliminados pelos rins. *Cross-linking* da hemoglobina pode prevenir o desagregar dos tetrâmeros em dímeros, o que se pensa poder diminuir a nefrotoxicidade. A reduzida semi-vida destas moléculas indica que têm de ser administradas no tempo apropriado/adequado à necessidade para auferir benefícios.

Os perfluorcarbonatos são transportadores de O₂ (Gaudard e col., 2003; Lippi e col., 2006) úteis porque as emulsões destas moléculas dissolvem grandes concentrações de O₂ que podem ser extraídas por tecidos depletos de oxigénio. No entanto, ao contrário da hemoglobina que tem uma relação sigmoideal entre pO₂ e ligação ao O₂, os perfluorcarbonatos possuem uma relação linear. Logo, a uma dada pressão parcial de O₂, a hemoglobina liga bem mais O₂ do que pode ser dissolvido nos perfluorcarbonatos.

4 – Efeitos adversos da utilização de EPO

A clonagem bem sucedida do gene da EPO permitiu a célere execução de ensaios clínicos e a utilização do primeiro agente estimulador da eritropoiese, a Epoetina alfa. O uso clínico da Epoetina alfa em humanos deu-se em 1988 na Europa e em 1989 nos Estados Unidos da América. Os benefícios para a *performance* desportiva da rhEPO foram afamados e o seu uso ilegítimo por atletas teve início.

Casos fatais vinculados à prática de dopagem ocorreram no início dos anos 90 quando ciclistas profissionais holandeses, em competição na Europa, morreram durante o repouso por falha cardíaca inexplicável, tendo alguns falecido durante o próprio sono (River e Saugy, 2003; Cazzola, 2002). Esses desportistas estão entre os mais de 20 casos de mortes de ciclistas na Europa relatados entre os anos de 1987 e 1991,

coincidindo com o início da disponibilidade de rhEPO neste continente (Gareau e col., 1996).

Evidências da utilização de rhEPO advieram após controlo hematológico efectuado a ciclistas profissionais na Itália, acusando sobrecarga na concentração plasmática de ferro, só comparável com doentes com hemocromatose genética. Os níveis de ferritina (proteína associada à quantidade e ferro armazenada no corpo) nesses ciclistas mostraram-se anormalmente elevados, demonstrando claramente a administração de ferro intravenoso e de rhEPO (Adamson, 1996; Cazzola, 2002).

Recentemente, vários ciclistas, entre eles, Erik Zabel, o seu companheiro de equipa Rolf Aldag e o vencedor Bjarne Riis, admitiram o recurso ao *doping* com rhEPO no *Tour* de 1996.

De modo a evitar o uso de rhEPO com a finalidade do aumento do desempenho desportivo, foram lançados programas educativos sobre os riscos dos efeitos colaterais potenciais, mostrando-se que as doses administradas em pacientes para elevar o valor do hematócrito não podem ser extrapoladas para pessoas saudáveis, além do que, mesmo após a interrupção da administração, o efeito da hormona sobre a medula óssea poderia continuar por mais alguns dias e o hematócrito tenderia a aumentar até atingir níveis perigosos (Adamson, 1991). A desidratação, frequente durante e após o esforço físico intenso de uma competição, aliada à hemoconcentração, poderia acarretar risco iminente à saúde, por aumento da viscosidade sanguínea e redução do débito cardíaco (Gauthier, 2001), levando a quadros de hipertensão e possíveis eventos trombóticos (Guezennec, 2001; Clyne e col., 2005).

Embora a utilização de rhEPO na terapêutica se tenha mostrado relativamente segura quando medicamente assistida, casos de aplasia eritrocitária em pacientes sob o uso de rhEPO são reportados, embora com baixa incidência. Observa-se o desenvolvimento de anticorpos anti-EPO que neutralizam tanto a rhEPO quanto a sua forma endógena, produzindo a referida doença. Entretanto, a melhora significativa da qualidade de vida e/ou prolongamento da sobrevida, associados à prevalência reduzida da doença nesses pacientes, compensam o risco da prescrição de tal medicamento para fins terapêuticos. Contudo, em casos de dopagem, em que os atletas saudáveis não necessitam de qualquer tratamento, o seu uso é inadmissível, e o risco de

desenvolvimento da doença torna-se potencial, podendo levar à dependência de transfusões de sangue contínuas para o resto da vida (Cazzola, 2002).

Em 1998, a descoberta de ampolas de rhEPO em várias equipas participantes do "Tour de France" talvez seja o facto mais marcante e divulgado em relação aos casos desportivos de dopagem com rhEPO (Zorpette, 2000). Nessa ocasião, foram encontradas caixas com várias ampolas do fármaco em veículos das principais equipas, e até mesmo no alojamento dos competidores, configurando o uso endémico da hormona entre ciclistas de elite. Durante os 21 dias da competição, apreensões da substância, inquéritos e prisões fizeram parte daquela corrida, sendo apelidada de "Tour de Farce" pelos jornalistas franceses.

Alguns atletas, após complicações de saúde decorrentes do uso ilícito de rhEPO, admitiram a utilização da hormona. Tal facto é mencionado no caso de um ciclista que apresentava sintomas de fortes dores de cabeça, náuseas, vômitos e fotofobia iniciados dois meses antes de uma competição, o que levou ao diagnóstico de quadro de hipertensão idiopática intracraniana, não responsiva a tratamento padrão. Exames médicos e laboratoriais sugeriram o uso de rhEPO, circunstância confirmada pelo atleta quando questionado (Lage e col., 2002). Após o desenvolvimento de um teste directo para a detecção de rhEPO, algumas amostras de urina do *Tour* de 1998 foram noticiadas positivas para esta substância, subsequentemente, Jascke reconheceu o seu uso quando terminou em décimo oitavo lugar na competição.

Actualmente, o ciclismo tem sido importunado por escândalos de *doping* associados à *Operación Puerto* onde sacos de sangue plasmático com elevados níveis de rhEPO foram encontrados, redundando na exclusão de corredores nos *Tour de France* de 2006 e de 2007. Inclusivamente, foi anunciado que Iban Mayo testou positivo para rhEPO durante o *Tour* de 2007.

Uma análise aos níveis de hemoglobina dos atletas que competiram nos campeonatos mundiais de *cross-country ski* no ano de 2001, comparativamente aos do ano de 1989, desvendou um incremento anormal dos níveis de hemoglobina e reticulócitos nos melhores concorrentes (Stray-Gundersen, 2003).

Três esquiadores foram desqualificados durante os Jogos Olímpicos de Inverno de 2002 quando darbepoetina alfa foi detectada nas suas amostras de urina. Darbepoetina

alfa é obtida através de uma glicosilação análoga à da rhEPO com maior semi-vida de circulação (Elliott e col., 2003).

Notícias de *doping* com rhEPO, no mundo das corridas de cães e cavalos para coadjuvar as suas prestações, foram relatadas. Isto ocorreu apesar de informações apontarem para o inusitado perigo do *doping* com esta substância, para os animais devido à elevada probabilidade de desenvolverem aplasia eritrocitária pura mediada por anticorpos (Cowgill e col., 1998).

Podemos assim afirmar que entre os efeitos mais nefastos do *doping* com rhEPO, se encontra o desenvolvimento ou deterioração da hipertensão arterial e o risco aumentado, por eritrocitose, de ter um enfarte do miocárdio ou paragem cardíaca. Recentemente, estudos experimentais sobre os efeitos de eritrocitose crónica nas funções cardiovasculares de ratinhos transgénicos para a EPO, evidenciaram que comparativamente à estirpe selvagem (hematócrito = 0,47), os animais transgénicos (hematócrito = 0,80) desenvolveram hipertrofia ventricular esquerda e direita e edema cardíaco. Também viram a sua expectativa de vida diminuída em grande escala (Jelkmann e col., 2002).

Os maiores riscos da eritrocitose com hematócritos (> 0,55) incluem falência cardíaca, enfarte do miocárdio, tonturas, eventos tromboembólicos periféricos e embolismo pulmonar.

As suspeitas de associação de rhEPO com o aumento do risco cardiovascular (e mesmo mortes de atletas sem justificação aparente) não estão ainda totalmente esclarecidas em termos de efeitos e mecanismos bioquímicos subjacentes à EPO.

Parte II – *Objetivos*

A eritropoiese compensa a destruição permanente pelos macrófagos, na medula óssea, baço e fígado dos glóbulos vermelhos envelhecidos. O aumento basal da produção de glóbulos vermelhos é mediado pela hormona eritropoietina (EPO), cuja insuficiência pode derivar em anemia. Pacientes anémicos sofrem de fadiga, dificuldade em respirar (dispneia) e taquicardia. Casos severos podem requerer transfusão de eritrócitos a partir de dadores de sangue. A terapia de transfusão com componentes sanguíneos alogénicos pode causar reacções imunológicas e infecções. Adicionalmente, transfusões repetidas podem originar sobrecarga de ferro. Portanto, o desenvolvimento da eritropoietina recombinante humana (rhEPO) como um fármaco anti-anémico foi visto como um dos mais importantes progressos na medicina interna, nomeadamente para correcção da anemia secundária à insuficiência renal crónica ou resultante da destruição de eritrócitos originada pelos tratamentos de quimioterapia em doentes com neoplasias. Infelizmente, tem de se lamentar que (pelo menos na Europa) para o cidadão comum a rhEPO seja conhecida primariamente como uma droga fomentadora de melhor *performance* desportiva, utilizada como *doping* em desportos de *endurance*.

Desde o surgimento da rhEPO como uma droga estimuladora da eritropoiese, tem-lhe sido imputado o abuso por atletas de modalidades de cariz maioritariamente aeróbio. De facto, há a suspeição que a rhEPO e a eritrocitose subjacente provocaram a morte de cerca de 20 ciclistas de classe mundial, muito embora nunca tenha sido provada a sua administração. Quando o hematócrito supera os valores normais (excede 0,50), os efeitos não desejados e perigosos assomam, como a elevação da viscosidade sanguínea e o subsequente ónus cardíaco. Os principais riscos da eritrocitose excessiva incluem falência cardíaca, enfarte do miocárdio, tonturas, eventos tromboembólicos periféricos e embolismo pulmonar. Atletas de *endurance* encontram-se durante a competição sob um risco aumentado, se a viscosidade do seu sangue for ainda maior devido à grande perda de fluidos associada à transpiração. Contudo, as mortes alegadamente motivadas por rhEPO não ocorreram durante o exercício mas em períodos de inactividade física.

A prática de exercício físico provoca uma série de respostas fisiológicas, resultantes de adaptações autonómicas e hemodinâmicas que vão influenciar o sistema cardiovascular. O aconselhamento físico de forma cuidada e rigorosa revela-se útil na maioria das doenças crónicas. Contudo, o exercício físico associado a práticas de

doping pode originar efeitos nefastos, com potencial acréscimo no risco cardiovascular, cujos mecanismos ainda não estão esclarecidos.

A utilização de modelos animais experimentais de exercício físico poderá ser um instrumento de grande utilidade para o estudo do enredo envolvido na administração de rhEPO como *doping*.

Assim, os objectivos gerais deste estudo foram avaliar os efeitos bioquímicos a nível cardiovascular e metabólico consequentes à administração de rhEPO enquanto *doping* em ratos Wistar sujeitos a protocolo de treino crónico e aeróbio de intensidade moderada.

Para tal, foi idealizado um protocolo experimental com os seguintes grupos em estudo: grupo Controlo (Ctrl); grupo tratado com rhEPO (EPO); grupo exercício (Ex) e grupo exercício com administração concomitante de rhEPO (Ex+EPO). Foi estipulado um período experimental de 10 semanas, tendo sido estabelecido um período prévio de adaptação à actividade física de 3 semanas.

No decorrer do trabalho, quer por novas ideias que os dados entretanto obtidos iam gerando, quer por dúvidas na concretização de certos fins, redefiniram-se alguns estudos e estabeleceram-se novos protocolos. Assim, os objectivos específicos deste projecto, bem como as determinações efectuadas para os alcançar, foram no seu conjunto, os seguintes:

1º Estudo – Avaliar os efeitos da rhEPO no exercício crónico (treino)

A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo EPO *versus* grupo controlo)

B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crónico (natação)

Com esse intuito, consideraram-se os seguintes parâmetros:

Medição do peso corporal

Avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca e trofismo tecidual

Determinação de parâmetros hematológicos:

- eritrocitários
- plaquetares
- reticulocitários
- leucocitários

Determinação da concentração sérica de EPO

Avaliação do metabolismo do ferro:

- através das concentrações séricas de ferro, ferritina e transferrina

Apreciação de parâmetros bioquímicos:

- glicemia
- função renal e hepática
- concentração de creatina cinase
- perfil lipídico e relações subjacentes

Consideração da actividade do sistema nervoso simpático:

- concentração de catecolaminas em circulação (plasmáticas e plaquetares)
- concentrações tecidulares de catecolaminas (suprarrenais, rim, aorta, ventrículo esquerdo e cérebro)

Avaliação da actividade do sistema serotoninérgico:

- concentração de 5-HT e 5-HIAA em circulação (plasmáticas e plaquetares)
- concentração de 5-HT e 5-HIAA no tecido neuronal

Determinação de marcadores de inflamação:

- concentrações séricas de: proteína C reactiva (PCR); interleucina 2 (IL-2); interleucina 1 beta (IL-1 β); factor de necrose tumoral alfa (TNF- α); factor de transformação de crescimento beta (TGF- β)

Avaliação de indicadores do equilíbrio oxidativo:

- peroxidação lipídica (formação de MDA) no soro e no músculo
- concentração sérica de 3-nitrotirosina
- capacidade antioxidante total (TAS) em soro e músculo
- relação MDA/TAS no soro e músculo

Estudo histomorfológico de tecidos.

2º Estudo – Estudo comparativo dos efeitos da rhEPO em diferentes formas de exercício agudo (natação *versus* corrida): através da análise dos parâmetros anteriormente mencionados, acrescentando-se os dados relativos à duração da sessão extenuante.

3º Estudo – Estudo comparativo dos efeitos da rhEPO no exercício (natação), crónico *versus* agudo: através dos grupos Ex e EPO+Ex da natação, dos estudos anteriores, elaborou-se este estudo comparativo crónico *versus* agudo.

4º Estudo – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada: através do qual foram avaliados os efeitos da administração de rhEPO sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos, concentração de EPO e metabolismo do ferro.

**Parte III – *Compartimento
Experimental***

Capítulo I – MATERIAL E MÉTODOS

1 – Animais e condições disponibilizadas

1.1 – Características dos animais

Neste estudo foram usados ratos Wistar, machos, com dois meses de idade, com uma média de peso de duzentos e sessenta gramas; provenientes do biotério Charles-River (Barcelona).

1.2 – Acondicionamento

Os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de acordo com todas as normas legais e éticas em vigor em Portugal; colocando-se três ratos por cada gaiola, numa sala com ar climatizado (~22°C), humidade controlada (~60%) e com ciclos de 12h luz/escuro. Tiveram acesso, não restringido, a água destilada e a uma dieta sintética específica (IPM-R20, Letica, Espanha).

1.3 – Protocolos experimentais

Estudo 1 – *Efeito da rhEPO no exercício crónico*

Este trabalho foi desenvolvido seguindo um protocolo experimental previamente elaborado. Após uma fase de acomodação dos animais, estes foram divididos em quatro grupos sujeitos aos seguintes procedimentos (Fig. 10):

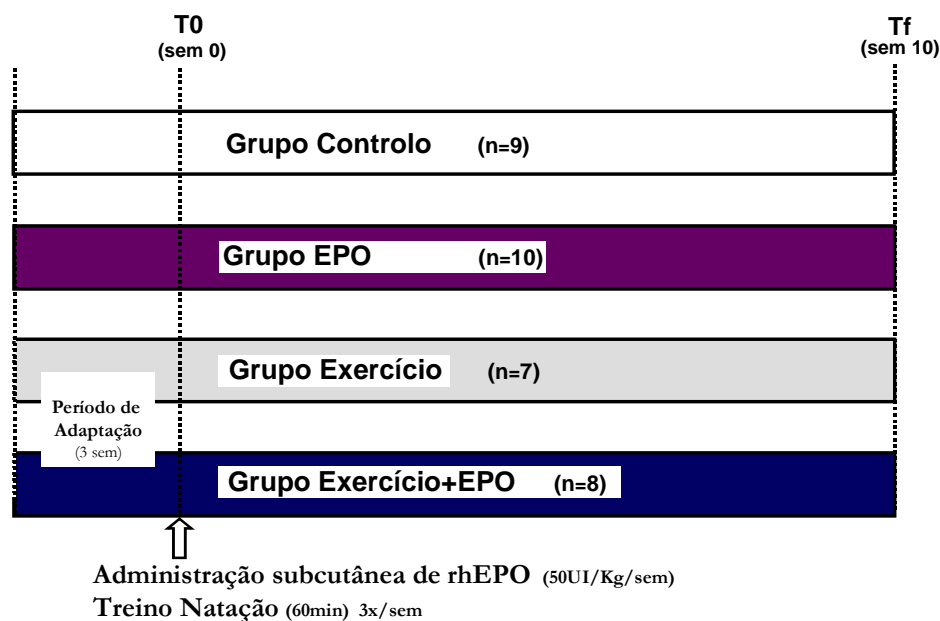


Fig. 10 – Representação esquemática da distribuição dos animais pelos grupos em estudo.

Grupo Controlo (Ctrl)

Constituído por nove ratos que, durante a experiência, não foram sujeitos a qualquer actividade física extra: grupo sedentário.

Grupo tratado com eritropoietina recombinante humana (EPO)

Abrangendo dez ratos aos quais foi administrada por via subcutânea rhEPO tipo beta (Recormon, Roche Pharmaceuticals, Auckland, New Zealand), na dose de 50UI/Kg/sem (3x/sem), durante 10 semanas consecutivas. Estes ratos não foram submetidos a qualquer actividade extra.

Grupo Exercício (Ex)

Formado por sete ratos que foram submetidos a período de adaptação ao meio líquido, instituído para minimizar a ocorrência de stresse em consequência da água e profundidade do tanque, com sessões progressivas de natação por 3 semanas, iniciadas

com 15 minutos, acrescentando-se, a cada dia, 5 minutos, até atingir 60 minutos. Após este período, os ratos foram sujeitos a uma hora de natação contínua (Fig. 11), três vezes por semana, durante dez semanas, num tanque circular de PVC (100 cm de diâmetro), contendo água com 60 cm de profundidade, mantida a temperatura constante: $30 \pm 2^\circ\text{C}$, agitada regularmente.



Fig. 11 – Sessão de natação de um dos grupos exercício.

Grupo Exercício+rhEPO (Ex+EPO)

Contando com oito ratos que cumpriram o plano de actividade física estipulado para o grupo anterior e também as injeções subcutâneas de rhEPO (50UI/Kg/sem), incluídas no tratamento do grupo EPO.

No decorrer da oitava semana de treino, entre os 10-15 minutos iniciais da sessão de natação um rato do grupo Ex+EPO sucumbiu. Na impossibilidade de recolha de sangue, retiraram-se para estudo histológico os rins, pulmões, cérebro, coração e fígado.

Estudo 2 – Efeito da rhEPO no exercício agudo extenuante: comparação de 2 tipos de exercício

Este estudo foi realizado segundo o seguinte protocolo (Fig. 12):

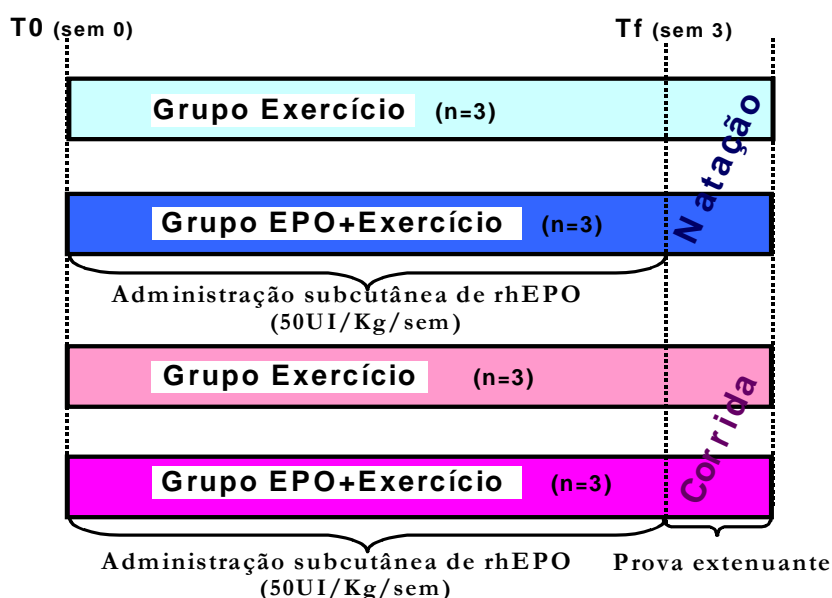


Figura 12 – Representação esquemática da distribuição dos animais pelos grupos em estudo.

Grupo Exercício (Ex) – Natação

Contando com três ratos que, após 2 sessões prévias de adaptação ao meio líquido, cumpriram no tempo final (Tf) uma prova de natação extenuante.

Grupo rhEPO+Exercício (EPO+Ex) – Natação

Considerando três ratos, submetidos à administração subcutânea de rhEPO tipo beta, na dose de 50UI/Kg/sem (3x/sem), durante 3 semanas consecutivas, após as quais (Tf) foram sujeitos a sessão de natação extenuante.

Grupo Exercício (Ex) – Corrida

Abrangendo três ratos que, após 2 sessões prévias de adaptação, cumpriram no tempo final (Tf) uma prova de corrida (em passadeira) extenuante.

Grupo rhEPO+Exercício (EPO+Ex) – Corrida

Incluindo três ratos, submetidos à administração subcutânea de rhEPO tipo beta, na dose de 50UI/Kg/sem (3x/sem), durante 3 semanas consecutivas, após as quais (Tf) foram sujeitos a sessão de corrida (em passadeira) esgotante.

Estudo 3 – *Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada*

Este estudo foi realizado de acordo com o protocolo esquematizado na Fig. 13:

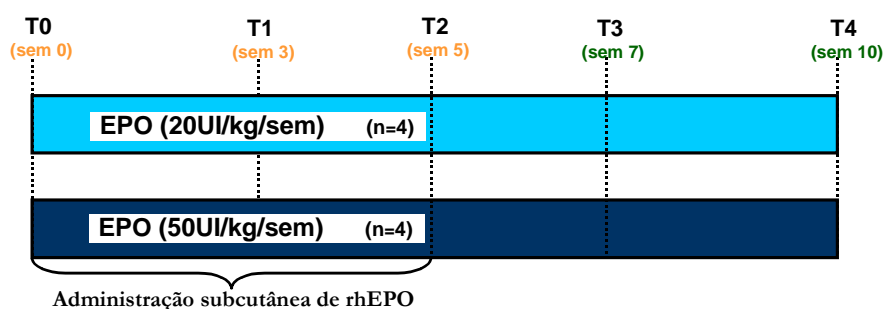


Figura 13 – Representação esquemática da distribuição dos animais pelos grupos em estudo.

Grupo rhEPO (20UI/kg/sem)

Compreendendo quatro ratos sujeitos à aplicação subcutânea de rhEPO tipo beta, na dose de 20UI/Kg/sem (3x/sem), durante 5 semanas consecutivas, com recolha de amostras de sangue nas semanas 0, 3, 5, 7 e 10, que equivalem aos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, respectivamente.

Grupo rhEPO (50UI/kg/sem)

Compreendendo quatro ratos sujeitos à aplicação subcutânea de rhEPO tipo beta, na dose de 50UI/Kg/sem (3x/sem), durante 5 semanas consecutivas, com recolha de amostras de sangue nas semanas 0, 3, 5, 7 e 10, que equivalem aos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, respectivamente.

2 – Monitorização de peso corporal e das pressões arteriais e frequência cardíaca

2.1 – Determinação do peso corporal

Os animais foram pesados numa balança analítica (KERN CB 6 K1, Alemanha) à sua chegada e depois todas as semanas até ao dia do seu sacrifício, no sentido de acompanhar eventuais alterações ao longo do estudo, até por força da actividade física imposta.

2.2 – Medição das pressões arteriais e frequência cardíaca

A medição das pressões arteriais e frequência cardíaca foi efectuada na cauda do rato, onde existe uma artéria com elasticidade semelhante à aorta, pelo método oscilométrico (“tail cuff”), utilizando um esfigmomanómetro (modelo LE 5001 Pressure Meter, Letica, Barcelona, Espanha) e uma gaiola de contenção adequados (Fig. 14). Este aparelho permitiu a medição da frequência cardíaca (FC) e das pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM).



Fig. 14 – Fotografia ilustrativa do procedimento para medição das pressões arteriais.

É de salientar que existem vários factores que podem afectar a correcta recolha dos valores das pressões. Entre eles destaca-se os movimentos dos animais dentro das gaiolas e a instabilidade da pressão que pode conduzir a resultados pouco fiáveis. Para reduzir a influência desses factores, os animais foram colocados nas gaiolas de contenção alguns minutos antes do início das medições, de forma a adaptarem-se a esta, e a ser minimizado o stress a ela associado, tentando que estes se mantenham em quase total imobilização. Provocou-se antecipadamente uma vasodilatação dos vasos periféricos, de modo a facilitar a acuidade da medição, através da exposição da cauda do rato a uma lâmpada (temperatura de $\pm 25-30^{\circ}\text{C}$) durante cerca de 30 minutos. Para além disso, foram realizadas cerca de 10 medições consecutivas, sendo registada a sua média, no sentido de serem rejeitados os valores menos concordantes, resultantes da movimentação do próprio animal, ou de outra perturbação.

3 – Colheita de sangue e recolha de órgãos

3.1 – Anestesia

Quer para efeitos de colheita de sangue quer aquando da recolha de órgãos, os ratos foram anestesiados com 2 ml/kg de uma solução 2:1 (v:v) de 50 mg/ml de cloridrato de cetamina (Ketalar[®]) em clorpromazina a 2,5 % (Largactil[®]).

3.2 – Colheita e preparação das amostras de sangue

O sangue foi obtido da veia jugular dos ratos em seringas de 2 e/ou 5 ml, com agulhas previamente passadas por heparina (B Braun Melsungen AG, Alemanha) (Fig. 15).

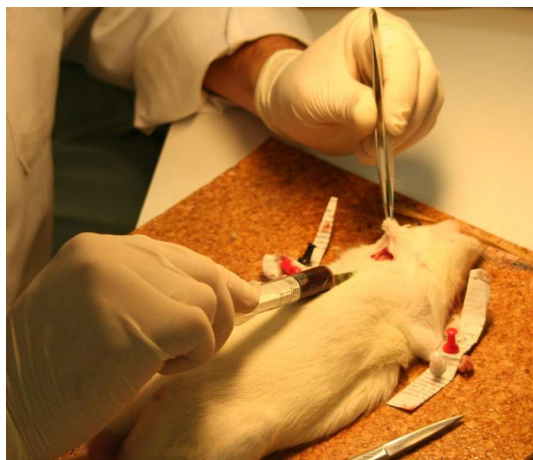


Fig. 15 – Fotografia de um animal anestesiado ao qual se procedia à colheita de sangue da veia jugular.

De cada animal foram recolhidos, em média, entre 9 a 10 ml de sangue que foram distribuídos por diferentes tubos consoante as diferentes determinações analíticas pretendidas:

- i) cerca de 2 ml foram colocados num tubo de hemograma, com K_3EDTA (BD Vacutainer[®], K3E) como anticoagulante, que serviu para dosear os parâmetros hamatológicos.
- ii) entre 4 e 5 ml foram colocados num tubo sem anticoagulante (BD Vacutainer[®]; SST[™] II Advance) para a obtenção de soro, que serviu para fazer o doseamento dos seguintes parâmetros: do perfil bioquímico, inflamatório e oxidativo; concentração de EPO e metabolismo do ferro (ferro, ferritina e transferrina).
- iii) cerca de 3 ml foram direccionados para um tubo contendo 300 μ l de anticoagulante ACD (0,1 ml/ml sangue) constituído por ácido cítrico (71mM), citrato de sódio (85mM) e D-glicose (111mM) para posterior doseamento de Catecolaminas (CAs) por cromatografia líquida de alta resolução (HLPC).

3.3 – Recolha, pesagem e preparação de órgãos

Depois de anestesiados, e efectuada a colheita de sangue de acordo com a metodologia anteriormente mencionada, os animais foram então sacrificados por “overdose” anestésica. Nesta fase, foi efectuada uma incisão xifo-púbica para exposição dos órgãos intra-abdominais. Assim, através da cavidade abdominal procedeu-se à recolha de rim, fígado, coração, aorta torácica, músculo e cérebro.

Os órgãos foram imediatamente colocados numa caixa de Petri contendo uma solução de Krebs-Henseleit (pH=7,4; 4°C) constituída por: NaCl (118mM), KCl (4,8 mM), MgSO₄ (1,2 mM), CaCl₂ (2,5 mM); NAH₂PO₄ (1,2 mM), NaHCO₃ (24 mM), D-glucose (11 mM), ácido ascórbico (0,06 mM) e Na₂EDTA (0,03 mM), enquanto se procedeu à remoção das gorduras adjacentes. Posteriormente, os órgãos foram pesados e divididos em alíquotas que foram processadas segundo o fim ao qual se destinavam: estudo bioquímico e histológico. As alíquotas dos órgãos designadas para o estudo bioquímico foram ultracongeladas mediante a técnica de *freeze-clamping* em azoto líquido e depois conservadas a uma temperatura de –80°C, e as que se remetiam ao estudo histológico foram mantidas em formol tamponado a 10%.

3.4 – Homogeneização de tecidos

Depois de retirados (como atrás descrito), os tecidos foram pesados e colocados num tubo de polipropileno (10 ml) com tampão fosfato salino (gelado), a pH=7,4 (5% peso/volume). De seguida, foram adicionados 10 µl de solução de Butil Hidroxitolueno (BHT) em acetoneitrilo. Foram homogeneizados os tecidos (Heidolph digital, RZR 2000), e posteriormente centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos e a 4°C, sonicados durante 3 minutos e novamente centrifugados, à mesma temperatura, mas desta vez, a 4000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante resultante (homogeneizado de tecido) foi removido para um *eppendorf* e congelado à temperatura de –80°C, para posterior determinação dos parâmetros de perfil oxidativo.

4 – Avaliação dos parâmetros hematológicos

Foram avaliados vários parâmetros hematológicos em todos os grupos em estudo, através de um contador Coulter Counter[®] (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EUA).

Os parâmetros eritrocitários avaliados foram: o número de glóbulos vermelhos (GVs), o hematócrito (HTC), o coeficiente de variação eritrocitária (CVE), a concentração de hemoglobina (Hb), a hemoglobina corpuscular (globular) média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o volume corpuscular médio (VCM).

Ao nível plaquetar, foram apreciados: o número de plaquetas (PLT), o plaquetócrito (PTC), o coeficiente de variação plaquetar (CVP) e o volume plaquetar médio (VPM).

Foram ainda objecto de estudo: a percentagem e o número de reticulócitos (RET% e #, respectivamente) e o número de leucócitos ou glóbulos brancos.

As determinações destes indicadores hematológicos foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC).

5 – Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Procedeu-se à análise de vários parâmetros bioquímicos para a totalidade dos grupos em estudo, a partir de soro, utilizando um analisador automático (Roche Hitachi 717 analyzer, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA).

No âmbito da função renal, foram avaliados: a Ureia, a Creatinina e o Ácido Úrico. Relativamente à função hepática, examinou-se a actividade das enzimas Transaminase Glutâmico-Oxaloacética (TGO) e Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP). Como revelador do funcionamento muscular determinou-se a Creatina Cinase (CK) e do metabolismo da glicose perscrutou-se a Glicemia.

No que diz respeito ao metabolismo lipídico apurou-se a concentração sérica de: Colesterol Total (Total-c), colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) e Triglicerídeos (TGs).

No sentido de realçar as hipotéticas alterações de lipoproteínas e Colesterol total, foram calculados índices específicos que são indicadores daquelas alterações, designadamente: Total-c/HDL-c; LDL-c/Total-c e LDL-c/HDL-c.

6 – Avaliação do metabolismo do ferro

A concentração sérica de Ferro foi quantificada utilizando um método colorimétrico (Ferro, Randox Laboratories Ltd., Irlanda do Norte, Reino Unido), ao passo que as concentrações séricas de Ferritina e Transferrina foram doseadas por imunoturbidimetria (Ferritina e Transferrina, Randox Laboratories Ltd., Irlanda do Norte, Reino Unido). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/dl}$ para o Ferro, em ng/dl para a Ferritina e em mg/dl para a Transferrina.

7 – Determinação da concentração sérica de EPO

A quantificação da concentração sérica de EPO foi realizada a partir de soro, utilizando para o efeito um *kit* comercial (R&D Systems, Minneapolis, USA) e aplicando a técnica quantitativa de ELISA em *sandwich* em fase sólida.

As determinações foram feitas em duplicado, tendo sido utilizados 50 μl de soro de rato, que não necessitou de diluição. A leitura da absorvância foi feita a 450 nm, utilizando como comprimento de onda de correcção o de 550 nm. Os valores de EPO a quantificar foram obtidos a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas (de 6 a 750 pg/ml). Os resultados foram expressos em pg/ml .

8 – Doseamento de Catecolaminas em circulação e em alguns tecidos periféricos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

8.1 – Recolha de sangue e preparação das amostras

Após execução do protocolo de colheita de sangue descrito anteriormente na secção III-3.2, incluindo o passo referenciado na alínea (iii), efectuou-se uma centrifugação do sangue a 900 rpm durante 10 minutos a 15-20°C da qual se retirou o sobrenadante, plasma rico em plaquetas (PRP), que foi centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos a 10°C, obtendo-se plasma pobre em plaquetas (PPP) e um pellet de plaquetas. O pellet de plaquetas foi ressuscitado em 2,1 ml de uma solução tampão contendo 145 mM NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO₄, 1 mM de CaCl₂ e 10 mM de glicose (pH 7,4). Os tubos com PPP e com a suspensão de plaquetas foram congelados a -20°C até ser exequível a purificação e quantificação das catecolaminas em circulação.

8.2 – Recolha de órgãos

Os ratos foram anestesiados com cetamina em clorpromazina, tal como previamente descrito, e sacrificados em seguida. Retiraram-se as glândulas suprarrenais, artéria aorta e o coração, após o que estes órgãos foram mergulhados em caixas de Petri com reagente PBS, almejando-se a maior “limpeza” possível dos mesmos. As duas suprarrenais (direita e esquerda), o ventrículo esquerdo e um pequeno segmento da aorta abdominal foram então isolados, sendo que os ventrículos foram cortados transversalmente, de modo a obter pequenas secções em forma de anel. Após pesagem, os tecidos foram dispostos em tubos de ensaio com ácido perclórico (0,1M), de forma a assegurar uma total cobertura dos fragmentos pelo ácido, a 4°C. Decorridas 24 horas em HClO₄, procedeu-se à recolha dos tecidos, sendo que as catecolaminas (CAs) se encontram agora dispersas no ácido perclórico. Posteriormente, centrifugou-se a solução

contendo as CAs a 2500 g por 15 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi então filtrado por filtros apropriados (Spin-X.HPLC, Costar, Corning Inc. NY, USA) e o filtrado usado para a quantificação de catecolaminas.

8.3 – Doseamento de Catecolaminas (CAs)

A – Extração de catecolaminas (CAs)

As catecolaminas em PPP e em plaquetas foram extraídas recorrendo à alumina. Para tal, adicionaram-se às amostras de PPP já descongeladas as soluções indicadas, na Tabela 2.

Tabela 2 – Preparação das amostras para extração das CAs plasmáticas com alumina

Em vials de 5 ml colocou-se:	
Amostras	Padrões
- 2 ml de PPP	- 2 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7)
- 25 µl DHBA 100 ng/ml (padrão interno)	- 25 µl DHBA 100 ng/ml (padrão interno)
	- 50 µl de cada um dos padrões: NA (75 ng/ml), DA (50 ng/ml) e AD (25ng/ml)
- 50 mg alumina	- 50 mg alumina
- 1 ml de solução Tris-Base 1,5 M (pH 8,6)	- 1 ml de solução Tris-Base 1,5 M (pH 8,6)

Os vials foram agitados no vortex e depois num agitador mecânico a 450 rpm ,durante 5 minutos, para mistura completa da alumina. Após esta depositar completamente no tubo é então retirado o sobrenadante por aspiração, lavando-se de seguida 3 vezes com água especial. Transferiu-se a alumina para um microsistema de filtração (filtros de nylon SpinX; $\phi=22 \mu\text{m}$) com uma pipeta Pasteur, sendo depois centrifugada a 2000 rpm por 1 minuto, para retirar a água. Seguidamente, procedeu-se à substituição da parte inferior do microsistema por um novo, adicionaram-se 200 µl de HClO₄ 0,1M e, após vortex, deixou-se repousar durante 5 minutos. Passado este tempo, e após novo vortex, centrifugou-se novamente a 3000 rpm durante 1 minuto e recolheu-se o extracto ácido que contém as catecolaminas para injectar no HPLC.

A preparação das amostras para a determinação das catecolaminas plaquetares (Tabela 2) foi realizada de modo semelhante ao utilizado para as catecolaminas no plasma, descrito atrás, sendo neste caso utilizado 1 ml de suspensão de plaquetas.

Procedeu-se à quantificação da NA, AD e DA nas glândulas suprarrenais e da NA e AD na aorta abdominal e ventrículo esquerdo. A quantificação de metabolitos da NA, AD e DA nos tecidos periféricos seria igualmente relevante. Contudo, quer pela impossibilidade de os extrair e isolar com as condições cromatográficas usadas, quer pela sobreposição com outros tempos de retenção, não havia fiabilidade na sua quantificação, não sendo por isso avaliados nesta fase do estudo.

O cálculo das concentrações de catecolaminas presentes em cada amostra foi efectuado a partir dos respectivos padrões. Os valores foram expressos em $\mu\text{g/g}$ tecido para as amostras de suprarrenais e em ng/g tecido para as amostras de ventrículo esquerdo e de aorta abdominal.

B – Condições cromatográficas para o doseamento de catecolaminas

A técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é uma técnica analítica amplamente utilizada na investigação científica, visto apresentar uma elevada especificidade e sensibilidade para diversas substâncias. Tem por base uma fase móvel líquida para separar os componentes de uma mistura que são forçados a passar, sob elevada pressão, através de uma coluna cromatográfica. Esta possui no seu interior uma matriz sólida, designada por fase estacionária, com a qual os componentes da mistura vão estabelecer interações (nestes casos interações de carácter hidrofóbico). A eficiência na separação dos componentes (resolução) depende da extensão das suas interações com as fases móvel e estacionária. Quanto mais extensas forem as interações de um componente com a fase estacionária, maior será o seu tempo de retenção no interior da coluna.

O sistema de HPLC é constituído por uma bomba, um injector de amostras, que neste caso funciona de forma automática, uma coluna de cromatografia, um detector e um sistema informático que permite guardar e processar os dados obtidos.

O processo cromatográfico é iniciado com a injeção da amostra no topo da coluna e a separação dos seus componentes ocorre à medida que estes vão avançando ao longo da coluna. Quando cada um dos componentes separados sai pelo fundo da coluna e passa no detector (electroquímico), este assinala a sua passagem registando no ecrã do computador uma banda (ou pico) cujo tamanho é proporcional à sua concentração na amostra. O conjunto dos picos é apresentado na forma de gráfico que se designa de cromatograma.

Neste trabalho utilizou-se um sistema Gilson de **HPLC com detecção electroquímica**, de acordo com as condições previamente descritas (Morgadinho e col., 1989; Reis e col., 2000). Este aparelho é constituído por uma bomba modelo 305 (fluxo de perfusão ajustado a 1 ml/min.); uma válvula de injeção automática modelo 231, com um *loop* de 50 µl; um detector electroquímico “Gilson”, modelo 141, provido de um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo, e um eléctrodo de referência Ag/AgCl, a um potencial de 650 mV (sensibilidade ajustada a 2 nA/V).

A separação das CAs foi levada a cabo usando uma coluna de fase reversa C18 Biophase ODS (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, E.U.A.) de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, com 5 µm de diâmetro das partículas.

A fase móvel era constituída por uma solução tampão (pH 3,7) de acetato de sódio (0,1 M) e de ácido cítrico (0,1 M), contendo 10 % (v/v) de metanol, SDS (0,5 mM), EDTA-Na₂ (0,15 mM) e dibutilamina (1 mM). Previamente à sua utilização, foi filtrada através de um filtro (ø 0,2 µm/50 mm, Schleicher e Schuell, Dassel, Alemanha) num sistema de vácuo, sob agitação.

O registo dos cromatogramas e integração dos picos foi efectuado por computador utilizando o software apropriado (Gilson 712 HPLC Controller 1.30, Gilson Medical Electronics Inc., Villiers-Le-Bel, France).

C – Quantificação das catecolaminas presentes nas amostras

O cálculo das concentrações de CAs presentes em cada amostra foi efectuado a partir dos respectivos padrões, tendo como referência o padrão interno de DHBA, segundo a fórmula:

$$[\text{CA}]_{\text{amostra}} = \frac{\left[\frac{\text{ÁreaCA}}{\text{ÁreaDHBA}} \right]_{\text{amostra}}}{\left[\frac{\text{ÁreaCA}}{\text{ÁreaDHBA}} \right]_{\text{padrão}}} \times [\text{CA}]_{\text{padrão}} : \text{FC}$$

Sendo que: $[\text{CA}]_{\text{amostra}}$ → Concentração da catecolamina a determinar;

$[\text{CA}]_{\text{padrão}}$ → Concentração da catecolamina no padrão;

áreaCA → Área da catecolamina no registo;

áreaDHBA → Área do padrão interno do registo;

FC → Factor de concentração

D – Reagentes

Os solventes utilizados para a quantificação cromatográfica das catecolaminas possuem um alto grau de pureza, tal como requerido para a análise cromatográfica (Lichrosolv da Merck, Darmstadt, Alemanha), enquanto que para a preparação das amostras é requerido um grau de pureza analítico (proanálise da Merck, Darmstadt, Alemanha). A água utilizada para estes estudos foi tridestilada, sendo a última destilação feita na presença de permanganato de potássio (4 g/l). A alumina foi proveniente da Bioanalytical Systems Inc. (West Lafayette, ID, EUA). As soluções padrão de noradrenalina, adrenalina, dopamina e DHBA foram preparadas em ácido perclórico (0,1 M) e mantidas a 4°C. Estes e os restantes reagentes foram obtidos na Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA).

9 – Doseamento de serotonina (5-HT) e de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no plasma e nas plaquetas

9.1 – Colheita de sangue e preparação das amostras

Realizou-se o protocolo descrito nas secções III-3.2, incluído o procedimento mencionado na alínea (iii) e 8.1, para determinação de 5-HT e 5-HIAA plaquetares e plasmáticas.

Oportunamente, retiraram-se 500 µl de suspensão plaquetar à qual se adicionaram 5 µl de ácido ascórbico 10^{-3} M, para impedir a degradação metabólica, e 120 µl de HClO₄ 70%, para desproteíntizar e libertar o conteúdo plaquetar de 5-HT; agitou-se no vortex e depois colocou-se em gelo durante 15 minutos, para posteriormente ocorrer uma centrifugação a 3500 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante para injeção no HPLC.

No que concerne à determinação plasmática, retirou-se 1 ml de PPP ao qual se adicionou 20 µl de solução de ácido ascórbico 10^{-3} M e 1 ml de solução HClO₄ 0,8 M, agitou-se no vortex e colocou-se a 4°C durante a noite. O passo seguinte foi colocar o tubo na centrífuga, a 4000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. Aproveitou-se o sobrenadante para injeção e posterior quantificação de 5-HT e de 5-HIAA.

9.2 – Condições cromatográficas para doseamento de 5-HT e 5-HIAA

Foram aplicadas as condições cromatográficas já descritas na secção III-8.3-C, para as catecolaminas.

9.3 – Quantificação das concentrações de 5-HT e 5-HIAA das amostras

As concentrações de 5-HT e 5-HIAA presentes nas amostras foram calculadas tendo como referência uma solução padrão de creatinina-sulfato de serotonina de concentração conhecida (10 ng/ml) e uma solução padrão de ácido 5-hidroxiindolacético

de concentração 50 ng/ml. Ambos os padrões foram preparados com ácido perclórico 1 M e guardados a 4°C.

10 – Doseamento do conteúdo cerebral de CAs, de 5-HT e 5-HIAA

10.1 – Protocolo para obtenção de CAs, de 5-HT e 5-HIAA cerebrais

Os ratos foram anestesiados com cetamina em clorpromazina, tal como previamente descrito, e sacrificados em seguida. Para a remoção do cérebro procedeu-se à decapitação do animal, o hemisfério direito foi então isolado, pesado e disposto num tubo de ensaio com ácido perclórico (0,1M), de forma a assegurar uma total cobertura do fragmento pelo ácido, a 4°C, decorridas 24 horas em HClO₄, procedeu-se à homogeneização e ultrasonicação, com posterior centrifugação (5500 g; 7 min), retirou-se 400 µl de sobrenadante, que foi então filtrado por filtros apropriados (Spin-X.HPLC, Costar, Corning Inc. NY, USA), sendo o filtrado usado para a injeção e posterior quantificação de CAs, 5-HT e de 5-HIAA.

10.2 – Condições cromatográficas para doseamento de CAs, de 5-HT e 5-HIAA

Foram aplicadas as condições cromatográficas já descritas na secção III-8.3-C, para as catecolaminas.

10.3 – Quantificação das concentrações de CAs, de 5-HT e 5-HIAA das amostras

O cálculo das concentrações de catecolaminas, serotonina e de ácido 5-hidroindolacético presentes em cada amostra foi efectuado a partir dos respectivos padrões. Os valores foram expressos em µg/g tecido para NA, DA, 5-HT e 5-HIAA, e em ng/g tecido para AD para as amostras de hemisfério direito.

11 – Quantificação de marcadores de inflamação

Foram avaliadas as concentrações séricas do factor de necrose tumoral α (TNF- α), do factor de transformação de crescimento β (TGF- β), da interleucina 1 β (IL-1 β) e da interleucina 2 (IL-2) através de métodos micro ELISA utilizando *kits* comerciais (R&D Systems, Minneapolis, USA). A quantificação da proteína C reactiva de alta sensibilidade (hs-PCR), realizada em soro, foi também efectuada pelo método micro ELISA (Helica Biosystems, Inc. Fullerton, Calif., USA).

11.1 – Fundamento geral do método ELISA em *sandwich*

Este ensaio aplica uma técnica quantitativa de ensaio micro ELISA em *sandwich*. Um anticorpo monoclonal de rato, específico para cada um dos elemento a dosear, revestiu a microplaca. Os padrões, controlos e amostras são pipetados para os poços e a substância a dosear presente no soro liga-se ao anticorpo imobilizado. Após a lavagem das substâncias não ligadas, um conjugado enzimático (conjugado de peroxidase) contendo um anticorpo policlonal anti citocina ou anti PCR de rato é adicionado aos poços. Depois de uma lavagem destinada a remover qualquer conjugado em excesso, é adicionada uma solução contendo um substrato da enzima presente no conjugado. A reacção enzimática origina um produto azul que passa a amarelo quando a solução de paragem (HCl) é acrescentada aos poços. A intensidade da cor medida a 450 nm num leitor de microplacas (LP400, Diagnostics Pasteur) é proporcional à quantidade de substância a dosear presente nas amostras. Os valores de citocinas e PCR presente nas amostras são lidos a partir de uma curva de calibração elaborada para esse efeito.

11.2 – Proteína C reactiva de alta sensibilidade (hs-PCR)

A quantificação da proteína C reactiva de alta sensibilidade (hs-PCR) foi executada a partir de soro, com recurso a um *kit* Helica Biosystems, Inc. (Fullerton, Calif., USA) e à técnica quantitativa de micro ELISA em *sandwich* em fase sólida.

As determinações foram feitas em duplicado, tendo sido usados 50 µl de amostra diluída a 1:1000 de acordo com as indicações do fabricante. A leitura da absorvância foi a 450 nm, utilizando como comprimento de onda de correcção, o de 620 nm. Os resultados foram expressos em µg/ml.

11.3 – Interleucina 2 (IL-2) e interleucina 1β (IL-1β)

Foi através de soro que se procedeu à quantificação das interleucinas IL-2 e IL-1β, aproveitando-se para o efeito um *kit* comercial (R&D Systems, Minneapolis, USA) e a técnica quantitativa de ELISA em *sandwich* em fase sólida, já descrita.

As determinações foram feitas em duplicado, tendo sido utilizados 50 µl de soro dos animais diluído 1:1 em sintonia com as instruções do fabricante. A leitura da absorvância foi a 450 nm, utilizando como comprimento de onda de correcção, o de 550 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml.

11.4 – Factor de necrose tumoral α (TNF-α)

A quantificação do TNF-α foi feita no soro recorrendo-se a um *kit* comercial para a sua determinação (R&D Systems, Minneapolis, USA) e à técnica quantitativa de ELISA em *sandwich* em fase sólida, já descrita.

As determinações foram feitas em duplicado, tendo sido utilizados 50 µl de soro dos animais diluído 1:2 em consonância com as indicações do fabricante. A leitura da absorvância foi a 450 nm, utilizando como comprimento de onda de correcção, o de 550 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml.

11.5 – Factor de transformação de crescimento β (TGF-β)

A quantificação do TGF-β foi feita no soro recorrendo-se a um *kit* comercial para a sua determinação (R&D Systems, Minneapolis, USA) e à técnica quantitativa de ELISA em *sandwich* em fase sólida, já descrita.

As determinações foram feitas em duplicado, tendo sido utilizados 50 µl de soro dos animais diluído 1:40 de acordo com as indicações do fabricante. A leitura da absorvância foi a 450 nm, utilizando como comprimento de onda de correção, o de 550 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml.

12 – Avaliação do equilíbrio oxidativo

12.1 – Doseamento de TBARS (“*Tiobarbituric Acid Reactive Substances*”)

Embora sendo referida como pouco específica, a medição de TBARS (*Tiobarbituric Acid Reactive Substances*) é uma dosagem de utilização generalizada para avaliação da peroxidação lipídica (Esterbauer, 1996; Liu e col., 1997).

O malondialdeído (MDA) é o aldeído mais significativo obtido por decomposição dos peróxidos lipídicos. Este, quando submetido a condições de pH ácido (3,5) e temperatura elevada (100°C), reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) originando um aducto (TBA-MDA) cromogénio (vermelho) que pode ser medido por espectrofotometria (532 nm) ou por fluorimetria (λ de excitação 534 nm e λ de emissão 551 nm). A medição de TBARS foi efectuada tendo como base o método de Estepa e col. (2001), e utilizando 100 µl de soro.

Para quantificação das concentrações de MDA nas amostras é necessária a construção de uma curva de calibração. Da solução comercial de malonaldeído bis (dimetilacetal) fez-se uma solução mãe de concentração 83,5 µmol/l, a partir da qual se prepararam as soluções padrão de concentrações conhecidas (0,10; 0,21; 0,42; 0,83; 1,67; 2,50; 4,17; 8,30 e 16,70 µmol/l) que, em conjunto com um branco, serviram para a obtenção da curva de calibração.

Colocaram-se em tubos de polipropileno de 10 ml, 100 µl de amostra, ou água destilada (para o branco), ou solução padrão (amostras padrão). A cada um desses tubos foram adicionados 100 µl de antioxidante Butil-hidroxitolueno (BHT) dissolvido em etanol; 100 µl de catalizador tricloreto de ferro hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) dissolvido

em água destilada; 1,5 ml de solução tampão HCl-glicina a pH=3,5; e, por fim 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) que funciona como reagente cromogénio. Em seguida, colocaram-se os tubos no escuro durante 60 minutos a uma temperatura de 5°C. Posteriormente, levaram-se a “banho-maria” a 95-100°C, durante 60 minutos, cobrindo-os com esferas de vidro. Após esse tempo, e depois de arrefecidos os tubos num banho de gelo, procedeu-se à extracção com 2,5 ml de uma solução de n-butanol-piridina (15.1 v/v) e 0,5 ml de água destilada.

Centrifugaram-se, de seguida, a 4000 rpm, durante 10 minutos. Foram recolhidos 300 µl do sobrenadante para cada poço da placa de reacção de poliestireno (COSTAR®, 96 well EIA/RIA plate), e lida a absorbância a um comprimento de onda de 532 nm. A concentração sérica dos peróxidos lipídicos (MDA) foi expressa em µM.

12.2 – Quantificação do estado antioxidante total (TAS) pelo método de FRAP (“*Ferric reducing ability of plasma*”)

São conhecidos diversos métodos para quantificar a capacidade antioxidante de amostras biológicas, mas usou-se o método FRAP (“*Ferric reducing ability of plasma*”), o qual depende da redução do complexo férrico de tripiridiltriázina [Fe (III)-TPTZ] a ferroso de tripiridiltriázina [Fe (II)-TPTZ] a pH baixo. O complexo [Fe (II)-TPTZ] apresenta uma cor azul intensa que é quantificada a um comprimento de onda de 593 nm (Benzie e Strain, 1996).

Para quantificação das concentrações de TAS no soro é necessária a construção de uma curva de calibração (realizada em duplicado). Da solução comercial de Trolox, fez-se uma solução mãe de concentração 1750 µM, a partir da qual se prepararam as soluções padrão de concentrações conhecidas (250, 500, 750, 1000, 1250, e 1500 µM) que, em conjunto com um branco, serviram para obtenção da curva de calibração. O branco era constituído apenas por água e reagente FRAP. O reagente de FRAP é constituído por tampão acetato a pH=3,6 (300 mM); por TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) (10 mM) e por FeCl₃.6H₂O (20 mM).

Colocou-se em cada poço da placa de reacção de poliestireno (COSTAR[®], 96 well EIA/RIA plate) 10 µl de amostra, ou solução padrão (amostras padrão) ou água (para o branco). Em seguida, em cada poço adicionaram-se 300 µl de reagente FRAP e 30 µl de água. A placa colocou-se a incubar durante 15 minutos a 37°C, num leitor de placa (BIOTEK[®], Synergy HT) ligado a um computador (Fujitsu, Siemens). Por fim, foi lida a absorvância a um comprimento de onda de 593 nm, e os resultados expressos em µM.

12.3 – Medição da concentração de 3-nitrotirosina (3-NT)

Para quantificação da concentração sérica de 3-nitrotirosina (3-NT) utilizou-se um Kit de imunoensaio enzimático (Hycult biotechnology b.v.) baseado na técnica de ELISA. Este, fundamenta-se no método de Sandwich, segundo o qual a quantidade de 3-NT presente na amostra é ligada ao anticorpo que reveste a placa, por um lado, e ao segundo anticorpo composto por biotina (*tracer*), por outro. Após completa ligação do *tracer* ao conjugado de tetrametilbenzidina-peroxidase, a adição do substrato daquela peroxidase, a tertrametilbenzidina (TMB), promove o desenvolvimento de cor, que é lida espectrofotometricamente a 450 nm. A quantidade de cor é directamente proporcional à 3-NT presente no soro das amostras a quantificar, sendo os valores a quantificar, obtidos a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas (de 4 a 326 nM). Os resultados foram expressos em nM.

14 – Estudo histomorfológico

14.1 – Obtenção das amostras

Foram recolhidos, como descrito anteriormente, os rins, o ventrículo esquerdo, o fígado e a aorta torácica, os quais foram imediatamente fixados em formol tamponado a 10%, de forma a conseguir a máxima preservação do órgão.

14.2 – Protocolo para processamento das amostras para histopatologia

As amostras foram todas processadas seguindo o mesmo protocolo:

- a) Fixação em formol tamponado a 10%, até 24 horas;
- b) Transferência dos tecidos para cassetes histológicas;
- c) Inclusão em parafina (Tabela 3).

O meio de inclusão utilizado (Paraplast) apresentava um ponto de fusão entre os 55-57°C. A inclusão foi realizada de forma automática numa mesa de inclusão de tecidos (Shandon, Histocentre 2) (Anderson e Gordon, 1996).

Tabela 3 – Resumo da técnica de processamento e inclusão em parafina

	Reagente/concentração (%)	Duração
1.	Formol tamponado a 10% I	2 h ¹
2.	Formol tamponado a 10% II	2 h
3.	Álcool etílico 80%	1.30 h
4.	Álcool etílico 96% I	1:30 h
5.	Álcool etílico 96% II	90 seg ²
6.	Álcool etílico 100% I	1:30 h
7.	Álcool etílico 100% II	1:30 h
8.	Xilol I	90 seg
9.	Xilol II	90 seg
10.	Xilol III	90 seg
11.	Paraplast I	1:45 h
12.	Paraplast II	1:45 h

(¹h - hora; ²seg - segundo)

14.3 – Obtenção das secções

Os blocos de parafina (Paraplast) foram cortados num micrótomo rotativo, (Micrótomo tipo Minot, Laica, Modelo RM 2135) onde se aplicaram lâminas descartáveis R35 e S35 (Feather).

Cada bloco de tecido foi seccionado no sentido do eixo longitudinal do órgão, obtendo-se secções seriadas de 4 µm para aplicação das diferentes técnicas. Consecutivamente, os cortes histológicos foram colocados em “banho-maria” a 37°C, com o objectivo de serem estendidos, sendo recolhidos sobre lâminas de vidro desengorduradas previamente revestidas com albumina glicerinada de Mayer – adesivo utilizado nas preparações para processamento de rotina, coradas com H&E.

14.4 – Técnicas histológicas

Para além da coloração de rotina (Hematoxilina-Eosina), foram ainda utilizados métodos específicos de coloração. A aplicação de soluções corantes foi precedida da desparafinação com xilol, seguida de hidratação (com álcool a 100%; álcool a 96% e água, sucessivamente) dos cortes histológicos. Depois de processadas as diversas colorações seguiu-se a desidratação (sucessivamente com água, álcool a 96% e álcool a 100%).

14.4.1 – Hematoxilina-Eosina (H&E)

Nesta coloração de rotina, destinada a avaliar as características básicas estruturais dos vários tecidos, foi utilizada, como solução corante nuclear, a Hematoxilina de Harris (coloração azul do núcleo) e, como corante do citoplasma, a Eosina aquosa (coloração rosa do citoplasma) (Stevens e Wilson, 1996).

A técnica de coloração de H&E encontra-se resumida na seguinte tabela:

Tabela 4 – Resumo da técnica de coloração Hematoxilina-Eosina

	Acção	Duração
1.	Desparafinar em xilol	10 min ¹ (2x) ²
2.	Hidratar em álcoois de graduação decrescente	N.A. ³
3.	Lavar em água corrente	10 min
4.	Hematoxilina Harris	2 min
5.	Lavar em água corrente	10 min
6.	Eosina a 1%	1 min
7.	Desidratar em álcool etílico a 96% e a 100%	5 min (2x)
8.	Clarificar em xilol	5 min (2x)
9.	Montar os cortes histológicos com Entellan	N.A.

(¹min - minuto; ²2x - duas vezes; ³N.A. - não aplicável)

14.4.2 – Método do Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Para demonstração e localização histoquímica dos componentes ricos em glicogénio e hidratos de carbono neutros, constituintes do interstício e normalmente não preservados pelas técnicas histológicas de rotina, foi utilizado o método de MacManus do Ácido Periódico de Schiff (PAS). O material PAS positivo identificou-se pela coloração magenta que adquire por acção do reagente de Schiff. Para a coloração nuclear foi aplicada a Hematoxilina de Meyer (coloração azul do núcleo), (Cook, 1996).

A técnica de MacManus do Ácido Periódico de Schiff (PAS) encontra-se resumida na Tabela 5.

A observação das lâminas com os cortes dos vários tecidos foi efectuada num sistema automatizado de análise de imagem Nikon Eclipse 80i fluo com Camera Digital (DxM1200 F). Os tecidos a analisar foram caracterizados segundo três parâmetros: Número, Tamanho e Morfologia/Forma, fazendo a conjugação do Tamanho e da Forma.

Tabela 5 – Resumo da técnica de coloração PAS

	Acção	Duração
1.	Desparafinar em xilol	10 min ¹ (2x) ²
2.	Hidratar em álcoois de graduação decrescente	N.A. ³
3.	Lavar em água corrente	10 min
4.	Ácido Periódico	5 min
5.	Lavar em água corrente	10 min
6.	Regente de Schiff	15 min
7.	Lavar em água corrente	5 min
8.	Eosina a 1%	1 min
9.	Lavar em água corrente	5 min
10.	Desidratar em álcool etílico a 96% e a 100%	5 min (2x)
11.	Clarificar em xilol	5 min (2x)
12.	Montar os cortes histológicos com Entellan	N.A.

(¹min - minuto; ²2x - duas vezes; ³N.A. - não aplicável)

15 – Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos em média aritmética complementada com o intervalo de variação de valores, em erro padrão da média (e.p.m.). A identificação e avaliação de diferenças entre grupos foi efectuada recorrendo ao teste de Fischer's PLSD (*Protected Least Significant Difference*), através de software apropriado (Statview 4.53, Abacus Concepts Inc., Berkeley, EUA). Os níveis de probabilidade inferiores a 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

Capítulo II – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Tendo em conta a diversidade de estudos realizados e de forma a aumentar a clareza da exposição dos mesmos, considerou-se apropriado apresentar os resultados adoptando a seguinte sequência:

Estudo 1 – Efeitos da rhEPO no exercício crónico (treino):

A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo EPO *versus* grupo controlo);

B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crónico (natação);

Estudo 2 – Efeitos da rhEPO em diferentes formas de exercício agudo (natação *versus* corrida);

Estudo 3 – Efeitos da rhEPO no exercício: crónico *versus* agudo (natação);

Estudo 4 – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma e ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada.

Estudo 1 – Efeitos da rhEPO no exercício crónico (treino)

A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo EPO *versus* grupo controlo)

A.1 – Pressão arterial, frequência cardíaca e trofismo tecidual

As pressões arteriais (sistólica, diastólica e média) do grupo EPO sofreram um acréscimo relativamente às do grupo Ctrl, sendo a frequência cardíaca (FC) idêntica nos 2 grupos (Tabela 6). No que diz respeito aos pesos, verificámos que o coração era significativamente superior ($P < 0,05$) e o ventrículo esquerdo, rim, fígado e músculo eram significativamente inferiores (Tabela 6). As relações de trofismo calculadas reafirmaram as premissas anteriores: hipertrofia cardíaca (mas não ventricular esquerda) e hipotrofia renal.

Tabela 6 – Pressões arteriais, frequências cardíacas e pesos (corporal e tecidulares) nos grupos controle e EPO

	Controle (n=9)	EPO (n=10)
<i>Pressões Arteriais e Frequência Cardíaca</i>		
PAS (mmHg)	116,60 ± 0,70	120,00 ± 1,53 ^a
PAD (mmHg)	94,60 ± 1,00	110,67 ± 0,88 ^{aa}
PAM (mmHg)	100,10 ± 0,70	113,67 ± 0,88 ^a
FC (batimentos/min.)	341,30 ± 3,00	407,33 ± 13,93
<i>Pesos: corporal e tecidos</i>		
Corporal Final (Kg)	0,51 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Coração (g)	1,19 ± 0,03	1,31 ± 0,04 ^a
Ventrículo Esq. (g)	0,57 ± 0,02	0,42 ± 0,02 ^{aaa}
Rim (g)	1,42 ± 0,04	1,24 ± 0,03 ^{aa}
Fígado (g)	16,78 ± 0,52	15,27 ± 0,43 ^a
Suprarrenais (g)	0,057 ± 0,002	0,054 ± 0,01
Músculo (g)	23,5 ± 0,8	20,5 ± 1,1 ^a
<i>Relações de trofismo nos tecidos</i>		
VE/PC (g/kg)	1,12 ± 0,06	0,89 ± 0,03 ^{aa}
Coração/PC (g/kg)	2,35 ± 0,05	2,72 ± 0,10 ^a
VE/Coração (g/kg)	0,48 ± 0,02	0,38 ± 0,02 ^{aaa}
Rim/PC (g/kg)	2,86 ± 0,09	2,56 ± 0,05 ^a
Fígado/PC (g/kg)	32,92 ± 0,57	31,72 ± 0,59
SRs/PC (g/kg)	0,108 ± 0,01	0,114 ± 0,02
Músculo/PC (g/kg)	44,90 ± 0,91	45,06 ± 0,31

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05; ^{aa}P<0,01 e ^{aaa}P<0,001 vs. grupo Ctrl.

A.2 – Parâmetros hematológicos e concentração sérica de EPO

O número de eritrócitos (GVs) e a concentração sérica de EPO registraram valores superiores no grupo EPO ($7,67 \pm 0,08 \times 10^6/\mu\text{l}$; $35,75 \pm 10,05 \text{ pg/ml}$) face ao grupo Ctrl ($7,31 \pm 0,16 \times 10^6/\mu\text{l}$; $22,25 \pm 1,00 \text{ pg/ml}$), sendo estatisticamente significativa a variação do n.º de GVs e da concentração de EPO ($P<0,05$), contrariamente ao registado para o hematócrito e para a concentração de hemoglobina, nos quais o grupo EPO obteve valores idênticos, ainda que tendencialmente inferiores ($39,59 \pm 0,45 \%$; $14,11 \pm 0,15 \text{ g/dl}$), aos do grupo Ctrl ($41,45 \pm 1,65 \%$; $14,45 \pm 0,65 \text{ g/dl}$) (Fig. 16).

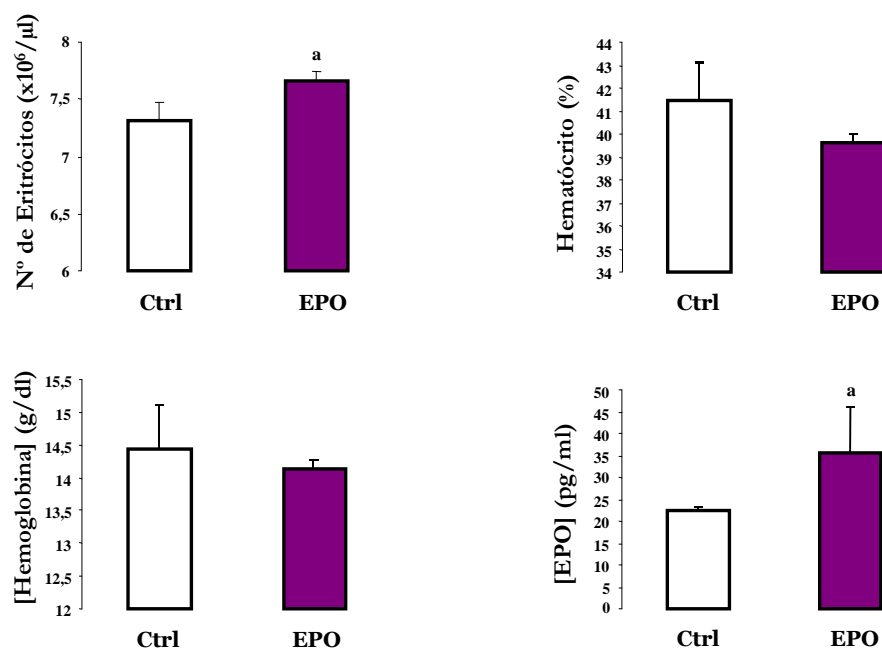


Fig. 16 – Número de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina e concentração sérica de EPO, nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05 vs. Ctrl.

Para os restantes parâmetros (Tabela 7) inerentes ao hemograma, perscrutou-se o seguinte: no grupo EPO havia um aumento significativo em relação ao grupo Ctrl na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (P<0,05), e valores tendencialmente superiores de coeficiente de variação eritrocitária (CVE) e número de plaquetas, acontecendo o inverso para a hemoglobina corpuscular média (HCM), o volume corpuscular médio (VCM) (P<0,05), o volume plaquetar médio (VPM) (P<0,05); o plaquetócrito (PCT), o coeficiente de variação plaquetar (CVP) e a percentagem (obtida por contagem automática e manual, via esfregaço) de reticulócitos foram idênticos nos dois grupos, enquanto no grupo EPO o número de leucócitos foi inferior (P<0,01).

Tabela 7– Dados remanescentes do hemograma nos grupos controlo e EPO

	Controlo (n=9)	EPO (n=10)
<i>Eritrocitários</i>		
HCM (pg)	19,80 ± 1,30	18,76 ± 0,22
CHCM (g/dl)	34,80 ± 0,20	35,75 ± 0,18 ^a
VCM (fl)	56,80 ± 3,50	52,48 ± 0,60 ^a
CVE (%)	15,25 ± 0,65	15,89 ± 0,38
<i>Plaquetares</i>		
N.º Plaquetas (x10³/µl)	904,00 ± 9,00	986,30 ± 41,47
PCT (%)	0,55 ± 0,02	0,56 ± 0,02
VPM (fl)	6,15 ± 0,25	5,69 ± 0,05 ^a
CVP (%)	16,85 ± 0,15	16,73 ± 0,18
<i>Reticulocitários (%)</i>		
Contador	4,57 ± 0,17	4,33 ± 0,33
Esfregaço	2,60 ± 0,32	2,72 ± 0,32
<i>Leucocitários</i>		
N.º Leucócitos (x10³/µl)	2,40 ± 0,20	0,93 ± 0,18 ^{aa}

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05 e ^{aa}P<0,01 vs. grupo Ctrl.

A.3 – Metabolismo do ferro

Os resultados obtidos para a concentração de ferro e de transferrina não se repercutiram em variações estatisticamente significativas, observando-se, contudo, uma diminuição tendencial no grupo EPO (161,00 ± 8,62 µg/dl e 120,00 ± 7,51 mg/dl) em relação ao grupo Ctrl (168,17 ± 7,63 µg/dl e 132,29 ± 3,58 mg/dl). Em relação à ferritina, verificou-se que o grupo EPO (28,07 ± 4,39 ng/dl) apresentou uma concentração superior (P<0,05) à do grupo Ctrl (21,23 ± 0,70 ng/dl) (Fig. 17).

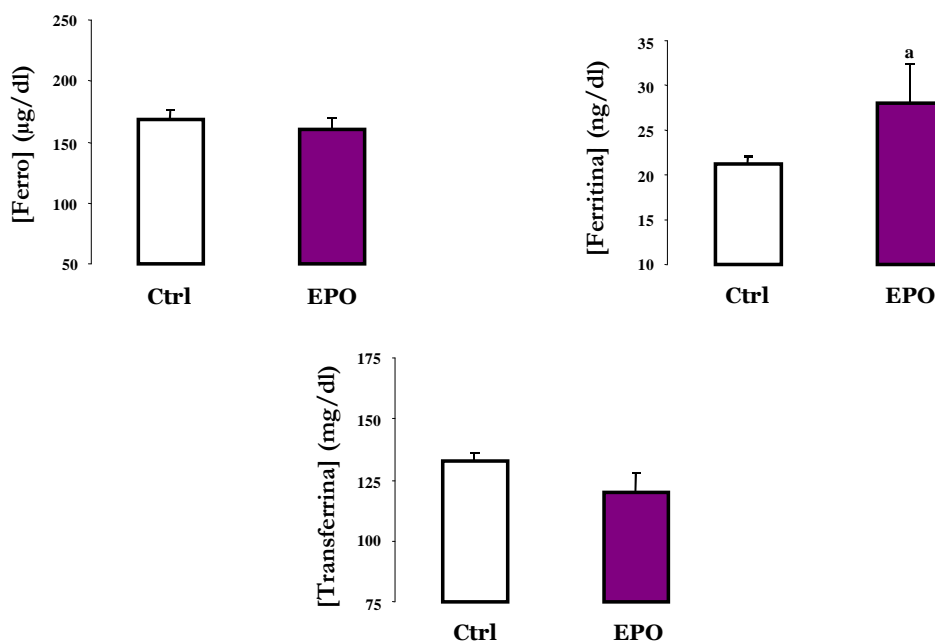


Fig. 17 – Concentrações séricas de ferro, ferritina e transferrina, nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05 vs. Ctrl.

A.4 – Bioquímica: função renal, hepática e perfil lipídico

No que se refere aos dados da bioquímica, mais propriamente à função renal, verificou-se a existência de um valor mais elevado (ainda que não estatisticamente significativo) de ácido úrico no grupo EPO face ao Ctrl, ocorrendo uma concentração inferior de azoto ureico (P<0,05), sem alteração de creatinina. Na função hepática, destacou-se um valor substancialmente mais elevado de transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) para o grupo EPO em relação ao Ctrl (P<0,001).

Da análise do perfil lipídico, sobressaem os valores elevados de LDL-c e de triglicéridos no grupo EPO (P<0,001 e P<0,05; respectivamente) comparativamente ao Ctrl, sendo que das relações subjacentes se evidenciaram: razões LDL-c/Total-c (P<0,01) e LDL-c/HDL-c (P<0,05) mais elevadas no grupo EPO e, contrariamente, relação Total-c/HDL-c (P<0,001) mais reduzida (Tabela 8).

A actividade creatina cinase (CK) no grupo EPO registou um valor massivamente superior ($P < 0,001$) *versus* grupo Ctrl.

Tabela 8 – Dados bioquímicos nos grupos controlo e EPO

	Controlo (n=9)	EPO (n=10)
Função Renal		
[Azoto Ureico] (mg/dl)	18,84 ± 0,55	17,37 ± 0,46 ^a
[Creatinina] (mg/dl)	0,57 ± 0,01	0,54 ± 0,02
[Ácido Úrico] (mg/dl)	0,67 ± 0,05	0,77 ± 0,05
Função Hepática		
[TGP] (UI/l)	27,20 ± 0,37	27,50 ± 0,50
[TGO] (UI/l)	50,20 ± 0,86	70,00 ± 2,28 ^{aaa}
[CK] (UI/l)	165,8 ± 14,60	541,4 ± 67,27 ^{aaa}
Perfil Lipídico e suas relações		
Total-c (mg/dl)	53,17 ± 1,66	55,00 ± 1,94
HDL-c (mg/dl)	36,29 ± 2,51	40,00 ± 2,60
LDL-c (mg/dl)	9,00 ± 1,00	16,22 ± 0,86 ^{aaa}
TGs (mg/dl)	151,8 ± 7,17	185,6 ± 16,21 ^a
LDL-c/Total-c	0,23 ± 0,02	0,30 ± 0,01 ^{aa}
Total-c/HDL-c	1,76 ± 0,03	1,51 ± 0,05 ^{aaa}
LDL-c/HDL-c	0,35 ± 0,02	0,44 ± 0,02 ^a

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^a $P < 0,05$; ^{aa} $P < 0,01$ e ^{aaa} $P < 0,001$ vs. grupo Ctrl.

A.5 – Sistema nervoso simpático

A.5.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas

As concentrações plasmáticas de noradrenalina (NA) e de adrenalina (AD) evoluíram de forma semelhante, com ligeiros incrementos no grupo EPO ($4,81 \pm 0,37$; $1,52 \pm 0,06$ ng/ml) face ao grupo Ctrl ($3,71 \pm 0,60$; $1,48 \pm 0,21$ ng/ml), variações essas incapazes de produzir alterações estatisticamente significativas. O comportamento a nível plaquetar foi o oposto, com valores significativamente inferiores tanto de NA

como de AD no grupo EPO ($0,60 \pm 0,08$ ng/ml, $P < 0,001$; $0,36 \pm 0,08$ ng/ml, $P < 0,01$), *versus* Controlo ($4,54 \pm 0,61$ ng/ml; $0,69 \pm 0,04$ ng/ml) (Fig. 18).

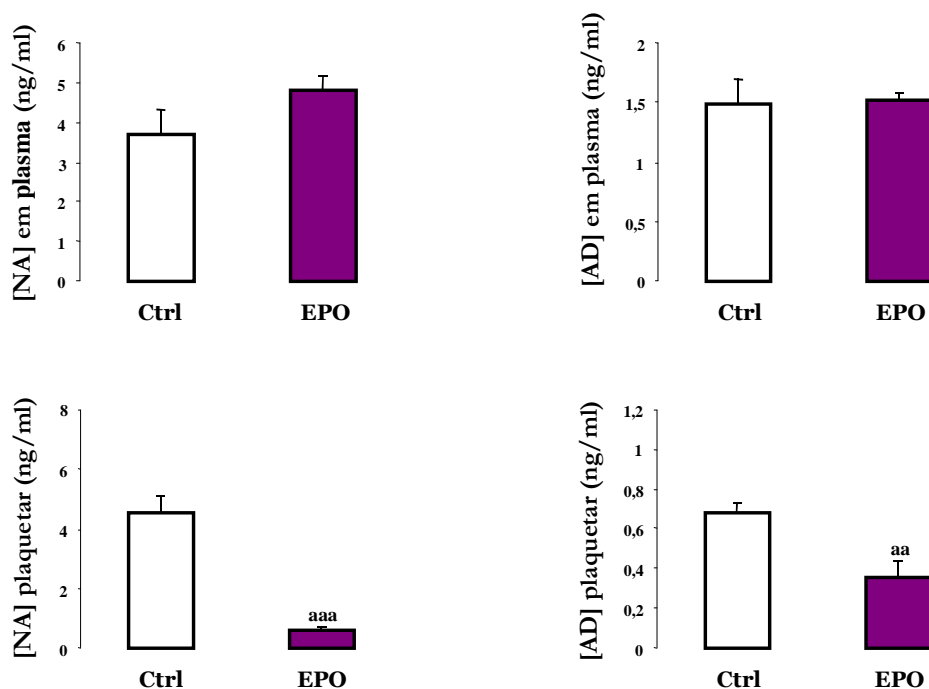


Fig. 18 – Concentrações plasmáticas e plaquetares de NA e AD, nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{aa}P<0,01 e ^{aaa}P<0,001 vs. Ctrl

A.5.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas

O conteúdo de catecolaminas nas suprarrenais (SRs) no grupo EPO foi menor do que o registado para o grupo Ctrl, sendo alvo de significância estatística a diminuição de NA ($P < 0,05$) e a de DA ($P < 0,001$). No rim, ventrículo esquerdo (VE) e aorta as concentrações de NA e de AD admitiram aumentos no grupo EPO, quando comparadas com o grupo Ctrl, sendo as alterações de NA, a nível do VE e da aorta, estatisticamente significativas ($P < 0,001$ e $P < 0,05$; respectivamente). Por seu lado, a DA reflectiu uma predisposição contrária, com redução tendencial no VE e aorta e significativa no rim ($P < 0,01$).

No cérebro, as variações de catecolaminas foram distintas, com aumento tendencial de AD, redução significativa de DA ($P < 0,001$) e sem alteração de NA, no grupo EPO *versus* Controlo (Tabela 9).

Tabela 9 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas (NA, AD e DA)

	Controlo (n=9)	EPO (n=10)
<i>Sistema Nervoso Simpático</i>		
<i>SRs</i>		
NA (µg/g)	164,07 ± 8,01	130,41 ± 9,57 ^a
AD (µg/g)	626,00 ± 47,55	602,00 ± 66,74
DA (µg/g)	10,06 ± 0,86	5,20 ± 0,56 ^{aaa}
<i>Rim</i>		
NA (ng/g)	138,14 ± 8,23	193,84 ± 23,93
AD (ng/g)	55,30 ± 3,35	84,36 ± 14,27
DA (ng/g)	18,33 ± 2,11	9,40 ± 1,36 ^{aa}
<i>VE</i>		
NA (ng/g)	135,81 ± 21,95	706,24 ± 47,59 ^{aaa}
AD (ng/g)	22,34 ± 4,20	46,68 ± 10,86
DA (ng/g)	33,11 ± 4,65	29,93 ± 4,46
<i>Aorta</i>		
NA (ng/g)	273,06 ± 54,91	438,35 ± 58,85 ^a
AD (ng/g)	11,51 ± 4,21	25,33 ± 5,18
NA (ng/g)	5,52 ± 0,54	3,26 ± 1,12
<i>Cérebro</i>		
NA (µg/g)	0,20 ± 0,004	0,18 ± 0,007
AD (ng/g)	2,03 ± 0,09	2,38 ± 0,18
DA (µg/g)	0,48 ± 0,01	0,39 ± 0,02 ^{aaa}

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05; ^{aa}P<0,01 e ^{aaa}P<0,001 *vs.* grupo Ctrl.

A.6 – Sistema serotoninérgico

A.6.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA

Verificou-se que o conteúdo plaquetar de 5-HT foi consideravelmente superior no grupo EPO ($830,01 \pm 27,21$ ng/ml; $P < 0,001$) em relação ao grupo Ctrl ($556,73 \pm 40,86$ ng/ml), enquanto que a nível plasmático a variação foi oposta: concentração inferior no grupo EPO ($5,82 \pm 0,60$ ng/ml; $P < 0,001$) *versus* o grupo Ctrl ($18,56 \pm 1,46$ ng/ml).

O metabolito 5-HIAA, pelo contrário, atingiu valores inferiores para o grupo EPO ($2,74 \pm 0,18$ ng/ml; $P < 0,01$), a nível plaquetar, comparado com o grupo Ctrl ($3,91 \pm 0,24$ ng/ml), e valores superiores ($17,56 \pm 1,20$ ng/ml; $P < 0,01$) no plasma, face ao grupo Ctrl ($11,53 \pm 0,93$ ng/ml) (Fig. 19).

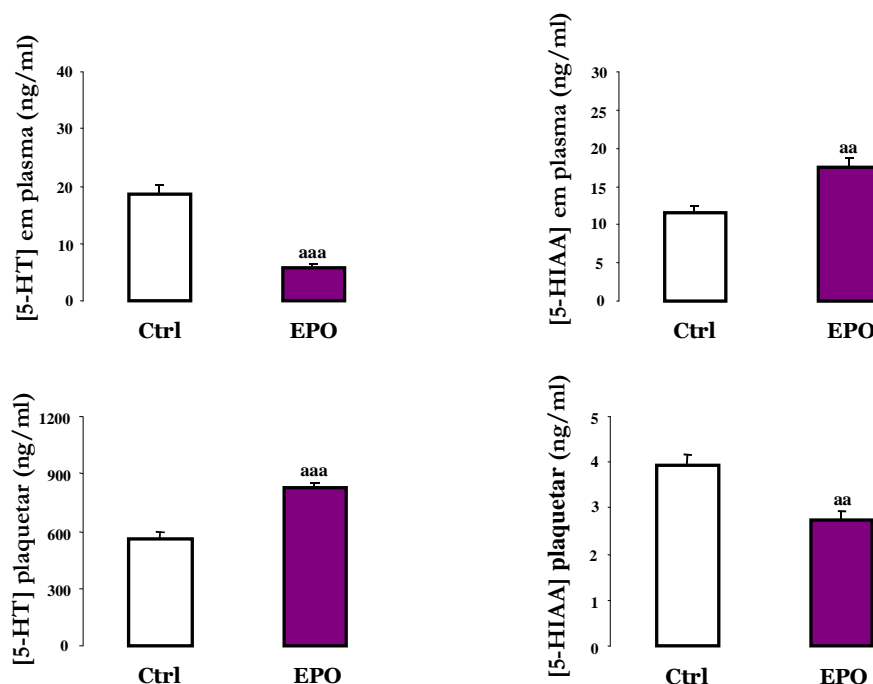


Fig. 19 – Concentrações plasmáticas e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA, nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{aa} $P < 0,01$ e ^{aaa} $P < 0,001$ vs. Ctrl.

A.6.2 – Conteúdo de 5-HT e 5-HIAA no cérebro

A concentração neuronal de serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) registou no grupo EPO um aumento significativo ($P < 0,05$) face ao Ctrl (Tabela 10); já para a concentração de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) não se verificaram alterações estatisticamente significativas.

Tabela 10 – Conteúdo cerebral de 5-HT e de 5-HIAA nos grupos controlo e EPO

	Controlo (n=9)	EPO (n=10)
Cérebro		
5-HT (µg/g)	0,25 ± 0,01	0,30 ± 0,01 ^a
5-HIAA (µg/g)	0,13 ± 0,004	0,12 ± 0,007

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^a $P < 0,05$ vs. grupo Ctrl.

A.7 – Marcadores inflamatórios e de proliferação celular

A concentração sérica de IL-2 foi o único marcador inflamatório que apresentou um decréscimo no grupo EPO ($39,59 \pm 4,74$ pg/ml) relativamente ao grupo Ctrl ($44,67 \pm 7,48$), sem que essa variação tivesse atingido distinção estatisticamente significativa. Os marcadores, TGF- β e TNF- α , assinalaram valores acrescidos para o grupo EPO ($380,23 \pm 18,81$; $14,18 \pm 0,79$ pg/ml) quando confrontados com os do grupo Ctrl ($315,24 \pm 13,24$; $12,13 \pm 0,65$ pg/ml), tendo estas variações alcançado significado estatístico ($P < 0,05$) (Fig. 20). Para IL-1 β , não se observaram alterações entre os dois grupos em estudo.

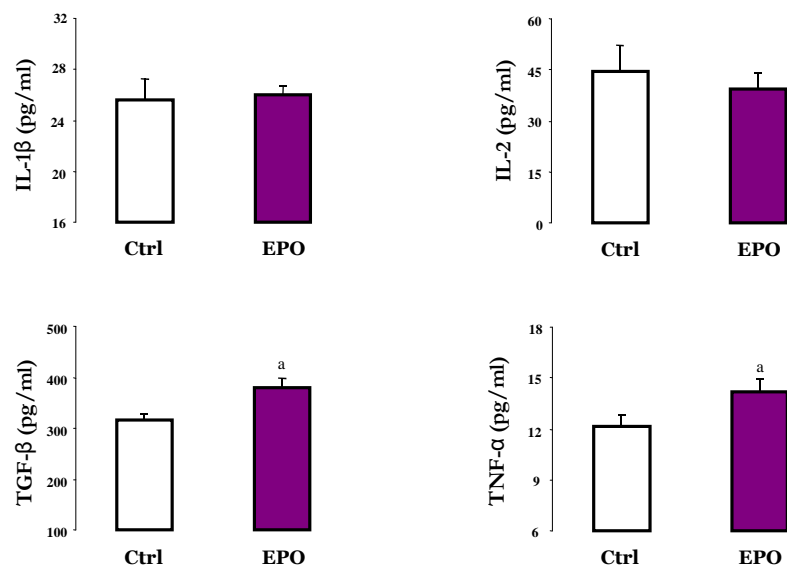


Fig. 20 – Concentrações séricas de IL-1 β , IL-2, TGF- β e TNF- α , nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^aP<0,05 vs. Ctrl

A.8 – Equilíbrio oxidativo

A.8.1 – Concentração sérica de 3-nitrotirosina

A concentração de 3-nitrotirosina em soro, considerada um indicador da formação de peroxinitrito, registou um valor mais reduzido no grupo EPO ($25,02 \pm 3,58$ nM; P<0,05) face ao Ctrl ($42,42 \pm 8,25$ nM) (Fig. 21).

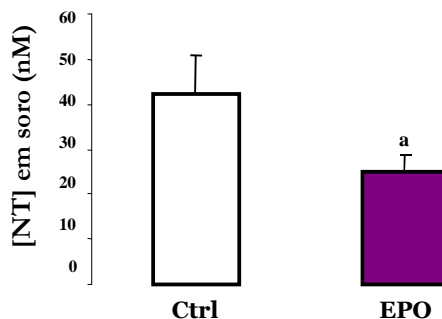


Fig. 21 – Concentração de 3-nitrotirosina no soro, nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^aP<0,05 vs. Ctrl

A.8.2 – MDA e TAS em soro e músculo

A concentração de TAS no soro foi a única que registou uma alteração digna de significância estatística, baseada na diferença de valores entre o grupo Ctrl ($0,24 \pm 0,01$ mM) e EPO ($0,36 \pm 0,03$ mM; $P < 0,001$) (Fig. 22). Relativamente à concentração de TAS no músculo, registou-se um valor inferior (não significativo) no grupo EPO ($0,12 \pm 0,001$ mM) face ao grupo Ctrl ($0,14 \pm 0,003$ mM). Assistimos a um comportamento inverso dos grupos em causa, EPO ($0,38 \pm 0,04$ μ M) e Ctrl ($0,40 \pm 0,02$ μ M), para a concentração de MDA no soro, com tendencial redução no grupo EPO, contrária à variação na concentração muscular, que apresentou um valor tendencialmente superior (não significativo) no grupo EPO ($0,38 \pm 0,04$ μ M) em relação ao grupo Ctrl ($0,29 \pm 0,03$ μ M).

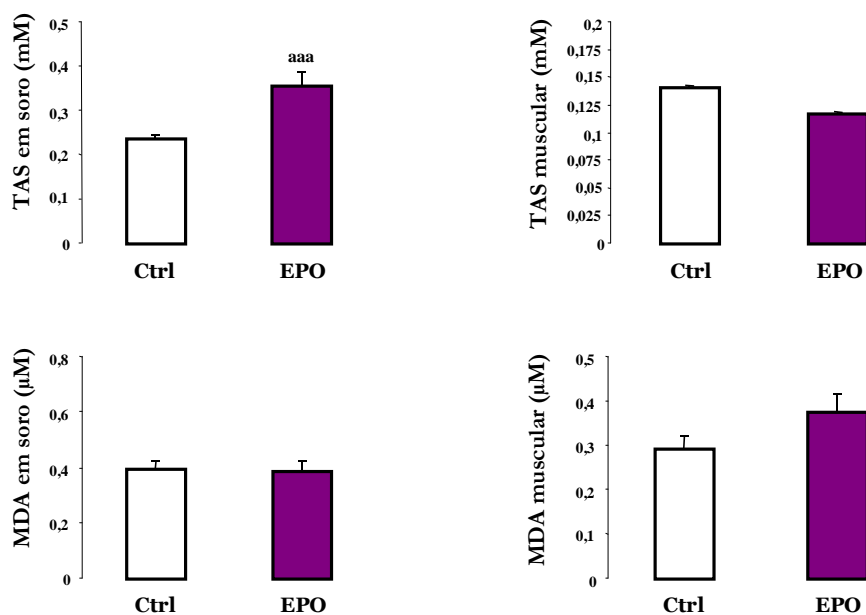


Fig. 22 – Concentrações séricas e musculares de TAS e MDA, nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{aaa} $P < 0,001$ vs. Ctrl

O resultado da razão MDA/TAS no soro traduziu-se numa diminuição significativa no grupo EPO ($1,13 \pm 0,23$ μ M/mM; $P < 0,05$) face ao grupo Ctrl ($1,76 \pm 0,16$ μ M/mM), enquanto que a nível muscular a variação foi oposta, com valores

superiores no grupo EPO ($0,63 \pm 0,04 \mu\text{M}/\text{mM}$; $P < 0,01$) *versus* grupo Ctrl ($0,41 \pm 0,04 \mu\text{M}/\text{mM}$) (Fig. 23).

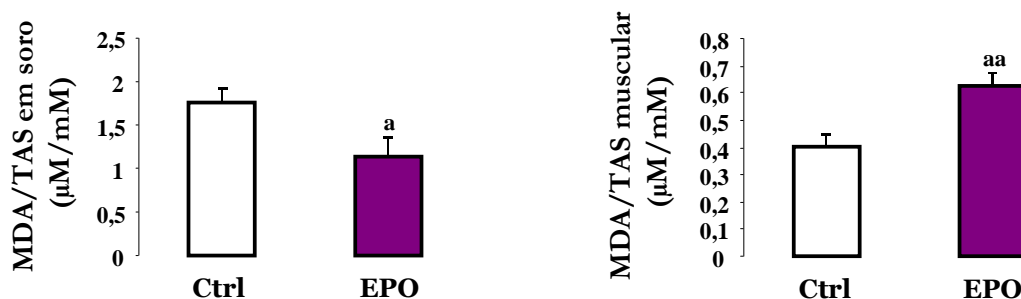


Fig. 23 – Razão MDA/TAS no soro e no músculo, nos ratos dos grupos controlo (n=9) e EPO (n=10), administrados com rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^a $P < 0,05$ e ^{aa} $P < 0,01$ vs. Ctrl.

Em suma, a administração de rhEPO promoveu, só por si, em ratos normais, os seguintes efeitos:

- 1- Hipertensão arterial, aumento tendencial da frequência cardíaca, hipertrofia cardíaca e atrofia renal;
- 2- Aumento do número de eritrócitos e da concentração sérica de EPO;
- 3- Aumento de CHCM e redução de CVE, VPM e do número de leucócitos
- 4- Aumento da concentração de ferritina, sem alterações de ferro e transferrina;
- 5- Redução do azoto ureico; aumento de TGO, CK, de LDL-c e TGs; agravamento da relação LDLc/Total-c e LDL-c/HLD-c e redução benéfica da relação Total-c/HDL-c;
- 6- Diminuição das concentrações de NA e de AD nas plaquetas e nas SRs, aumentos no rim, no VE e na aorta; aumento de NA no plasma; redução de DA no cérebro;
- 7- Aumento de 5-HT nas plaquetas e cérebro e redução no plasma, inversamente ao 5-HIAA;
- 8- Aumentos dos marcadores TGF- β e TNF- α em soro;
- 9- Protecção antioxidante no soro (redução de 3-NT e aumento de TAS) e efeito pró-oxidativo no músculo (aumento de MDA e redução de TAS, tendenciais).

B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crónico (natação)

Após a apreciação dos efeitos da administração isolada de rhEPO, por si só, *versus* grupo controlo, na primeira parte do capítulo (A), apresentar-se-ão seguidamente os resultados do efeito da rhEPO em ratos submetidos a exercício físico crónico (B). Para tal, apreciar-se-á inicialmente o efeito do exercício por si só, grupo Ex vs grupo controlo, e seguidamente o efeito da rhEPO em ratos exercitados, através da comparação entre os grupos Ex+EPO *versus* grupo Ex.

B.1 – Variação do peso corporal ao longo do tempo

Coincidindo com o início (7/1) dos treinos de adaptação ao meio líquido foi visível a demarcação dos pesos dos grupos Ctrl e EPO em relação aos dos grupos submetidos a exercício físico. Durante as 10 semanas de duração do protocolo, evidenciou-se com valores de peso corporal sempre mais elevados o grupo Ctrl, seguido do grupo EPO, tendo os grupos submetidos a treino crónico aeróbio (natação: 3x/sem durante 1h) apresentado valores inferiores. O peso corporal final (sem 11) dos grupos Ex e Ex+EPO foi precisamente igual (Fig. 24).

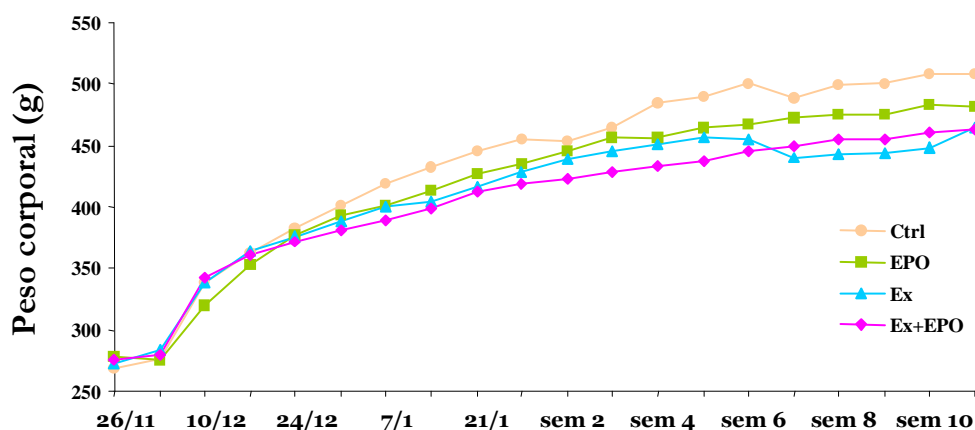


Fig. 24 – Variação do peso corporal ao longo do tempo, nos ratos dos grupos controlo (n=9), EPO (n=10), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

B.2 – Pressão arterial, frequência cardíaca e trofismo tecidual

No grupo submetido a exercício registaram-se valores de pressões arteriais significativamente superiores aos do grupo Ctrl. Em idênticos ratos, a administração de rhEPO (grupo Ex+EPO) promoveu um aumento das pressões arteriais e da frequência cardíaca em relação aos ratos em exercício mas sem rhEPO (Tabela 11).

Tabela 11 – Pressão arterial e frequência cardíaca

	Ctrl (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
<i>Pressões Arteriais e Frequência Cardíaca</i>			
PAS (mmHg)	116,60 ± 0,70	123,92 ± 1,38 ^a	136,67 ± 1,08 ^{bbb}
PAD (mmHg)	94,60 ± 1,00	108,33 ± 1,34 ^{aa}	123,22 ± 2,04 ^{bbb}
PAM (mmHg)	100,10 ± 0,70	113,25 ± 0,99 ^a	127,33 ± 1,62 ^{bbb}
FC (batiment/min.)	341,30 ± 3,00	394,58 ± 8,66	418,44 ± 6,57 ^b

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05; ^{aa}P<0,01 vs. grupo Ctrl. ^bP<0,05; ^{bbb}P<0,001 vs. grupo Ex.

No grupo submetido a exercício físico o peso corporal foi significativamente inferior (P<0,05) ao do grupo controlo, verificando-se uma redução da massa renal (P<0,05), sem alterações nas massas dos restantes tecidos (VE, coração, fígado, SRs e músculo). A administração de rhEPO promoveu, comparativamente aos ratos com Ex, aumento significativo (P<0,05) da massa cardíaca e tendenciais do VE e das SRs (Tabela 12).

Tabela 12 – Peso corporal e tecidulares

	Ctrl (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
Pesos:			
Corporal final (kg)	0,51 ± 0,01	0,46 ± 0,10 ^a	0,46 ± 0,09
VE (g)	0,57 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,62 ± 0,02
Coração (g)	1,19 ± 0,03	1,23 ± 0,03	1,40 ± 0,03 ^{bb}
Rim (g)	1,42 ± 0,05	1,23 ± 0,06 ^{aa}	1,33 ± 0,04
Fígado (g)	16,78 ± 0,52	15,62 ± 0,61	15,42 ± 0,38
Suprarrenais (g)	0,057 ± 0,002	0,069 ± 0,009	0,083 ± 0,008
Músculo (g)	23,57 ± 0,80	22,46 ± 0,47	22,39 ± 0,83

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05; ^{aa}P<0,01; ^{aaa}P<0,001 vs. grupo Ctrl. ^{bb}P<0,01 vs. grupo Ex.

De realçar no trofismo cardíaco (Tabela 13), um aumento (P<0,05) da relação VE/PC no grupo Ex vs Ctrl, sem modificações relevantes nas razões Coração/Peso Corporal (PC) e VE/Coração. No grupo Ex+EPO constatou-se um agravamento daquelas diferenças, sugerindo hipertrofia cardíaca e VE.

Se a nível da relação Rim/PC, o grupo do treino físico apresentou um valor tendencialmente inferior ao do grupo Ctrl, já ao nível do indicador Fígado/PC tendeu a alterar-se no sentido oposto. A adição da rhEPO nos ratos com exercício originou uma recuperação da relação renal e um agravamento da hepática em relação aos ratos Ex, ainda que sem confirmação estatística. Para a quociente SRs/PC verificou-se um aumento significativo no grupo Ex, que não sofreu alterações após a administração de rhEPO. Em relação à relação Músculo/PC, verificou-se um valor significativamente mais elevado no grupo Ex, que se manteve idêntico com a administração de rhEPO (Tabela 13).

Tabela 13 – Relações de trofismo tecidular

	Ctrl (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
Trofismo cardíaco			
VE/PC (g/gk)	1,13 ± 0,06	1,32 ± 0,09 ^a	1,38 ± 0,04
Coração/PC (g/kg)	2,35 ± 0,05	2,65 ± 0,10	3,06 ± 0,16 ^b
VE/Coração (g/g)	0,48 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,45 ± 0,01 ^b
Rim/PC (g/kg)	2,86 ± 0,09	2,66 ± 0,13	2,82 ± 0,10
Fígado/PC (g/kg)	32,92 ± 0,57	33,65 ± 1,15	34,34 ± 0,65
SRs/PC (g/kg)	0,108 ± 0,01	0,148 ± 0,02 ^a	0,175 ± 0,02
Músculo/PC (g/kg)	44,90 ± 0,91	47,75 ± 0,59 ^{aa}	46,10 ± 0,46

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05; ^{aa}P<0,01; ^{aaa}P<0,001 vs. grupo Ctrl. ^bP<0,05 vs. grupo Ex.

B.3 – Parâmetros hematológicos

No grupo Ex ($7,59 \pm 0,15 \times 10^6/\mu\text{l}$) o número de eritrócitos foi apenas ligeiramente superior ao encontrado no controlo ($7,31 \pm 0,16 \times 10^6/\mu\text{l}$), não sendo a variação estatisticamente significativa. Contudo, a administração de rhEPO originou um aumento significativo face ao grupo Ex ($8,23 \pm 0,14 \times 10^6/\mu\text{l}$; P<0,05) (Fig. 25).

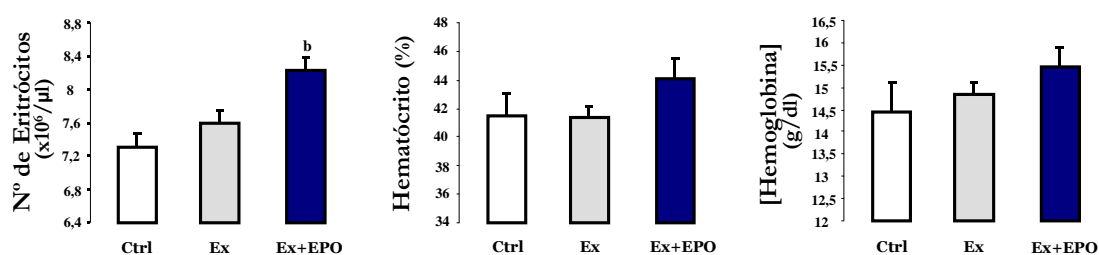


Fig. 25 – Número de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^bP<0,05 vs. Ex.

Em relação ao hematócrito e à concentração de hemoglobina, o grupo Ex não diferiu significativamente do grupo Ctrl, constatando-se o mesmo comportamento no

grupo submetido a exercício físico e administração de rhEPO (grupo Ex+EPO), no qual os valores foram tendencialmente superiores aos do grupo Ex (Fig. 25).

O grupo Ex obteve registos tendencialmente inferiores ao grupo Ctrl para o VCM e CVE, e um aumento significativo ($P<0,05$) para a CHCM. No que diz respeito ao grupo Ex+EPO, não se registaram alterações significativas face ao grupo Ex nos parâmetros eritrocitários (Tabela 14). A nível plaquetar, no grupo Ex observou-se uma redução significativa de VPM ($P<0,05$) vs Ctrl, e aumentos tendenciais no número de plaquetas e no PCT. No grupo Ex+EPO as variações *versus* Ex não desencadearam alterações de significado estatístico. O número de leucócitos obtido no grupo submetido a exercício físico foi menor que o do grupo Ctrl ($P<0,05$), sem alterações no Ex+EPO face ao primeiro. Quanto ao número de reticulócitos, verificou-se, tanto na contagem automática como na manual (esfregaço), um aumento no grupo Ex *versus* Ctrl, com correcção dessa variação no grupo Ex+EPO (Tabela 14).

Tabela 14 – Dados remanescentes do hemograma

	Ctrl (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
Eritrocitários			
HCM (pg)	19,80 ± 1,30	19,60 ± 0,34	18,75 ± 0,25
CHCM (g/dl)	34,80 ± 0,20	35,93 ± 0,21 ^a	35,05 ± 0,05
VCM (fl)	56,80 ± 3,50	54,61 ± 1,13	53,56 ± 0,85
CVE (%)	15,15 ± 0,65	14,84 ± 0,55	14,25 ± 0,15
Plaquetares			
N.º Plaq. (x10 ³ /µl)	904,00 ± 9,00	1008,43 ± 35,86	1021,00 ± 57,00
PCT (%)	0,55 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,60 ± 0,07
VPM (fl)	6,15 ± 0,25	5,63 ± 0,14 ^a	5,85 ± 0,35
CVP (%)	16,85 ± 0,15	16,37 ± 0,26	17,00 ± 0,10
Reticulocitários (%)			
Contador	4,57 ± 0,18	5,46 ± 0,29	4,31 ± 0,73
Esfregaço	2,60 ± 0,32	5,18 ± 0,52 ^{aa}	3,34 ± 0,32 ^{bb}
Leucocitários			
N.º Leuc.(x10 ³ /µl)	2,40 ± 0,20	1,13 ± 0,23 ^a	1,55 ± 0,75

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05; ^{aa}P<0,01 vs. grupo Ctrl; ^{bb}P<0,01 vs. grupo Exercício.

B.4 – Concentração sérica de EPO

Os grupos, Ctrl, Ex e Ex+EPO apresentaram no soro, por esta ordem específica, as seguintes concentrações de EPO: $22,25 \pm 1,00$; $27,83 \pm 1,50$; $25,75 \pm 2,24$ pg/ml, não sendo estatisticamente significativa nenhuma variação entre os grupos (Fig. 26).

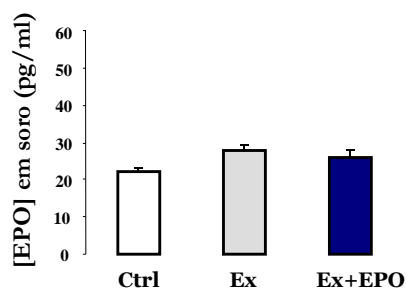


Fig. 26 – Concentração sérica de EPO, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

B.5 – Metabolismo do ferro

A concentração sérica de ferro foi idêntica em todos os grupos, sendo o valor ligeiramente superior no grupo Ex vs Ctrl e no grupo Ex+EPO vs Ex, de acordo com os seguintes valores numéricos: Ex: $170,86 \pm 5,63$ e Ex+EPO: $182,00 \pm 12,99$ μ g/dl. As concentrações de ferritina e transferrina foram também semelhantes para os 3 grupos (Fig. 27).

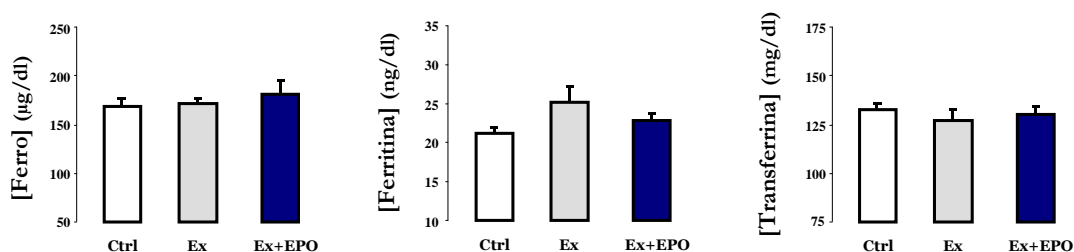


Fig. 27 – Concentrações de ferro, ferritina e transferrina, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

B.6 – Bioquímica

Os grupos que cumpriram o treino físico dispuseram valores de glicemia similares aos dos grupos Ctrl, ainda que tendencialmente inferiores em ambos os casos, mas surpreendentemente idênticos entre si (Tabela 15).

Ao nível da função renal, verificou-se uma redução da concentração de azoto ureico e de ácido úrico no grupo Ex comparativamente aos valores averbados pelo grupo Ctrl ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente); o grupo administrado com rhEPO e sujeito a treino crónico repôs os valores basais. A concentração de creatinina permaneceu estatisticamente imperturbável nos diferentes grupos. Considerando a função hepática, verificou-se que o grupo que realizou apenas exercício físico obteve um aumento tendencial de TGP e mais considerável ($P < 0,001$) de TGO face ao grupo Ctrl, valores esses que permaneceram inalterados após a adição de rhEPO (grupo Ex+EPO *versus* grupo Ex) (Tabela 15).

Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos

	Ctrl (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
[Glicose] (mg/dl)	186,17 ± 5,11	178,75 ± 5,76	178,40 ± 6,72
Função Renal			
[Azoto Ureico] (mg/dl)	18,84 ± 0,55	17,35 ± 0,26 ^a	18,60 ± 0,63
[Creatinina] (mg/dl)	0,57 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,56 ± 0,01
[Ácido Úrico] (mg/dl)	0,68 ± 0,05	0,40 ± 0,06 ^{aa}	0,50 ± 0,00
Função Hepática			
[TGP] (UI/l)	27,20 ± 0,37	30,60 ± 2,84	32,40 ± 2,27
[TGO] (UI/l)	50,20 ± 0,86	65,20 ± 1,59 ^{aaa}	63,50 ± 2,63
[CK] (UI/l)	165,80 ± 15,00	540,25 ± 11,76 ^{aaa}	265,75 ± 35,00 ^{bb}
Perfil Lipídico			
Total-c (mg/dl)	53,17 ± 1,66	43,67 ± 1,20 ^{aa}	38,25 ± 1,18
HDL-c (mg/dl)	36,29 ± 2,51	28,86 ± 1,87 ^a	26,17 ± 2,71
LDL-c (mg/dl)	9,00 ± 1,00	12,00 ± 0,89 ^a	12,00 ± 0,63
TGs (mg/dl)	151,80 ± 7,17	131,00 ± 5,58	136,33 ± 8,03

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^a $P < 0,05$; ^{aa} $P < 0,01$; ^{aaa} $P < 0,001$ vs. grupo Ctrl. ^{bb} $P < 0,01$ vs. grupo Ex.

O aumento notável ($P < 0,001$) na concentração da CK verificado para o grupo Ex foi como que contrariado pela adição de rhEPO. No âmbito do perfil lipídico, constatou-se que o grupo que efectuou treino físico (Ex) obteve reduções do Total-c, HDL-c e TGs, e incremento do valor de LDL-c, face ao grupo Ctrl; sendo que a administração de rhEPO não alterou esse padrão (Tabela 15).

Relativamente às relações de perfil lipídico, constatou-se uma tendência para um aumento de LDL-c/Total-c e de LDL-c/HDL-c no grupo com exercício, muito à custa do aumento do LDL-c; estas variações, não significativas, foram mantidas no grupo com Ex e administração de rhEPO (Ex+EPO vs Ex). A razão Total-c/HDL-c também não mostrou diferenças entre os 3 grupos (Tabela 16).

Tabela 16 – Relações subjacentes ao perfil lipídico

	Ctrl (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
LDL-c/Total-c	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Total-c/HDL-c	1,76 ± 0,03	1,67 ± 0,04	1,71 ± 0,04
LDL-c/HDL-c	0,35 ± 0,02	0,43 ± 0,04	0,45 ± 0,04

Dados apresentados em médias ± e.p.m.

B.7 – Sistema nervoso simpático

B.7.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas

No grupo Ex não ocorreram alterações de NA e AD em plasma face ao controlo. Contudo, no grupo Ex+EPO assinala-se a concentração plasmática de NA mais elevada ($9,32 \pm 1,43$ ng/ml), concretizando um aumento significativo ($P < 0,01$) face ao grupo Ex ($5,10 \pm 0,96$ ng/ml). De igual modo, o grupo Ex+EPO ($1,96 \pm 0,18$ ng/ml) prevaleceu para a concentração plasmática de AD relativamente ao grupo Ex ($1,04 \pm 0,09$ ng/m; $P < 0,01$) (Fig. 28).

Em termos plaquetares, presenciou-se um acréscimo da concentração de NA no grupo Ex ($8,02 \pm 0,68$ ng/ml), arquitectando elevada significância estatística ($P < 0,001$) relativamente ao grupo Ctrl ($4,54 \pm 0,61$ ng/ml). Este efeito não foi alterado pela adição de rhEPO (Ex+EPO: $7,01 \pm 0,47$ ng/ml), apesar de uma redução tendencial. O mesmo padrão foi obtido para a concentração de AD plaquetar, apenas variando o efeito da adição da rhEPO, que originou uma correcção total ($P < 0,01$) do aumento significativo ($P < 0,001$) promovido pelo exercício vs controlo (Fig. 29).

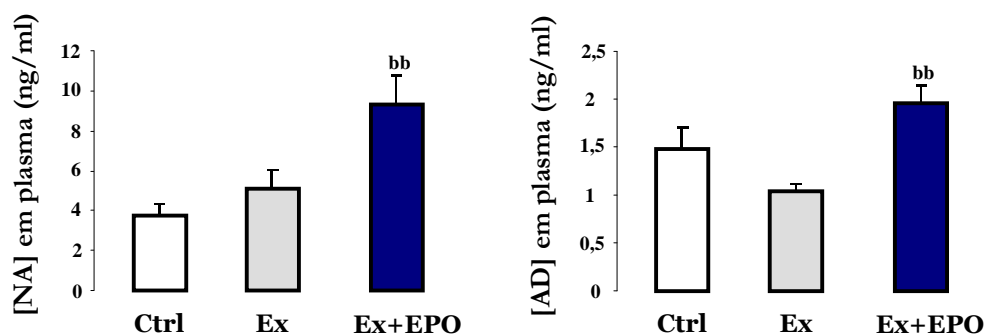


Fig. 28 – Concentrações plasmáticas de NA e de AD, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{bb} $P < 0,01$ vs. Ex.

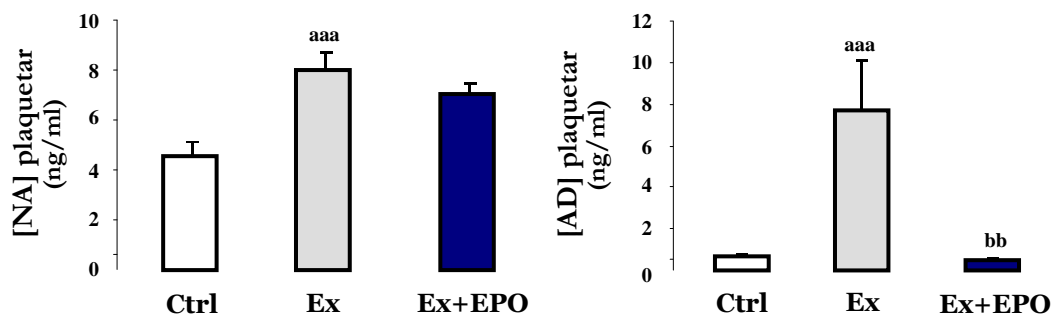


Fig. 29 – Concentração plaquetar de NA e de AD, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{aaa} $P < 0,001$ vs. Ctrl. ^{bb} $P < 0,01$ vs. Ex.

B.7.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas

O grupo de ratos que fomentou a componente cardiorrespiratória através da prática da natação (Ex) obteve diminuições significativas ($P < 0,05$ e $P < 0,001$) nas concentrações de AD e DA (e tendencial de NA) nas suprarrenais e grandes aumentos no rim ($P < 0,001$). No grupo de ratos que praticou treino, suplementado com a administração de rhEPO (grupo Ex+EPO), registou-se um aumento (ainda que apenas em tendência) de AD nas suprarrenais e NA no rim, *versus* grupo Ex.

Tabela 17 – Concentrações tecidulares de catecolaminas: suprarrenais, rim, aorta, ventrículo esquerdo e cérebro

	Ctrl (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
SRs			
NA (µg/g)	164,07 ± 8,01	149,79 ± 15,83	133,81 ± 7,88
AD (µg/g)	626,00 ± 47,55	433,06 ± 24,61 ^a	579,38 ± 40,58
DA (µg/g)	10,06 ± 0,86	4,02 ± 0,29 ^{aaa}	3,42 ± 0,34
Rim			
NA (ng/g)	138,14 ± 8,23	389,68 ± 22,62 ^{aaa}	436,53 ± 59,51
AD (ng/g)	55,30 ± 3,35	299,47 ± 49,74 ^{aaa}	248,79 ± 47,10
DA (ng/g)	18,33 ± 2,11	36,12 ± 0,65 ^{aaa}	30,48 ± 3,08
VE			
NA (ng/g)	135,81 ± 21,95	916,65 ± 37,04 ^{aaa}	120,30 ± 19,72 ^{bbb}
AD (ng/g)	22,34 ± 4,20	147,59 ± 17,44 ^{aaa}	126,44 ± 23,24
DA (ng/g)	33,11 ± 4,65	19,53 ± 3,08 ^a	17,35 ± 2,35
Aorta			
NA (ng/g)	273,06 ± 54,91	190,14 ± 26,46	167,14 ± 16,22
AD (ng/g)	11,51 ± 4,21	468,43 ± 20,52 ^{aaa}	210,24 ± 39,50 ^{bbb}
DA (ng/g)	5,52 ± 0,54	3,74 ± 0,82	2,16 ± 0,54
Cérebro			
NA (µg/g)	0,20 ± 0,004	0,21 ± 0,008	0,19 ± 0,008
AD (ng/g)	2,03 ± 0,09	1,79 ± 0,25	2,57 ± 0,15 ^b
DA (µg/g)	0,48 ± 0,01	0,41 ± 0,02 ^{aa}	0,43 ± 0,01

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^a $P < 0,05$; ^{aa} $P < 0,01$; ^{aaa} $P < 0,001$ vs. grupo Ctrl. ^b $P < 0,05$; ^{bbb} $P < 0,001$ vs. grupo Ex.

No VE, o grupo Ex registou os valores mais elevados para a NA e AD, consumando variações estatísticas significativas ($P < 0,001$) face ao Ctrl, alterações essas que foram prevenidas no grupo que simultaneamente tomava rhEPO (Ex+EPO). Os valores determinados para a DA foram inferiores nos grupos Ex e Ex+EPO relativamente aos do grupo Ctrl.

No caso da aorta, os grupos que executaram o esforço físico continuado (Ex e Ex+EPO), averbaram concentrações de NA e DA idênticas e mais reduzidas que o grupo Ctrl. Para a AD, verificou-se o oposto, com aumentos acentuados das concentrações, sendo a obtida pelo grupo Ex, de tal magnitude, que foi inclusive precursora de $P < 0,001$ face ao grupo Ex+EPO.

Em relação ao tecido neuronal, constatou-se não existirem diferenças na concentração de NA entre os 3 grupos, acompanhado de uma redução (tendencial) de AD no grupo Ex, que foi revertida ($P < 0,05$) no grupo Ex+EPO, e ainda de uma redução de DA em ambos os grupos submetidos a treino (Tabela 17).

B.8 – Sistema serotoninérgico

B.8.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA

Verificou-se que o grupo Ex apresentou uma concentração plasmática de 5-HT inferior ($11,08 \pm 0,65$ ng/ml; $P < 0,05$) à do grupo Ctrl ($18,56 \pm 1,46$ ng/ml), enquanto que o grupo Ex+EPO apresentou um valor mais elevado ($30,07 \pm 4,45$ ng/ml), concretizando um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,001$) na sua comparação com os grupo Ex (Fig. 30). Em relação ao conteúdo plasmático de 5-HIAA, ocorreu um aumento após exercício físico ($17,99 \pm 2,94$ ng/ml; $P < 0,05$), agravado com a administração de rhEPO ($25,07 \pm 2,38$ ng/ml; $P < 0,05$) (Fig. 30).

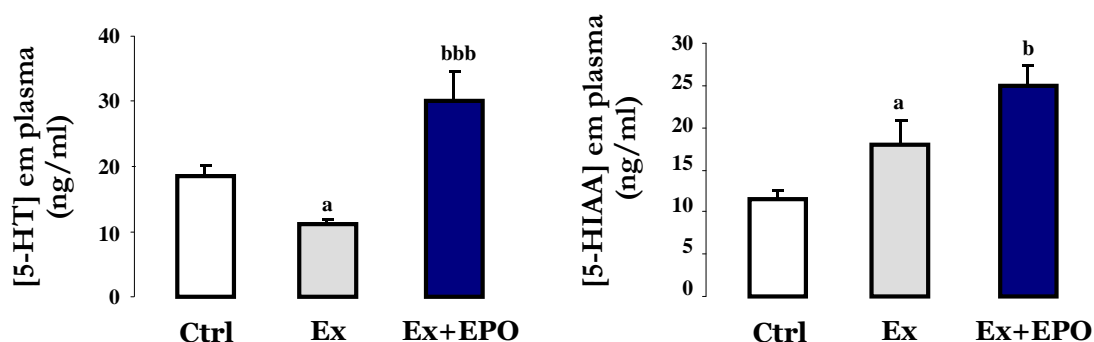


Fig. 30 – Concentrações plasmáticas de 5-HT e de 5-HIAA, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05 vs. Ctrl. ^bP<0,05; ^{bbb}P<0,001 vs. Ex.

O grupo Ex registou um valor de 5-HT plaquetar ($1610,80 \pm 55,06$ ng/ml; $P<0,001$) substancialmente superior ao grupo controlo, efeito esse que não sofreu modificações com a adição de rhEPO (Ex+EPO: $1640,44 \pm 39,64$ ng/ml) (Fig. 31). Relativamente à 5-HIAA plaquetar, a redução no grupo Ex ($2,99 \pm 0,22$ ng/ml; $P<0,05$) *versus* Ctrl ($3,92 \pm 0,24$ ng/ml) foi prevenida no grupo Ex+EPO ($3,68 \pm 0,30$ ng/ml) (Fig. 31).

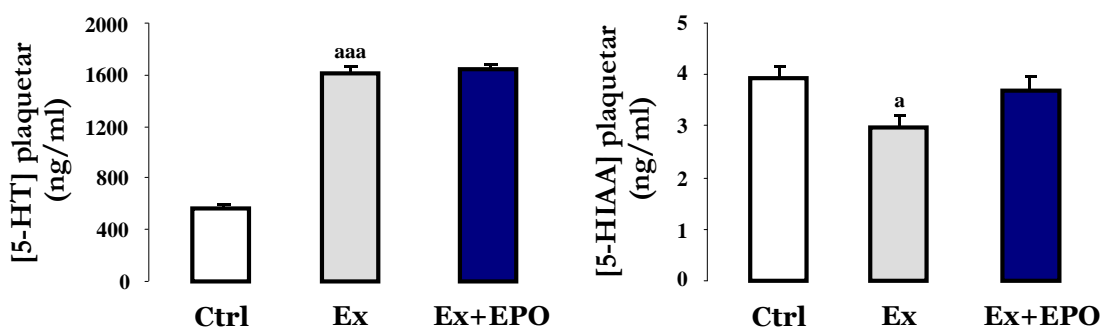


Fig. 31 – Concentrações plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^aP<0,05; ^{aaa}P<0,001 vs. Ctrl.

B.8.2 – Conteúdos de 5-HT e de 5-HIAA no cérebro

No grupo Ex as concentrações de 5-HT e de 5-HIAA não diferiram das do grupo Ctrl, o mesmo acontecendo entre o grupo Ex+EPO *versus* Ex (Tabela 18).

Tabela 18 – Conteúdo cerebral de 5-HT e de 5-HIAA nos grupos controlo e EPO

	Controlo (n=9)	Ex (n=7)	Ex+EPO (n=7)
<i>Cérebro</i>			
5-HT (µg/g)	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01
5-HIAA (µg/g)	0,13 ± 0,004	0,13 ± 0,005	0,13 ± 0,006

Dados apresentados em médias ± e.p.m.

B.9 – Marcadores de inflamação e proliferação celular

Relativamente à concentração sérica de IL-1 β , registou-se um valor tendencialmente mais elevado para o grupo Ex (25,84 ± 1,38 pg/ml), em relação ao grupo Ctrl (25,55 ± 1,69 pg/ml), tendo o grupo Ex+EPO (23,96 ± 1,27 pg/ml) apresentado o valor mais reduzido. Contudo, ressalva-se que nenhum apresentou diferenças estatisticamente significativas quer em relação ao grupo Ctrl, quer em relação ao grupo Ex, respectivamente (Fig. 32).

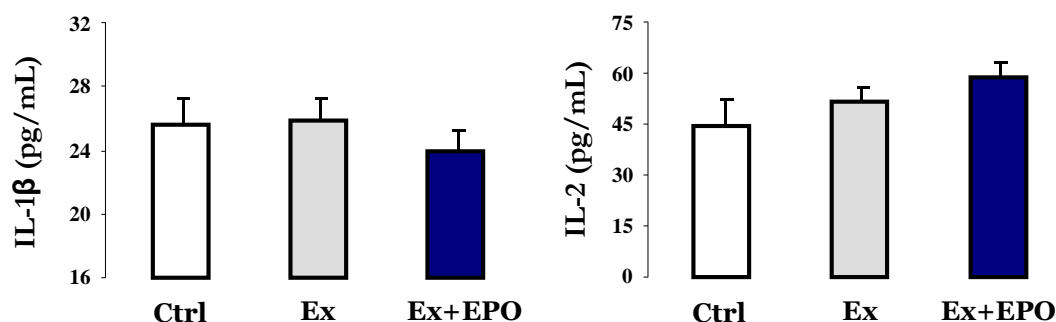


Fig. 32 – Concentrações de IL-1 β e de IL-2, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias ± e.p.m.

Em relação à IL-2, o valor tendencialmente mais elevado no grupo Ex, *versus* Ctrl, foi acentuado ($P < 0,05$) nos ratos com exercício e administração simultânea de rhEPO (Ex+EPO) (Fig. 32).

Relativamente à concentração sérica de PCR, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, registando-se apenas um decréscimo tendencial no grupo Ex ($24,22 \pm 1,06 \mu\text{g/ml}$) face ao grupo Ctrl ($26,68 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$), de certa forma prevenido no grupo Ex+EPO ($25,77 \pm 1,21 \mu\text{g/ml}$) (Fig. 33).

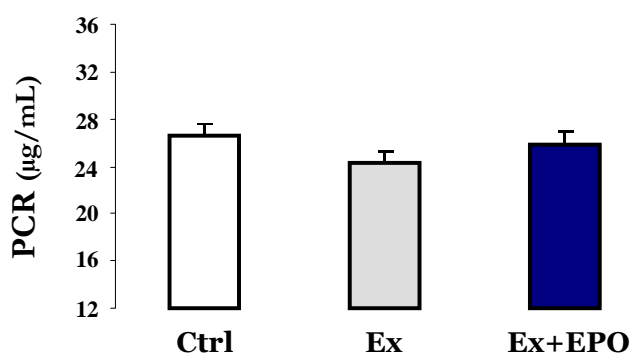


Fig. 33 – Concentração de PCR, em ratos controlo, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

No que concerne à concentração de TGF- β , não houve diferenças entre o grupo Ex e o controlo ($315,24 \pm 13,24 \text{ pg/ml}$), ocorrendo, contudo, um aumento com significado estatístico ($P < 0,05$) após a adição de rhEPO ($375,73 \pm 23,48 \text{ pg/ml}$) *vs* Ex ($317,80 \pm 15,12 \text{ pg/ml}$) (Fig. 34).

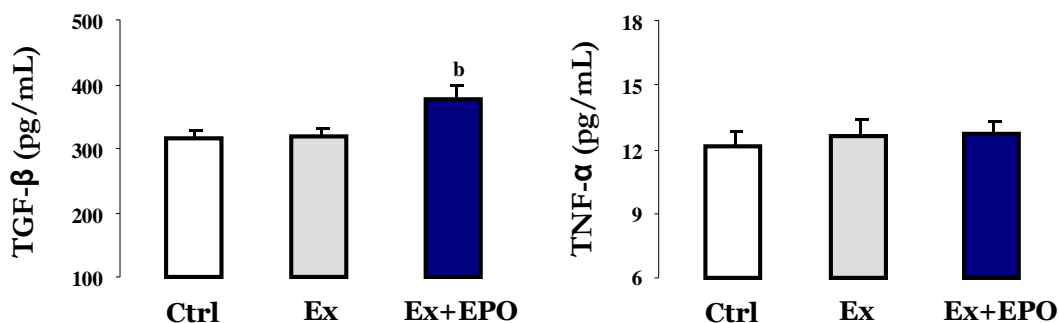


Fig. 34 – Concentrações de TGF- β e de TNF- α , nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^b $P < 0,05$ *vs.* Ex.

Em relação à concentração sérica de TNF- α , no grupo Ex ($12,62 \pm 0,76$ pg/ml) não houve variação significativa *versus* Ctrl ($12,13 \pm 0,65$ pg/ml), tendo o grupo Ex+EPO apresentado idêntico valor ($12,69 \pm 0,59$ pg/ml), ou seja, não ocorreu qualquer variação estatisticamente significativa (Fig. 34).

B.10 – Equilíbrio oxidativo

B.10.1 – Peroxidação lipídica (formação de MDA) no soro e no músculo

Verificou-se uma redução significativa ($P < 0,05$) da concentração sérica de MDA no grupo Ex ($0,30 \pm 0,02$ μ M) *versus* Ctrl ($0,40 \pm 0,02$ μ M) que, contudo, foi revertida no grupo Ex+EPO ($0,34 \pm 0,01$ μ M) (Fig. 35).

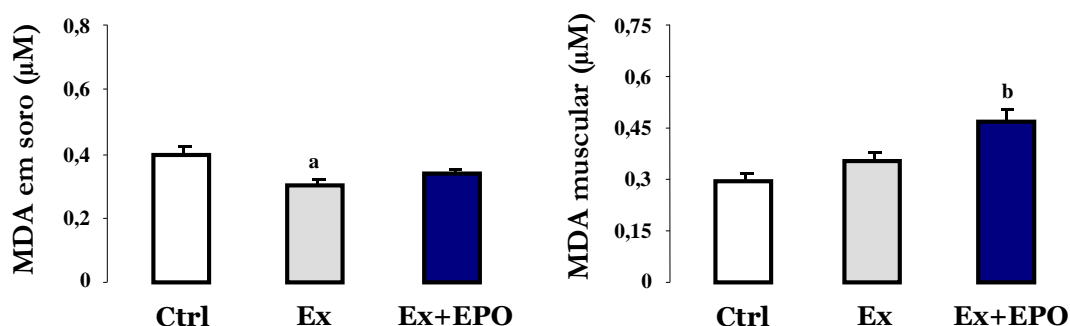


Fig. 35 – Concentração de MDA no soro e no músculo, nos ratos dos grupos controle (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^a $P < 0,05$ vs. Ctrl. ^b $P < 0,05$ vs. Ex.

O aumento tendencial (não significativo) de MDA no músculo no grupo Ex ($1,79 \pm 0,11$ μ M) *versus* Ctrl ($1,47 \pm 0,14$ μ M) foi confirmado e agravado no grupo submetido aos 2 procedimentos (Ex+EPO: $2,35 \pm 0,18$ μ M; $P < 0,05$ *versus* Ex) (Fig. 35).

B.10.2 – Concentração sérica de 3-nitrotirosina

No que diz respeito à concentração de 3-nitrotirosina em soro, não se vislumbraram alterações significativas entre os grupos, tendo o grupo Ex ($37,96 \pm 7,31$ nM) obtido o valor mais reduzido, seguido do grupo Ex+EPO ($42,26 \pm 6,90$ nM) e do grupo Ctrl ($42,42 \pm 8,25$ nM) (Fig. 36).

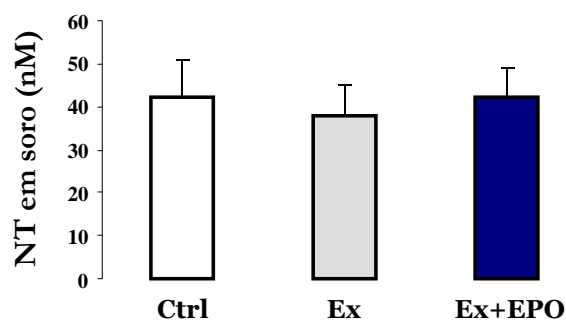


Fig. 36 – Concentração de 3-Nitrotirosina no soro, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

B.10.3 – Capacidade antioxidante total (TAS) em soro e músculo

No que concerne aos valores de TAS no soro, constatou-se um ligeiro acréscimo no grupo Ex ($0,25 \pm 0,01$ mM) *versus* Ctrl ($0,24 \pm 0,01$ mM) e uma diminuição subtil no grupo Ex+EPO ($0,22 \pm 0,01$ mM) *versus* Ex, variações impassíveis de significado estatístico (Fig. 37).

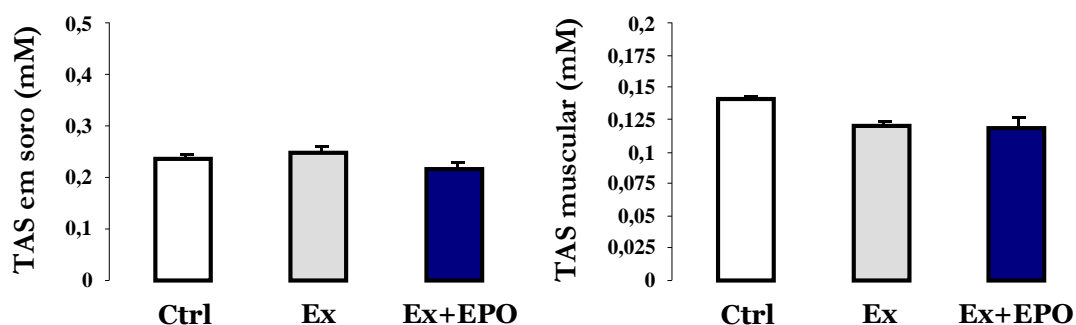


Fig. 37 – Concentração de TAS no soro e no músculo, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

No músculo, as concentrações de TAS dos grupos Ex ($0,60 \pm 0,02$ mM) e Ex+EPO ($0,59 \pm 0,05$ mM) foram similares e inferiores às do grupo Ctrl ($0,70 \pm 0,04$ mM), mas aquém do necessário para a produção de resultados estatísticos significativos (Fig. 37).

B.10.4 – Relação MDA/TAS no soro e músculo

No gráfico MDA/TAS no soro (Fig. 38) está expressa a redução ($P < 0,05$) no grupo Ex *versus* Ctrl, efeito esse não revertido no grupo Ex+EPO.

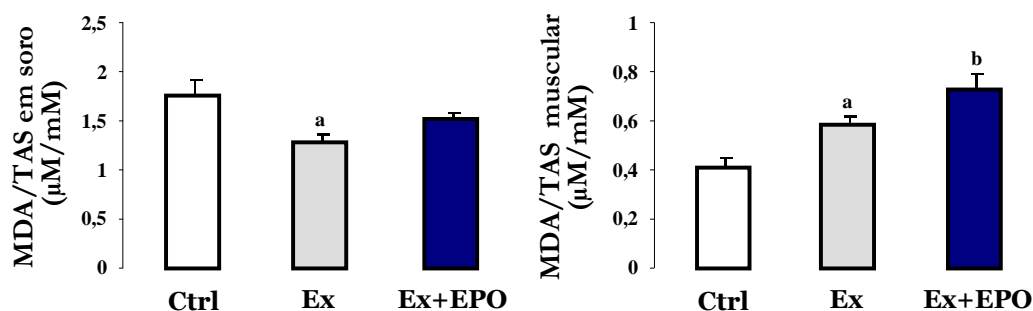


Fig. 38 – Razão MDA/TAS no soro e no músculo, nos ratos dos grupos controlo (n=9), Exercício (n=7) e Ex+EPO (n=7). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^a $P < 0,05$ vs. Ctrl. ^b $P < 0,05$ vs. Ex.

Já em termos musculares, o gráfico MDA/TAS permite vislumbrar valores superiores para o grupo Ex ($2,91 \pm 0,16$ µM/mM; $P < 0,05$) comparativamente ao grupo Ctrl ($2,03 \pm 0,21$ µM/mM), sendo a relação no grupo Ex+EPO ainda superior ($3,64 \pm 0,30$ µM/mM; $P < 0,05$ *versus* Ex).

Em síntese, os principais efeitos da administração de rhEPO em ratos submetidos a treino físico aeróbio crónico (natação) foram:

- 1- Não afecta o efeito do treino (ligeira redução) sobre o peso corporal final;
- 2- Agrava a hipertensão promovida pelo exercício e promove taquicardia e hipertrofia cardíaca;

- 3- O exercício tende a aumentar número de GVs, agravado pela rhEPO, que também tende a aumentar o HCT e a Hb (não afectados pela natação);
- 4- O treino aumenta a CHCM, o nº de reticulócitos e reduz o VPM e nº de leucócitos; a rhEPO atenua o aumento de reticulócitos;
- 5- O exercício tende a aumentar a concentração sérica de EPO; a rhEPO não altera;
- 6- A concentração de ferritina tende a aumentar com o treino; a rhEPO tende a normalizar; nem Ex nem rhEPO alteram ferro e transferrina;
- 7- O treino diminui o azoto ureico e o ácido úrico; a rhEPO repõe azoto ureico e tende a repor ácido úrico;
- 8- A rhEPO não previne aumento de TGO promovido pelo exercício;
- 9- O treino aumenta a CK, revertido parcialmente pela rhEPO;
- 10- O exercício melhora o Total-c e tende a melhorar TGs, agrava HDL-c e LDL-c; a rhEPO não afecta o perfil lipídico;
- 11- O Ex não afecta NA e AD no plasma, que aumentam nas plaquetas; a rhEPO inibe o aumento nas plaquetas, acumulando no plasma;
- 12- O Ex origina redução de AD e DA nas suprarrenais, inibida pela rhEPO;
O Ex promove aumento das 3 CAs no rim, a rhEPO não afecta este efeito;
O Ex causa aumento de NA e AD no VE, e redução de DA; a rhEPO impede;
O Ex faz aumentar o conteúdo de NA na aorta; a rhEPO atenua parcialmente;
O Ex diminui a DA no cérebro; a rhEPO acompanha e ainda aumenta a AD;
- 13- O treino reduz 5-HT no plasma, aumentando nas plaquetas e aumenta 5-HIAA no plasma, reduzindo nas plaquetas; a rhEPO promoveu grande aumento de ambos no plasma, sem alterar os efeitos do treino nas plaquetas; nem treino nem rhEPO afectam 5-HT e 5-HIAA neuroniais;
- 14- O treino não afecta os marcadores séricos de inflamação; a rhEPO tende a agravar o conteúdo de IL-2 e agrava o de TGF- β ;
- 15- O exercício melhora o estado redox (MDA/TAS) no soro, não alterado pela rhEPO; o Ex é pró-oxidante no músculo, agravado pela rhEPO.

B.11 – O caso do rato que sucumbiu em pleno esforço físico durante a sessão de treino

Na oitava semana de treino, sem que nada o fizesse prever, durante os minutos iniciais da sessão de treino aeróbio de intensidade moderada um rato do grupo Ex+EPO desfaleceu, todas as tentativas de reanimação revelaram-se infrutíferas. Na impossibilidade de colheita de sangue, procedeu-se à recolha, para histologia, de rins, pulmões, tecido cardíaco, cérebro e fígado.

Tendo em conta a maior relevância das alterações obtidas por H&E, comparativamente à técnica de PAS, apresentam-se os dados da primeira, interpretados com a ajuda do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

B.11.1 – Histomorfologia do tecido renal

No tecido renal observaram-se alterações da histomorfologia do rato que desfaleceu (B) comparativamente à de um rato controlo (A). Assim, na região glomerular (Fig. 39) vislumbrou-se maior permeabilidade da cápsula de Bowman e os túbulos renais contornados proximais (Fig. 40) dispunham eosinofilia e aumento do volume celular.

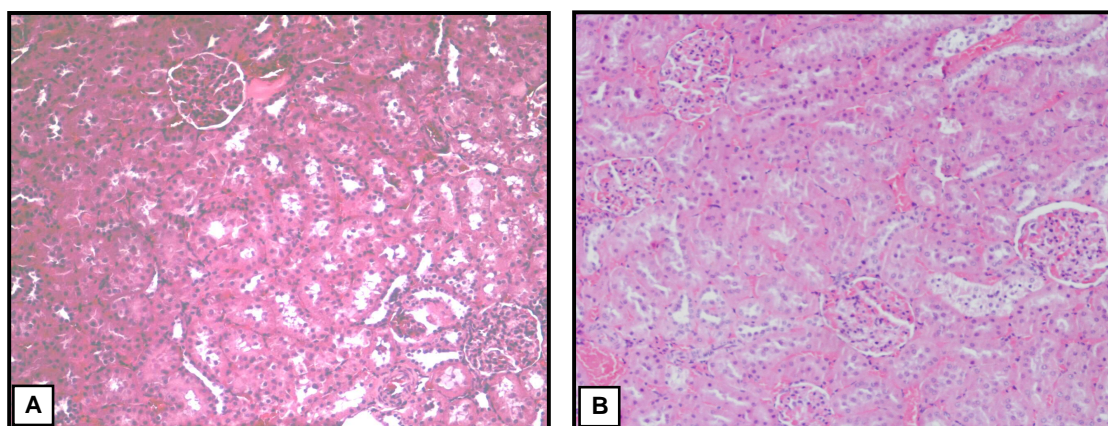


Fig. 39 – Histomorfologia renal (H&E) do rato que faleceu (B) *versus* rato de grupo controlo (A), com destaque para a morfologia glomerular (ampliação original x10).

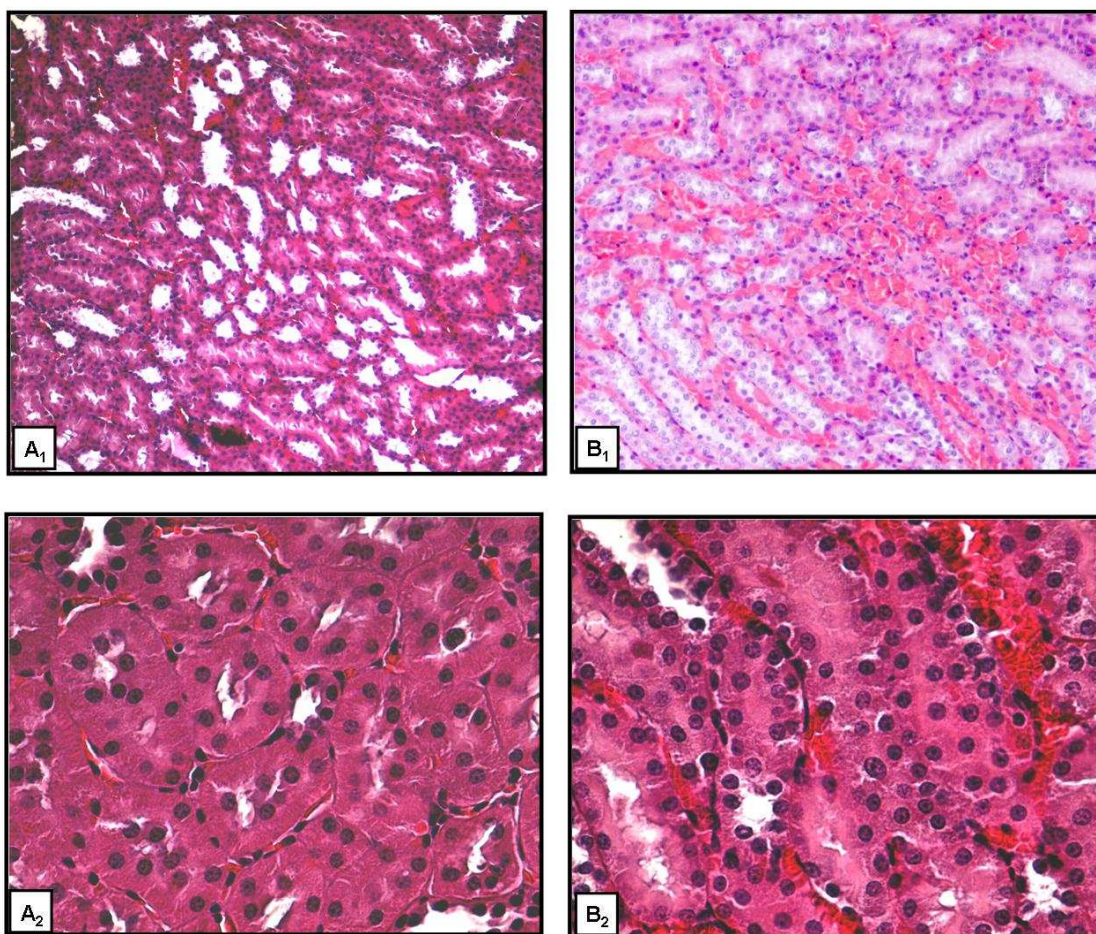


Fig. 40 – Histomorfologia renal (H&E) do rato que faleceu (B) *versus* rato do grupo controle (A) com destaque para a eosinofilia na foto superior direita (ampliação original x10 - 1) e para a congestão da região tubular, com aumento do volume celular, na foto inferior direita (ampliação original x40 - 2).

B.11.2 – Histomorfologia do tecido pulmonar

O pulmão não apresentava marcas de afogamento, exibia sinais de congestão vascular acentuada e de hemorragia e distensão alveolar, com anóxia (menos O₂ em detrimento de mais CO₂) (Fig. 41).

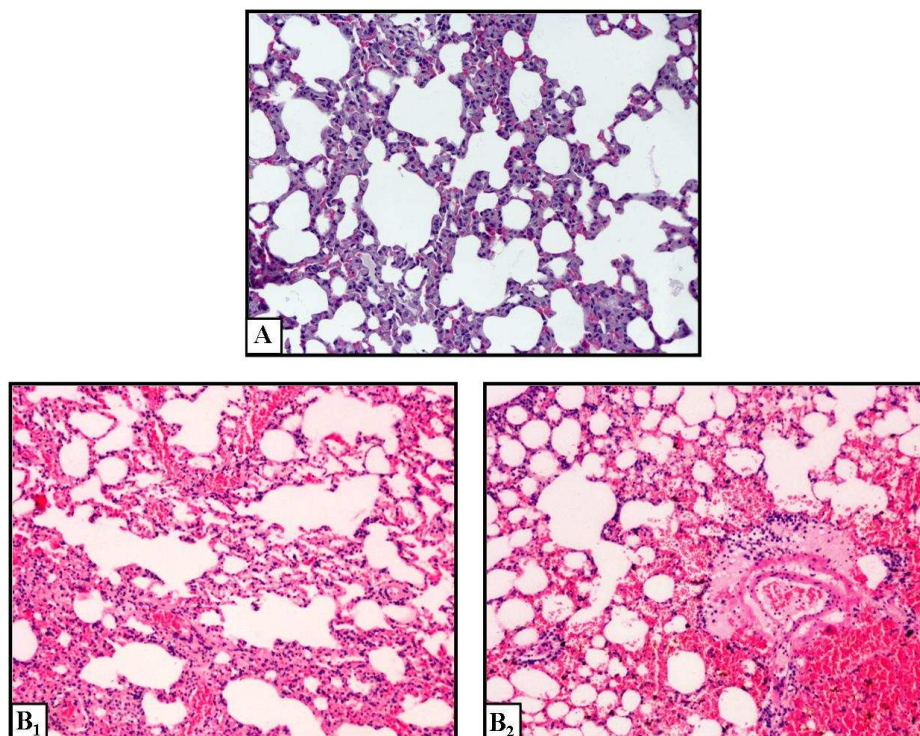


Fig. 41 – Histomorfologia do tecido pulmonar (H&E) do rato que faleceu, grupo Ex+EPO (B), *versus* um rato do grupo controlo (A), onde é evidente a presença de hemorragia e distensão alveolar (B₂).

B.11.3 – Histomorfologia do tecido cardíaco

O coração do rato que feneceu apresentava hipertrofia ventricular esquerda relativamente aos ratos do grupo Ex (Fig. 42), verificando-se ainda colagenização ligeira na parede do ventrículo.

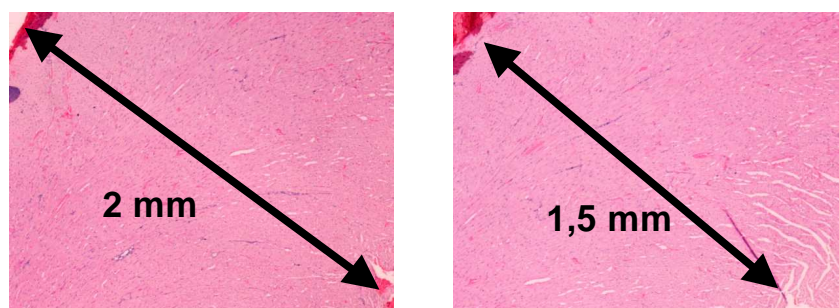


Fig. 42 – Histomorfologia do ventrículo esquerdo (H&E) do rato que faleceu (grupo Ex+EPO), apresentando uma espessura da parede ventricular (2 mm) superior à de um rato do grupo Ex (1,5 mm).

B.11.4 – Histomorfologia do tecido cerebral

O cérebro do rato que sucumbiu durante a sessão de treino apresentava congestão vascular generalizada decorrente de anóxia e isquémia (Fig. 43).

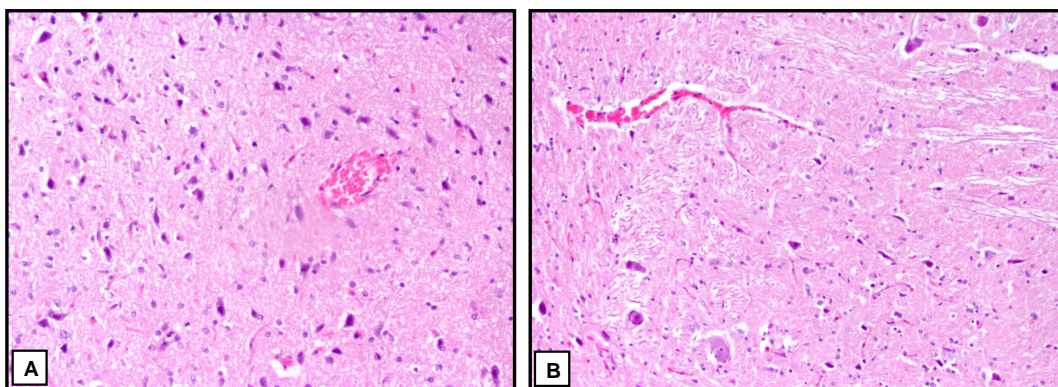


Fig. 43 – Histomorfologia do tecido neuronal de um rato controlo (A) e do rato que faleceu (B) (grupo Ex+EPO).

B.11.5 – Histomorfologia do tecido hepático

Verificou-se que o fígado se encontrava congestionado, com congestão centrolobular, designando-se, neste caso, de “fígado cardíaco”, apresentando ainda, distensão das veias centrolobulares e congestão sinusoidal, consequência de insuficiência cardíaca (Fig. 44).

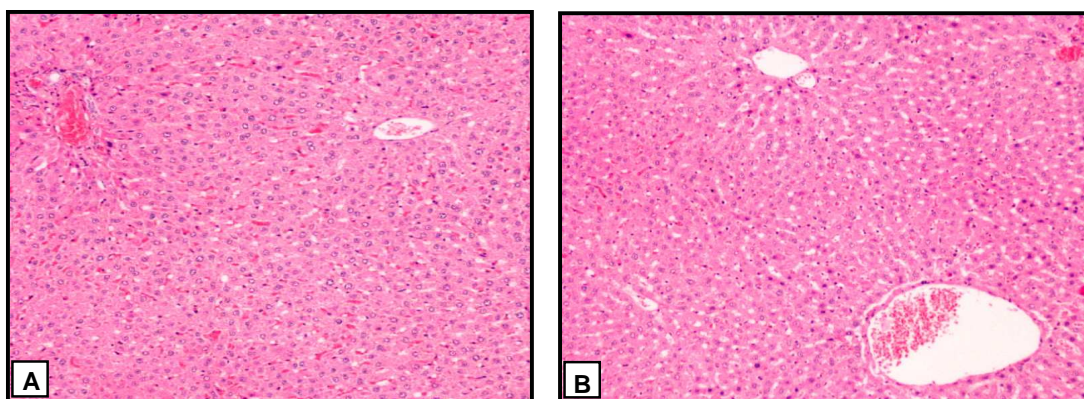


Fig. 44 – Histomorfologia do tecido hepático (H&E) de um rato controlo (A) e do rato que faleceu (B) (grupo Ex+EPO).

Estudo 2 – Efeitos da rhEPO em diferentes formas de exercício agudo (natação *versus* corrida)

1 – Duração dos exercícios por grupos

Os grupos (EPO+Ex) administrados com rhEPO resistiram em média mais 5-6 minutos, para ambas as modalidades (natação e corrida), que os grupos Ex. No caso da corrida verificou-se, ainda, uma maior distância percorrida, aproximadamente mais 16 metros (Tabela 19).

Tabela 19 – Dados relativos à duração da sessão

	Natação		Corrida	
	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
Duração exercício (min)	50,67±2,19	56,33±5,24	38,67±2,19	43,00±6,11
Distância percorrida (m)	N.A.	N.A.	662,67±30,69	678,33±75,08

Dados apresentados em médias ± e.p.m. N.A. – não aplicável na natação

2 – Hemograma

Os 2 tipos de exercícios apresentaram um valor idêntico de eritrócitos, mas enquanto que a adição de rhEPO originou uma redução na natação ($P<0,01$), na corrida não promoveu alteração de relevo (Fig. 45).

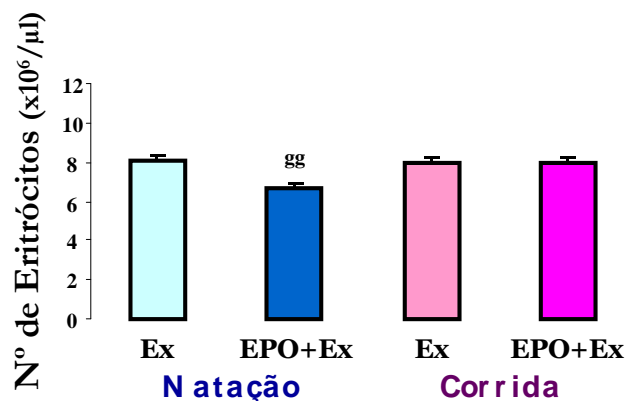


Fig. 45 – Número de eritrócitos, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^{gg}P<0,01 entre os grupos da Natação.

A descrição do gráfico feita anteriormente para o número de eritrócitos, é reproduzível agora, quer para o hematócrito, quer para a concentração de hemoglobina, uma vez que os valores dos grupos sem fármaco foram idênticos, e a adição de rhEPO reduziu os valores na natação (P<0,01) e não alterou significativamente na corrida (Figs. 46 e 47).

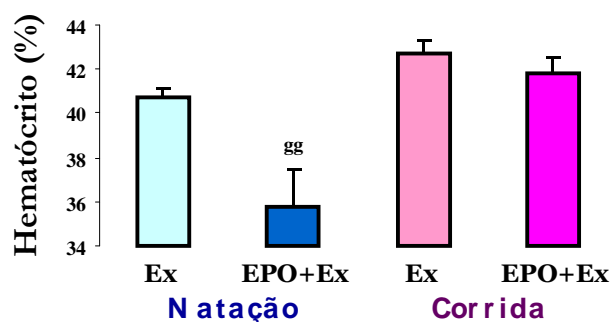


Fig. 46 – Hematócrito, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^{gg}P<0,01 entre os grupos da Natação.

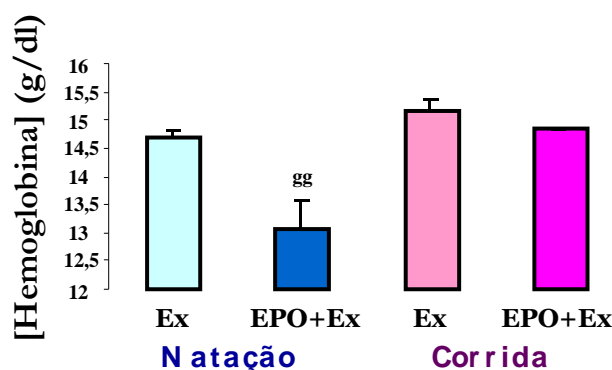


Fig. 47 – Concentração de hemoglobina, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{gg}P<0,01 entre os grupos da Natação.

Para a HCM, a CHCM e o VCM o grupo EPO+Ex da natação obteve aumentos (tendencias ou significativos) face ao grupo Ex, enquanto que para a corrida se constatarem valores idênticos para os dois grupos. Já para o CVE ocorreu o oposto, com redução no grupo com rhEPO na natação, sem alteração na corrida (Tabela 20). As diferenças entre os grupos Ex residiram num aumento (P<0,05) de VCM e diminuição (P<0,01) de CVE na corrida relativamente à natação.

O panorama plaquetar, examinado pelo número de plaquetas, detectou níveis idênticos nos grupos Ex das duas modalidades, aumento considerável no grupo EPO+Ex da natação (P<0,01 *versus* Ex) e diminuição no grupo EPO+Ex da corrida (Tabela 20). Para o VPM e para o CVP, o figurino anterior inverteu-se com a adição de rhEPO a reduzir na natação e a aumentar na corrida, mas apenas tendencialmente, sem significado estatístico. Os grupos da natação registaram valores tendencialmente superiores de PCT em comparação com os grupos da corrida, incapazes de atribuição de significância estatística.

A percentagem de reticulócitos foi semelhante para os grupos Ex das duas modalidades, tendo a administração de rhEPO (grupos EPO+Ex) resultado em uma redução acentuada na prova de natação aguda, sem alteração na corrida.

O grupo Ex da natação obteve um número de leucócitos tendencialmente acrescido face ao grupo Ex da corrida, apresentando os grupos EPO+Ex valores tendencialmente inferiores que os seus parceiros (grupos Ex).

Tabela 20 – Dados remanescentes hemograma: efeito da rhEPO em 2 tipos de exercício agudo

	Natação		Corrida	
	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
Eritrocitários				
HCM (pg)	18,07 ± 0,43	19,70 ± 0,20 [§]	19,07 ± 0,26	18,63 ± 0,47
CHCM (g/dl)	35,97 ± 0,19	36,55 ± 0,25	35,60 ± 0,06	35,40 ± 0,49
VCM (fl)	50,27 ± 0,92	53,90 ± 0,90 [§]	53,57 ± 0,84 ^h	52,60 ± 0,91
CVE (%)	15,80 ± 0,60	13,55 ± 0,45 [§]	13,57 ± 0,32 ^{hh}	14,87 ± 0,34
Plaquetares				
N.º Pla. (x10 ³ /µl)	993,3 ± 40,68	1223,5 ± 144,50 [§]	929,0 ± 69,00	774,0 ± 18,23
PCT (%)	0,54 ± 0,01	0,64 ± 0,08	0,44 ± 0,06	0,46 ± 0,01
VPM (fl)	5,50 ± 0,17	5,25 ± 0,05	5,87 ± 0,47	5,93 ± 0,23
CVP (%)	16,17 ± 0,43	15,70 ± 0,01	16,47 ± 0,58	16,63 ± 0,46
Reticulocitários (%)				
Contador	0,27 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,34 ± 0,12
Leucocitários				
N.º Leuc. (x10 ³ /µl)	1,63 ± 0,41	0,80 ± 0,10	1,17 ± 0,22	1,03 ± 0,24

Dados apresentados em médias ± e.p.m. [§]P<0,05; ^{§§}P<0,01 entre os grupos da Natação. ^hP<0,05; ^{hh}P<0,01 vs. Ex Natação.

3 – Concentração sérica de EPO

As concentrações séricas de EPO mais expressivas abrangeram os grupos EPO+Ex da natação e da corrida (29,92 ± 0,83 e 32,00 ± 3,75 pg/ml, respectivamente), criando diferenças estatisticamente significativas em comparação com os grupos Ex da devida modalidade (P<0,001 e P<0,01; correspondentemente) nos quais as concentrações foram idênticas (Fig. 48).

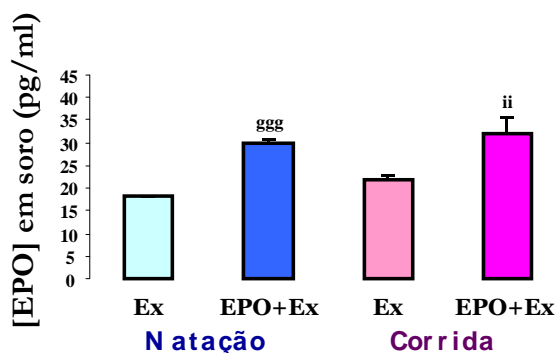


Fig. 48 – Concentração sérica de EPO, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{ggg}P<0,001 entre os grupos da Natação. ⁱⁱP<0,01 vs. Ex Corrida.

4 – Metabolismo do ferro

Relativamente à concentração de ferro no soro, os 2 exercícios sem rhEPO mostraram valores idênticos, sendo que a adição de rhEPO promoveu um aumento acentuado na natação (P<0,01 *versus* Ex) mas não na corrida (Fig. 49).

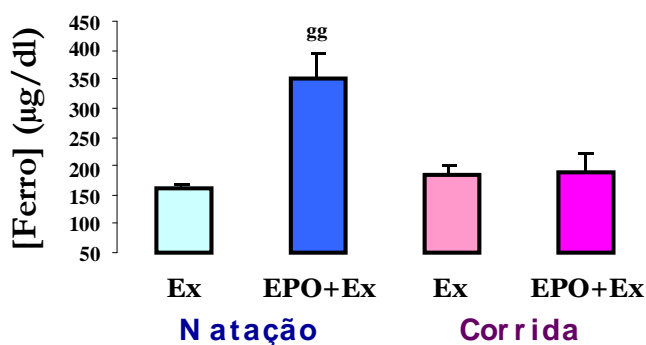


Fig. 49 – Concentração sérica de ferro, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem, via subcutânea) Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{gg}P<0,01 entre os grupos da Natação.

Para a ferritina, não se autenticaram alterações estatisticamente significativas, obtendo os grupos da natação valores superiores, aos da corrida (Ex = $164,83 \pm 32,46$ e EPO+Ex = $162,10 \pm 51,20$ ng/dl), apenas em termos numéricos e não estatísticos (Fig. 50).

No que diz respeito à transferrina, lograram-se concentrações superiores nos grupos da corrida (Ex = $123,33 \pm 3,84$ e EPO+Ex = $124,50 \pm 3,50$ mg/dl) relativamente aos da natação (Ex = $106,00 \pm 5,13$ e EPO+Ex = $108,00 \pm 2,52$ mg/dl), proclamando $P < 0,05$ a diferença entre os grupos Ex. A adição de rhEPO não promoveu modificações face aos grupos Ex das duas modalidades (Fig. 51).

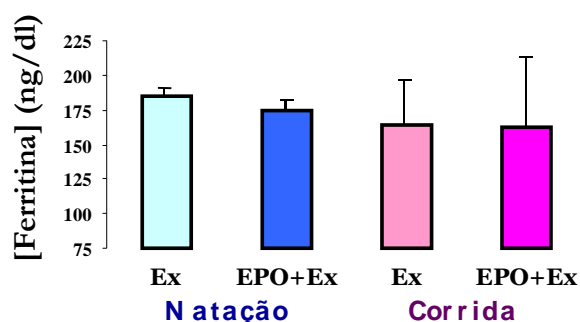


Fig. 50 – Concentração sérica de ferritina, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

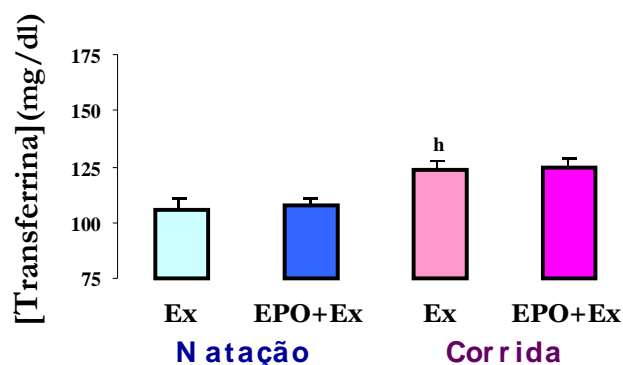


Fig. 51 – Concentração sérica de transferrina, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^h $P < 0,05$ vs. Ex Natação.

5 – Bioquímica

O grupo Ex da corrida apresentou uma concentração de glicose tendencialmente superior à do grupo homólogo da natação. Os grupos EPO+Ex da natação e da corrida compreenderam concentrações de glicose mais elevadas que as dos grupos Ex adjacentes, que apenas não se concretizaram em variações significativas devido aos desvios elevados dos grupos (Tabela 21).

A função renal, expressa pela concentração de creatinina e de ácido úrico, foi idêntica na corrida e natação, sendo que para o azoto ureico se verificaram valores inferiores na corrida ($P < 0,05$ entre grupo Ex da corrida *versus* Ex da natação). A adição de rhEPO não alterou significativamente o comportamento verificado para os grupos Ex das duas modalidades (Tabela 21).

Tabela 21 – Bioquímica

	Natação		Corrida	
	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
[Glicose] (mg/dl)	187,67 ± 21,07	243,00 ± 14,73	203,00 ± 55,30	258,33 ± 16,18
<i>Função Renal</i>				
[Azoto Ureico] (mg/dl)	22,57 ± 1,17	21,57 ± 0,92	18,93 ± 1,28 ^h	18,17 ± 0,82
[Creatinina] (mg/dl)	0,63 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,68 ± 0,01	0,65 ± 0,01
[Ácido Úrico] (mg/dl)	1,03 ± 0,09	0,83 ± 0,30	1,33 ± 0,30	1,53 ± 0,64
<i>Marcadores Hepáticos</i>				
[TGP] (UI/l)	37,67 ± 5,17	33,67 ± 2,03	35,33 ± 5,46	33,00 ± 4,16
[TGO] (UI/l)	101,67 ± 8,95	82,67 ± 13,54	107,33 ± 30,01	106,33 ± 15,90
[CK] (UI/l)	590,7 ± 36,79	375,0 ± 130,71	672,3 ± 398,78	570,7 ± 143,71
<i>Perfil Lipídico</i>				
Total-c (mg/dl)	61,67 ± 4,84	58,33 ± 13,64	52,67 ± 4,26	48,33 ± 1,45
HDL-c (mg/dl)	42,67 ± 4,10	42,67 ± 10,73	35,67 ± 3,71	32,67 ± 1,67
LDL-c (mg/dl)	18,00 ± 2,89	11,67 ± 1,67 ^s	11,33 ± 1,86 ^h	10,33 ± 0,33
TGs (mg/dl)	136,33 ± 11,29	100,33 ± 13,64	136,33 ± 34,91	147,00 ± 27,50

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^sP<0,05 entre os grupos da Natação. ^hP<0,05 vs. Ex Natação.

Para a TGP e a TGO, os exercícios apresentaram valores similares, assistindo-se a uma redução tendencial nos grupos EPO+Ex face aos grupos Ex, para as duas

modalidades, contudo sem compleição de simbologia estatística. O mesmo se poderá aplicar para a actividade da CK, embora neste caso sejam os valores altíssimos de e.p.m. a justificar essa omissão (Tabela 21).

Os valores inerentes ao perfil lipídico, criaram a noção de uma redução implícita, não significativa, na corrida face à natação, nomeadamente para o Total-c, o HDL-c e o LDL-c, mas não para os TGs. O efeito da rhEPO manifestou-se por uma redução significativa de LDL-c ($P < 0,05$) e tendencial de TGs na natação, e um aumento não significativo dos TGs na corrida (Tabela 21).

6 – Sistema nervoso simpático

6.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas

Constatou-se que a concentração plasmática de NA foi mais elevada para a grupos da natação (Ex = $3,91 \pm 0,85$ ng/ml e EPO+Ex = $5,29 \pm 1,94$ ng/ml) do que para os pertencentes à corrida, insuficiente para determinação de singularidade estatística (Fig. 52) A adição de rhEPO tendeu a aumentar a concentração de NA em ambos os protocolos.

O comportamento, a nível plaquetar assumiu um panorama distinto, isto é, a concentração de NA foi superior nos grupos Ex relativamente aos seus homólogos EPO+Ex, sem, contudo, se terem estabelecido diferenças estatisticamente significativas (Fig. 52).

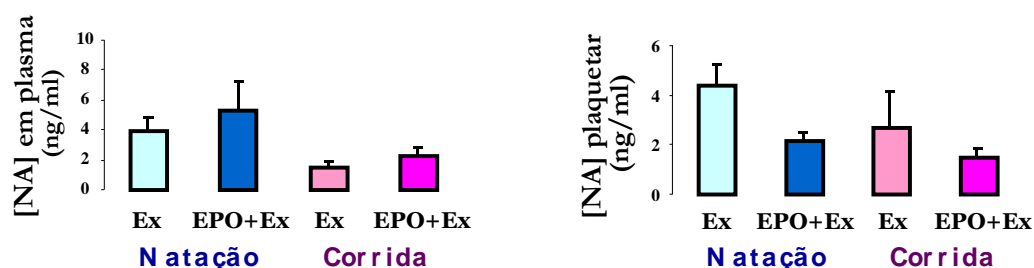


Fig. 52 – Concentrações plasmáticas e plaquetares de NA, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m.

No que concerne à concentração plasmática de AD, sobressaiu a resposta desigual que os grupos EPO+Ex evidenciaram: na natação com semblante dominante ($4,60 \pm 0,41$ ng/ml) face ao grupo Ex ($P < 0,01$) e na corrida de forma mais escassa ($1,15 \pm 0,29$ ng/ml) em relação ao mesmo protocolo sem rhEPO (Fig. 53).

Em termos plaquetares, a concentração de AD apresentou variações subtis, mas em sentido oposto, com valores tendencialmente mais elevados nos grupos da corrida (Fig. 53), e com a rhEPO a apresentar valores numericamente mais elevados do que os congêneres sem rhEPO.

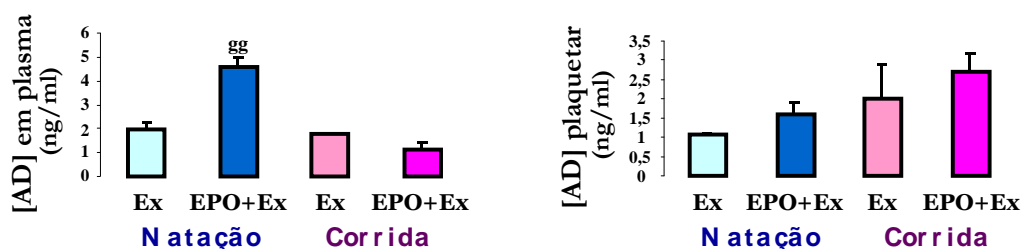


Fig. 53 – Concentrações plasmáticas e plaquetares de AD, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^{gg}P<0,01 entre os grupos da Nataação.

6.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas

A natação realizada numa única sessão, extenuante, promoveu, nas SRs, níveis de NA, AD e DA semelhantes nos grupos sem e com rhEPO, sendo que para a corrida houve um aumento tendencial no grupo EPO+Ex face ao grupo Ex. Apesar dos valores numéricos muito superiores de NA, AD e DA na natação *versus* corrida, a diferença entre as duas modalidades, só no caso da DA e entre os grupos Ex, justificou o aparecimento de significância estatística ($P < 0,01$) (Tabela 22).

As concentrações de NA e AD, no rim, indicaram incrementos nos grupos EPO+Ex relativamente aos grupos Ex, tendo, no caso da AD e para corrida em regime agudo, constituído alteração significativa estatisticamente ($P < 0,05$). Para a DA, os valores obtidos pelos grupos da corrida foram inferiores aos da natação ($P < 0,05$ em Ex *versus* Ex).

No VE, as concentrações de NA e DA não produziram resultados merecedores de atributo estatístico, sendo de notar a tendência para os grupos EPO+Ex registarem valores inferiores aos dos Ex, o que é válido para a natação e para a corrida. Para a AD, os grupos da corrida sobrepuseram-se aos da natação, especialmente o grupo Ex que além de $P < 0,01$ face ao grupo Ex da natação, apresentou também $P < 0,05$ face ao seu congénere (grupo EPO+Ex) da corrida.

Tabela 22 – Concentrações tecidulares de catecolaminas: suprarrenais, rim, ventrículo esquerdo, aorta e cérebro

	Natação		Corrida	
	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
SRs				
NA ($\mu\text{g/g}$)	188,28 \pm 11,01	188,09 \pm 96,69	96,89 \pm 24,06	158,39 \pm 16,14
AD ($\mu\text{g/g}$)	864,99 \pm 107,57	778,46 \pm 423,56	411,46 \pm 117,43	645,04 \pm 40,42
DA ($\mu\text{g/g}$)	6,69 \pm 0,40	4,43 \pm 2,49	1,87 \pm 0,45 ^{hh}	4,04 \pm 0,45
Rim				
NA ($\mu\text{g/g}$)	0,17 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02	0,21 \pm 0,03	0,24 \pm 0,05
AD ($\mu\text{g/g}$)	0,16 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,15 \pm 0,04	0,28 \pm 0,04 ⁱ
DA ($\mu\text{g/g}$)	0,02 \pm 0,003	0,01 \pm 0,002	0,008 \pm 0,002 ^h	0,006 \pm 0,002
VE				
NA ($\mu\text{g/g}$)	0,48 \pm 0,11	0,43 \pm 0,07	0,48 \pm 0,01	0,45 \pm 0,05
AD ($\mu\text{g/g}$)	0,10 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03 ^{hh}	0,16 \pm 0,01 ⁱ
DA ($\mu\text{g/g}$)	0,03 \pm 0,008	0,01 \pm 0,004	0,02 \pm 0,007	0,02 \pm 0,009
Aorta				
NA ($\mu\text{g/g}$)	0,76 \pm 0,08	0,37 \pm 0,09	0,45 \pm 0,11	1,25 \pm 0,41 ⁱ
AD ($\mu\text{g/g}$)	0,98 \pm 0,21	0,75 \pm 0,40	0,61 \pm 0,05	1,88 \pm 1,01
DA ($\mu\text{g/g}$)	0,04 \pm 0,010	0,007 \pm 0,003 ^g	0,003 \pm 0,001 ^{hh}	0,007 \pm 0,004
Cérebro				
NA ($\mu\text{g/g}$)	0,16 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02
AD (ng/g)	3,95 \pm 0,06	10,35 \pm 2,25 ^g	7,57 \pm 1,40	5,90 \pm 1,57
DA ($\mu\text{g/g}$)	0,49 \pm 0,04	0,55 \pm 0,07	0,49 \pm 0,02	0,55 \pm 0,04

Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ^g $P < 0,05$ entre os grupos da Natação. ^h $P < 0,05$; ^{hh} $P < 0,01$ vs. Ex Natação. ⁱ $P < 0,05$ vs. grupo Ex Corrida.

Relativamente à aorta, as concentrações de NA, AD e de DA apresentaram, no caso da natação predominância no grupo Ex e no caso da corrida do grupo EPO+Ex, ou

seja, a adição de rhEPO promoveu redução na natação e aumento na corrida. Algumas das variações foram apenas tendenciais e não confirmações estatísticas.

Na sua generalidade, o conteúdo cerebral apresentou aumentos das concentrações nos grupos EPO+Ex das duas modalidades (com exceção da AD na corrida), imperceptíveis ao escrutínio da relevância estatística, excepto para a AD na natação (Tabela 22).

7 – Sistema serotoninérgico

7.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA

Do gráfico relativo à concentração plasmática de 5-HT sobressaiu extraordinariamente o grupo EPO+Ex ($533,39 \pm 60,73$ ng/ml; $P < 0,001$ *versus* Ex) da natação (Fig. 54).

Para o 5-HIAA, as concentrações plasmáticas dos diferentes grupos e das duas modalidades não se distanciaram significativamente, nem estatisticamente, sendo de frisar que os grupos EPO+Ex (natação: $21,72 \pm 0,62$ ng/ml e corrida: $21,62 \pm 1,51$ ng/ml) obtiveram ligeiros aumentos *versus* os grupos Ex (Fig. 54).

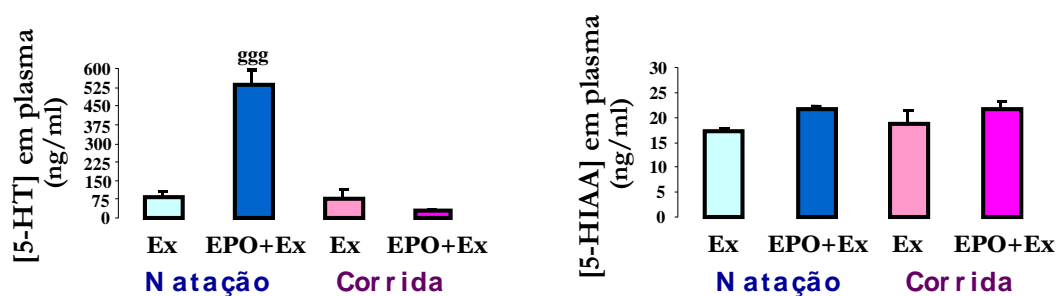


Fig. 54 – Concentrações plasmáticas de 5-HT e de 5-HIAA, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^{ggg}P<0,001 entre os grupos da Natação.

Os grupos, na sequência apresentada no gráfico (Fig. 55), manifestaram concentrações de 5-HT plaquetares progressivamente menores (sendo os extremos: Ex

= 1122,25 ± 135,87 ng/ml e EPO+Ex = 528,82 ± 104,86 ng/ml), incapazes, no entanto, de adjudicar exorbitância estatística.

No que diz respeito à concentração plaquetar de 5-HIAA, não se vislumbraram diferenças entre os grupos sem rhEPO (natação: 4,34 ± 0,74 ng/ml e corrida: 4,74 ± 0,91 ng/ml). Os grupos EPO+Ex registaram concentrações inferiores, concebendo, no caso da natação, uma contenda significativa em termos estatísticos *versus* Ex sem rhEPO (P<0,05) (Fig. 55).

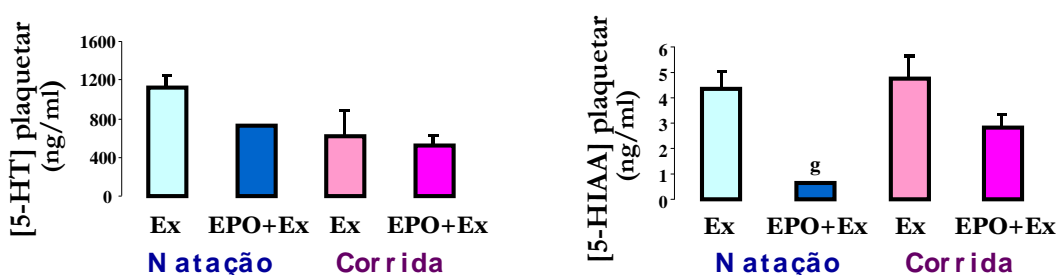


Fig. 55 – Concentrações plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^gP<0,05 entre os grupos da Natação.

7.2 – Conteúdo de 5-HT e de 5-HIAA no cérebro

Os grupos submetidos às sessões extenuantes, tanto da natação como da corrida, e com administração concomitante de rhEPO (EPO+Ex) apresentaram, no cérebro, valores de 5-HT e de 5-HIAA apenas tendencialmente superiores aos dos seus congêneres (grupos Ex), à exceção da natação para o 5-HIAA (Tabela 23).

Tabela 23 – Concentrações neuronais de 5-HT e de 5-HIAA

	Natação		Corrida	
	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
Cérebro				
5-HT (µg/g)	0,14 ± 0,04	0,21 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,02
5-HIAA (µg/g)	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,30 ± 0,06

Dados apresentados em médias ± e.p.m.

8 – Equilíbrio oxidativo

Para ambas as categorias efectuadas no soro (MDA e TAS), as diferenças entre os grupos não confluíram para o desenvolvimento de significados estatísticos. Contudo, realça-se que se no caso da concentração de MDA, o grupo EPO+Ex ($0,22 \pm 0,13 \mu\text{M}$), da natação, apresentou um valor numérico inferior ao do grupo Ex ($0,29 \pm 0,08 \mu\text{M}$), enquanto na corrida se verificou o contrário, com o grupo EPO+Ex ($0,36 \pm 0,06 \mu\text{M}$) a registar um valor superior ao do grupo Ex ($0,29 \pm 0,09 \mu\text{M}$) (Fig. 56).

Já para a concentração sérica de TAS, o comportamento dos grupos EPO+Ex (natação: $0,65 \pm 0,20$ e corrida: $0,71 \pm 0,03 \text{ mM}$) das duas modalidades esteve em consonância (Fig. 56), sendo os valores superiores em termos estritamente numéricos e não estatísticos aos dos respectivos grupos Ex ($0,45 \pm 0,14$ natação e $0,56 \pm 0,12 \text{ mM}$ corrida).

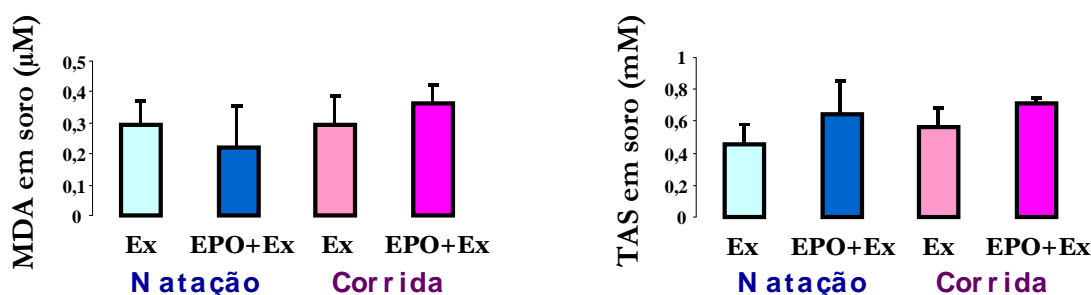


Fig. 56 – MDA e TAS no soro, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m.

No músculo, os valores de MDA e TAS proporcionaram variações não significativas do ponto de vista estatístico. Os grupos EPO+Ex obtiveram concentrações de MDA mais reduzidas (não significativas) que as dos grupos Ex (natação: $1,04 \pm 0,30$ e corrida: $1,82 \pm 0,61 \mu\text{M}$), da respectiva modalidade, ou seja, a corrida por si só, nesta sessão extenuante, agravou os valores de MDA muscular face à natação. Já para a concentração de TAS verificou-se uma inversão em termos quantitativos, tendo a

natação registado uma ligeira predominância em relação à corrida; os grupos EPO+Ex (natação: $0,65 \pm 0,20$ e corrida: $0,71 \pm 0,04$ mM) anotaram acréscimos, uma vez mais só tendenciais, face aos correspondentes grupos Ex (Fig. 57).

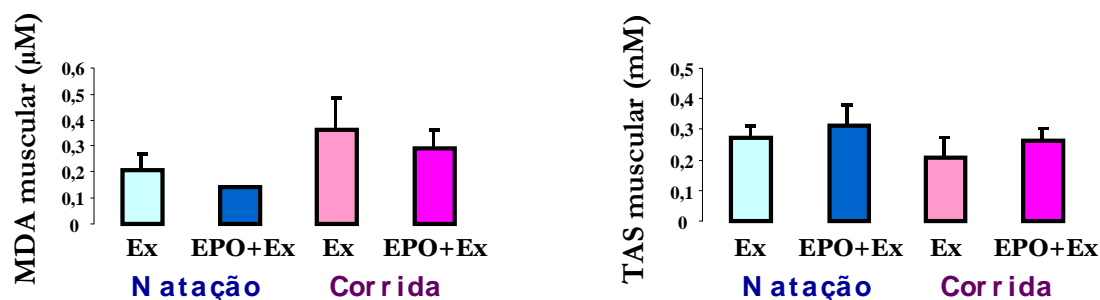


Fig. 57 – MDA e TAS no músculo, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

Para a razão MDA/TAS, apurou-se que a nível do soro e do músculo os grupos da corrida aferiram concentrações superiores aos da natação e que os grupos EPO+Ex registaram incidências inferiores aos dos grupos Ex, contudo, exíguas para desencadear significâncias estatísticas. (Fig. 58).

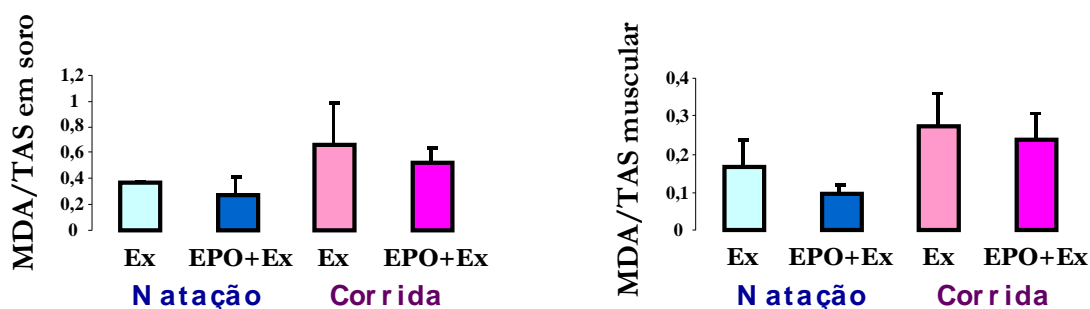


Fig. 58 – Razão MDA/TAS no soro e no músculo, em ratos submetidos a sessão extenuante, em 2 modalidades diferentes (n=3 cada): natação e corrida (passadeira), sem e com administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m.

Em resumo, os efeitos da administração de rhEPO em duas formas de exercício agudo originaram as seguintes manifestações:

- 1 – Os grupos administrados com rhEPO resistiram mais tempo, tanto na natação como na corrida; nesta última, a distância percorrida foi também superior;
- 2 – Os grupos da natação e da corrida obtiveram valores similares de eritrócitos; a adição de rhEPO atenua significativamente na natação, sem efeito na corrida;
- 3 – O mesmo efeito foi obtido para o HCT e Hb: a corrida tende para valores superiores *vs* natação; a rhEPO corrige de forma significativa na natação;
- 4 – Corrida apresenta VCM superior e inferior de CVE face à natação; EPO+Ex da natação corrige CVE mas agrava HCM, VCM e número de plaquetas;
- 5 – Os grupos EPO+Ex apresentam concentrações séricas de EPO superiores às dos respectivos exercícios;
- 6 – A natação apresenta concentração de ferritina superior; o efeito da adição de rhEPO só se manifestou através do aumento do conteúdo em ferro na natação;
- 7 – A glicemia foi tendencialmente superior na corrida *vs* natação; a adição de rhEPO promove aumento em ambas as modalidades;
- 8 – A corrida apresentou um valor inferior de azoto ureico e tende para níveis superiores de ácido úrico; a rhEPO não afecta bioquímica renal; função hepática idêntica entre exercícios; EPO+Ex na natação tende a atenuar TGO e CK *vs* Ex;
- 9 – O Total-c e LDL-c tendem a ser superiores na natação, ao contrário do HDL-c; rhEPO na natação corrige LDL-c e tende a atenuar TGs, sem efeito na corrida;
- 10 – Na natação a NA plasmática e plaquetar tende a ser superior *vs* corrida; a adição de rhEPO tende a agravar no plasma e a corrigir nas plaquetas, em ambos os Ex; o conteúdo de AD plasmática foi idêntico entre os 2 exercícios; a rhEPO agrava estes níveis, sobretudo no plasma;
- 11 – Na natação as concentrações de CAs são superiores nas SRs e aorta *vs* corrida, que, por sua vez, apresenta níveis superiores de AD no VE e cérebro; na natação a rhEPO atenua parcialmente aqueles valores elevados nas SRs e aorta e promove no cérebro uma redução de DA e um aumento de AD; na corrida a rhEPO atenua aumento de AD no VE e cérebro e origina aumentos nas SRs e aorta;

- 12 – Os valores de 5-HT e 5-HIAA no plasma, plaquetas e cérebro são idênticos entre natação e corrida; na natação a rhEPO aumenta valores no plasma e cérebro (para 5-HT) e reduz nas plaquetas; na corrida a rhEPO não tem efeitos significativos;
- 13 – A corrida apresenta uma razão indicadora do estado redox (MDA/TAS) tendencialmente superior à natação, tanto em soro como no músculo; a rhEPO tende para uma actividade antioxidante, quer no músculo quer no soro, em ambos os exercícios.

Estudo 3 – Efeitos da rhEPO no exercício (natação) crónico *versus* agudo

Neste capítulo comparam-se os resultados obtidos nos estudos anteriores, os efeitos da administração da rhEPO no exercício (natação) crónico e no agudo, apresentando os valores auferidos nos diferentes parâmetros para os grupos Ex e EPO+Ex em cada protocolo.

1 – Hemograma

O treino crónico e a sessão aguda não diferiram no número de eritrócitos, o grupo EPO+Ex do treino crónico apresentou um número de eritrócitos ($8,23 \pm 0,14 \times 10^6/\mu\text{l}$; $P < 0,05$) acrescido em relação ao grupo Ex ($7,59 \pm 0,15 \times 10^6/\mu\text{l}$), contrastando com a redução ($P < 0,01$) obtida no grupo EPO+Ex relativamente ao grupo Ex, da sessão aguda (Fig. 59).

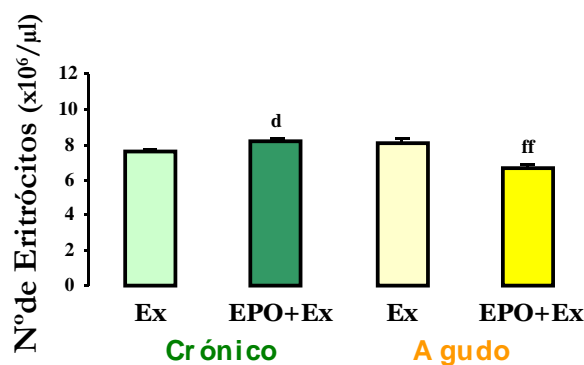


Fig. 59 – Número de eritrócitos, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^d $P < 0,05$ entre os grupos do treino crónico. ^{ff} $P < 0,01$ vs. Ex Agudo.

O hematócrito demonstrou valores semelhantes para os grupos Ex crónico ($41,40 \pm 0,82 \%$) e agudo ($40,73 \pm 0,42 \%$), com valores tendencialmente superiores no grupo EPO+Ex crónico e significativamente ($P < 0,05$) inferiores no grupo EPO+Ex agudo (Fig. 60).

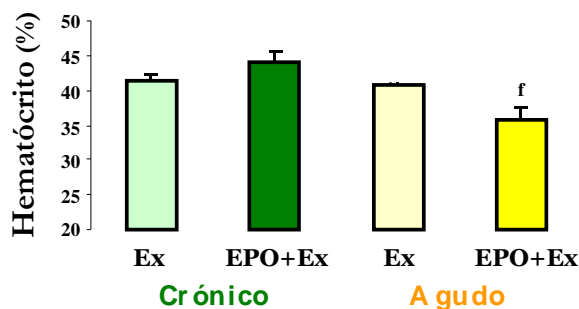


Fig. 60 – Hematócrito, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^f $P < 0,05$ vs. Ex Agudo.

A concentração de hemoglobina apresentou um padrão de resposta similar ao do hematócrito, com os seguintes valores numéricos: Ex crónico = $14,86 \pm 0,25$ g/dl; EPO+Ex crónico = $15,45 \pm 0,45$ g/dl; Ex agudo = $14,70 \pm 0,11$ g/dl; EPO+Ex agudo = $13,05 \pm 0,55$ g/dl; $P < 0,05$ versus Ex agudo (Fig. 61).

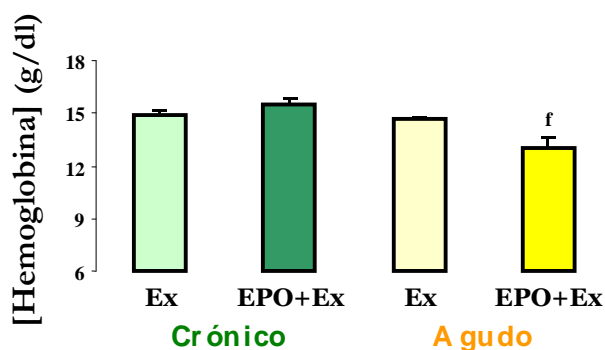


Fig. 61 – Concentração de hemoglobina, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^f $P < 0,05$ vs. Ex Agudo.

Relativamente aos parâmetros eritrocitários: o exercício agudo apresentou valores de HCM e VCM significativamente ($P < 0,05$) menores ao do grupo congénere (Ex crónico). A administração de rhEPO no exercício crónico promoveu reduções significativas de CHCM ($P < 0,05$) e tendencial de HCM e VCM. No treino agudo, por sua vez, o tratamento com rhEPO resultou em aumento da HCM ($P < 0,05$), de CHCM e na redução de CVE (Tabela 24).

Da leitura feita aos parâmetros plaquetares (Tabela 24), constata-se que não existe diferença significativa entre os 2 tipos de exercício. Os grupos EPO+Ex apresentam incrementos tendenciais relativamente aos grupos Ex, independentemente da índole do exercício físico, sendo o aumento do número de plaquetas no grupo EPO+Ex agudo significativo *versus* Ex agudo ($P < 0,05$).

Tabela 24 – Dados remanescentes hemograma: efeitos rhEPO no exercício crónico *versus* exercício agudo

	Crónico		Agudo	
	Ex (n=7)	EPO+Ex (n=7)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
<i>Eritrocitários</i>				
HCM (pg)	19,60 ± 0,34	18,75 ± 0,25	18,07 ± 0,43 ^d	19,70 ± 0,20 ^f
CHCM (g/dl)	35,93 ± 0,21	35,05 ± 0,05 ^d	35,97 ± 0,19	36,55 ± 0,25
VCM (fl)	54,61 ± 1,13	53,56 ± 0,85	50,27 ± 0,92 ^d	53,90 ± 0,90
CVE (%)	14,84 ± 0,55	14,25 ± 0,15	15,80 ± 0,60	13,55 ± 0,45
<i>Plaquetares</i>				
N.º Pla. (x10 ³ /µl)	1008,4 ± 35,9	1021,0 ± 57,0	993,3 ± 40,7	1223,5 ± 144,5 ^f
PCT (%)	0,57 ± 0,02	0,60 ± 0,07	0,54 ± 0,01	0,64 ± 0,08
VPM (fl)	5,63 ± 0,14	5,85 ± 0,35	5,50 ± 0,17	5,25 ± 0,05
CVP (%)	16,37 ± 0,26	17,00 ± 0,10	16,17 ± 0,43	15,70 ± 0,01
<i>Reticulocitários (%)</i>				
Contador	5,46 ± 0,29	4,31 ± 0,73	0,27 ± 0,02 ^{dd}	0,06 ± 0,03 ^{ff}
<i>Leucocitários</i>				
N.º Leuc. (x10 ³ /µl)	1,13 ± 0,23	1,55 ± 0,75	1,63 ± 0,41	0,80 ± 0,10

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^d $P < 0,05$; ^{dd} $P < 0,01$ entre os grupos do treino crónico. ^f $P < 0,05$; ^{ff} $P < 0,01$ vs. grupo Ex Agudo.

No que diz respeito aos reticulócitos, observaram-se registos similares no exercício crónico, contrastando com a sessão aguda, que denotou percentagens diminutas, incorrendo assim em desígnios estatísticos significativos (entre grupos Ex: $P < 0,01$ e entre grupos do acto agudo: $P < 0,01$).

O número de leucócitos variou de forma descoordenada, com um valor tendencialmente mais elevado no Ex agudo do que no Ex crónico, e com a rhEPO a promover um aumento tendencial *versus* Ex crónico e redução *versus* Ex agudo.

2 – Concentração sérica de EPO

A concentração de EPO no grupo Ex ($27,83 \pm 1,50$ pg/ml) do treino crónico foi substancialmente superior ($P < 0,01$) à do grupo Ex ($18,25 \pm 0,10$ pg/ml) da sessão aguda, não tendo sofrido alterações quando a rhEPO foi administrada cronicamente (Ex *versus* EPO+Ex), mas promovendo um aumento acentuado quando foi aplicada em treino agudo ($P < 0,01$ *versus* Ex agudo) (Fig. 62).

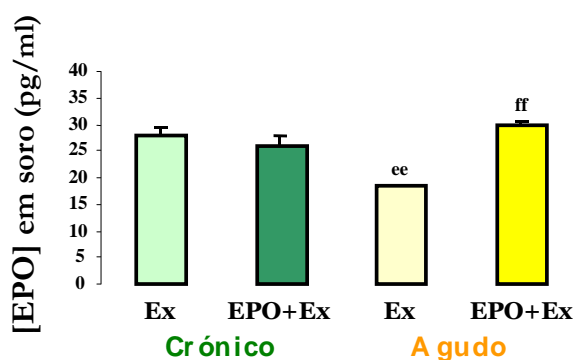


Fig. 62 – Concentrações séricas de EPO, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^{ee} $P < 0,01$ vs. Ex Crónico. ^{ff} $P < 0,01$ vs. Ex Agudo.

3 – Metabolismo do ferro

Da comparação entre os grupos sujeitos a treino crónico e a sessão única extenuante, ressalta a percepção de que o valor da concentração de ferro no soro mais modificado foi o do grupo EPO+Ex ($350,67 \pm 43,11 \mu\text{g/dl}$) do acto agudo, sendo altamente significativo em relação a Ex agudo ($P < 0,001$) (Fig. 63).

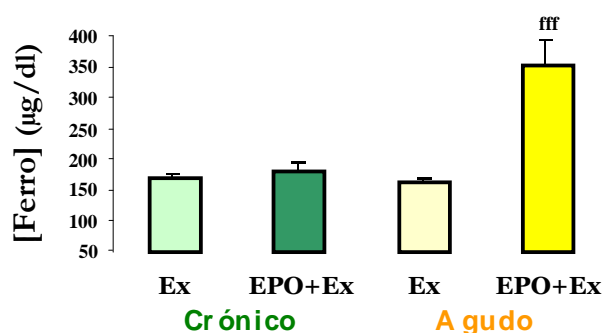


Fig. 63 – Concentrações séricas de ferro, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^{fff} $P < 0,001$ vs. Ex Agudo.

Em relação à concentração sérica de ferritina, assistiu-se a um aumento muito significativo ($P < 0,001$) nos grupos que cumpriram a prova aguda (Ex = $184,83 \pm 5,91$ e EPO+Ex = $173,80 \pm 7,70 \text{ ng/dl}$) face aos grupos do treino crónico (Fig. 64).

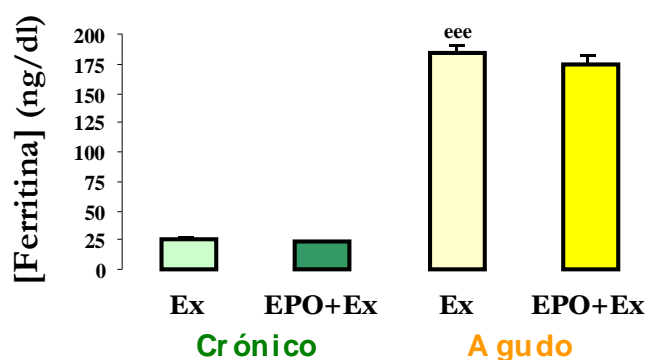


Fig. 64 – Concentrações séricas de ferritina, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. (n=7, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; n=3, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^{eee}P<0,001 vs. Ex Crónico.

Para a transferrina, os valores testemunhados nos grupos da sessão extenuante foram tendencialmente inferiores (Ex = 114,00 \pm 3,21 e EPO+Ex = 108,00 \pm 2,52 mg/dl) relativamente aos do treino crónico (Ex = 126,86 \pm 5,55 e EPO+Ex = 129,86 \pm 4,62 mg/dl), sendo que a adição de rhEPO no crónico tende a aumentar os valores de transferrina, ao contrário do que sucede para o acto agudo (Fig. 65).

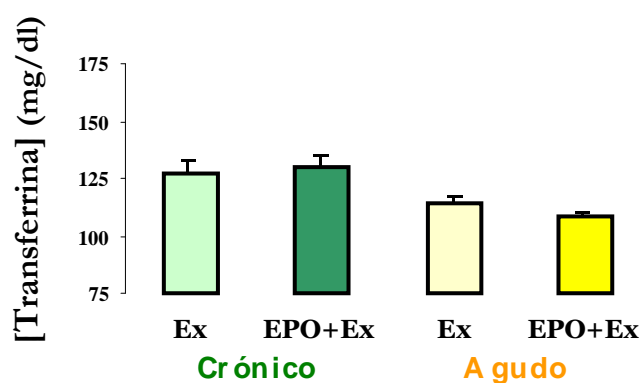


Fig. 65 – Concentrações séricas de transferrina, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. (n=7, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; n=3, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo).

4 – Bioquímica

Os grupos do treino crónico apresentaram concentrações de glicose bastante semelhantes, enquanto os grupos sujeitos à sessão aguda reflectiram valores superiores, sendo mesmo significativa a diferença entre o grupo EPO+Ex relativamente a Ex agudo ($P < 0,05$).

A função renal encontrou-se aumentada nos grupos submetidos ao esforço extenuante, tendo o grupo Ex apresentado resultados significativos face ao grupo Ex do crónico, em toda a gama de parâmetros; enquanto que os grupos EPO+Ex não divergiram significativamente dos valores dos seus congéneres Ex (Tabela 25).

Tabela 25 – Bioquímica

	Crónico		Agudo	
	Ex (n=7)	EPO+Ex (n=7)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
[Glicose] (mg/dl)	178,75 ± 5,76	178,40 ± 6,72	187,67 ± 21,07	243,00 ± 14,73 ^f
<i>Função Renal</i>				
[Azoto Ureico] (mg/dl)	17,35 ± 0,26	18,60 ± 0,63	22,57 ± 1,17 ^{eee}	21,57 ± 0,92
[Creatinina] (mg/dl)	0,57 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,63 ± 0,03 ^e	0,64 ± 0,03
[Ácido Úrico] (mg/dl)	0,40 ± 0,06	0,50 ± 0,0	1,03 ± 0,09 ^{ee}	0,83 ± 0,30
<i>Marcadores Hepáticos</i>				
[TGP] (UI/l)	30,60 ± 2,84	32,40 ± 2,27	37,67 ± 5,17	33,67 ± 2,03
[TGO] (UI/l)	65,20 ± 1,59	63,50 ± 2,63	101,67 ± 8,95 ^{ee}	82,67 ± 13,54
[CK] (UI/l)	540,25 ± 11,7	265,75 ± 35,0 ^{ddd}	590,67 ± 36,8	375,00 ± 130,7 ^f
<i>Perfil Lipídico</i>				
Total-c (mg/dl)	43,67 ± 1,20	38,25 ± 1,18	61,67 ± 4,84	58,33 ± 13,64
HDL-c (mg/dl)	28,86 ± 1,87	26,17 ± 2,71	42,67 ± 4,10 ^e	42,67 ± 10,73
LDL-c (mg/dl)	12,00 ± 0,89	12,00 ± 0,63	18,00 ± 2,89 ^e	11,67 ± 1,67 ^f
TGs (mg/dl)	131,00 ± 5,58	136,33 ± 8,03	136,33 ± 11,29	100,33 ± 13,64 ^f

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^d $P < 0,05$; ^{dd} $P < 0,01$; ^{ddd} $P < 0,001$ entre os grupos do treino crónico. ^e $P < 0,05$; ^{ee} $P < 0,01$; ^{eee} $P < 0,001$ vs. grupo Ex Crónico. ^f $P < 0,05$ vs. grupo Ex Agudo.

Os marcadores hepáticos (TGP e TGO) estavam aumentados para os grupos submetidos à prova extenuante, sendo de distinguir o aumento de TGO verificado para o grupo Ex do agudo ($P < 0,01$) em relação ao grupo Ex do crónico.

A CK consubstanciou reduções estatisticamente significativas para os dois grupos EPO+Ex face aos seus pares (grupos Ex), com $P < 0,01$ no crónico e $P < 0,05$ no agudo.

O perfil lipídico no acto agudo apresentou valores mais elevados, à excepção dos verificados para o grupo EPO+Ex para a concentração de LDL-c e de triglicérideos, nos quais ocorreu uma redução significativa ($P < 0,05$) *versus* grupo Ex.

5 – Sistema nervoso simpático

5.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas

A nível plasmático, a concentração de NA registou incrementos nos grupos EPO+Ex (crónico: $9,32 \pm 1,43$ ng/ml e agudo: $5,29 \pm 1,94$ ng/ml), em relação aos grupos Ex (crónico $4,81 \pm 0,37$ ng/ml e agudo: $3,91 \pm 0,85$ ng/ml). Apenas no treino crónico, a diferença verificada entre os grupos, consubstanciou uma variação com significância ($P < 0,05$) (Fig. 66).

No que diz respeito ao teor plaquetar, a concentração de NA, foi significativamente ($P < 0,01$) superior no treino crónico (Ex = $8,02 \pm 0,68$ ng/ml) por analogia com o acto agudo (Ex = $4,41 \pm 0,79$ ng/ml), a junção de rhEPO não ditou variações significativas, observando-se, para ambos os casos, uma tendência para redução dos valores (Fig. 66).

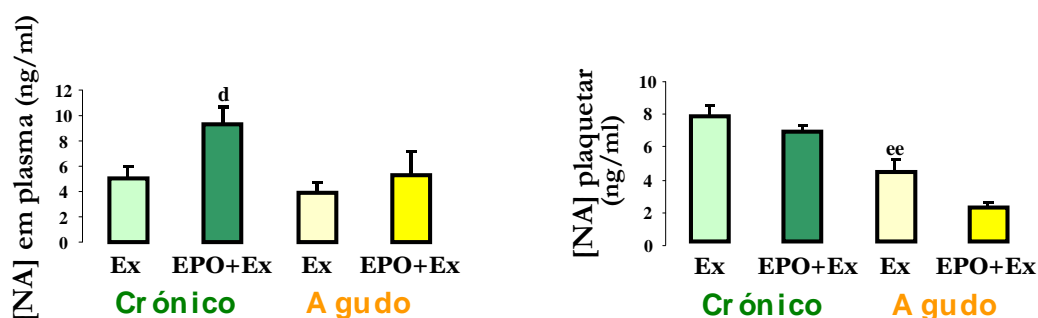


Fig. 66 – Concentrações plasmáticas e plaquetares de NA, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^d $P < 0,05$ entre os grupos do treino crónico. ^{ee} $P < 0,01$ vs. Ex Crónico.

A sessão aguda despoletou uma concentração plasmática de AD superior ($P < 0,05$) à do treino crónico, tendo o grupo EPO+Ex agudo apresentado a concentração mais elevada, com o valor numérico de $4,60 \pm 0,41$ ng/ml, que comparado com o grupo Ex ($1,95 \pm 0,33$ ng/ml) registou uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$), o que também ocorreu na interacção entre os grupos pertencentes ao treino crónico, neste caso com $P < 0,01$ (Fig. 67).

A concentração plaquetar de AD foi substancialmente ($P < 0,001$) agravada no grupo Ex crónico *versus* Ex agudo. Os valores atingidos nos grupos do exercício agudo (sem e com rhEPO) foram idênticos e da mesma ordem de grandeza do grupo EPO+Ex crónico, que através de uma redução significativa ($P < 0,001$) restituiu os valores para patamares menos exuberantes (Fig. 67).

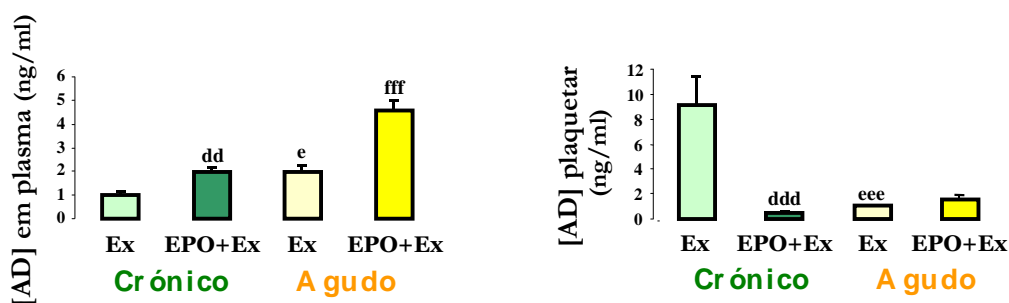


Fig. 67 – Concentrações plasmáticas e plaquetares de AD, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^{dd} $P < 0,01$; ^{ddd} $P < 0,001$ entre os grupos do treino crónico. ^e $P < 0,05$; ^{eee} $P < 0,001$ vs. Ex Crónico. ^{fff} $P < 0,001$ vs. Ex Agudo.

5.2 – Conteúdos tecidulares de catecolaminas

Para as SRs, a concentração obtida para as três catecolaminas (NA, AD e DA) estudadas foi superior nos grupos que efectuaram a sessão aguda, quando em acareação com os grupos do exercício crónico ($P < 0,05$ e $P < 0,01$ entre os grupos: Ex agudo *versus* Ex crónico, para a concentração de AD e DA, respectivamente). A administração de rhEPO não modificou substancialmente os valores encontrados nos grupos Ex, tanto no crónico como no agudo.

No rim, verificou-se o inverso, isto é, os grupos do agudo dispuseram concentrações inferiores aos grupos do crónico, sistematizando significados estatísticos as relações entre os grupos Ex, sem diferenças entre grupos com e sem rhEPO (Tabela 26).

No que concerne ao VE, assistiu-se para a NA, a uma redução no Ex agudo *versus* crónico ($P < 0,001$) e a um valor menor no grupo com rhEPO do Ex crónico ($P < 0,001$), mas não do agudo. No que à aorta diz respeito, presenciou-se um aumento das concentrações nos grupos do treino agudo, sem predicados estatísticos significativos no caso da AD, mas notórios para a NA e a DA, tanto sem como com rhEPO (Tabela 26).

Tabela 26 – Concentrações tecidulares de catecolaminas: suprarrenais, rim, ventrículo esquerdo, aorta e cérebro

	Crónico		Agudo	
	Ex (n=7)	EPO+Ex (n=7)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
SRs				
NA (µg/g)	149,79 ± 15,83	133,81 ± 7,8	188,28 ± 11,01	188,09 ± 96,69
AD (µg/g)	433,06 ± 24,61	579,38 ± 40,58	864,99 ± 107,57 ^c	778,46 ± 423,56
DA (µg/g)	4,02 ± 0,29	3,42 ± 0,34	6,69 ± 0,40 ^{ec}	4,43 ± 2,49
Rim				
NA (µg/g)	0,39 ± 0,02	0,44 ± 0,06	0,17 ± 0,02 ^{ec}	0,23 ± 0,02
AD (µg/g)	0,30 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,16 ± 0,03 ^c	0,22 ± 0,02
DA (µg/g)	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,003 ^{eee}	0,01 ± 0,002
VE				
NA (µg/g)	0,92 ± 0,04	0,12 ± 0,02 ^{ddd}	0,48 ± 0,11 ^{eee}	0,43 ± 0,07
AD (µg/g)	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,02
DA (µg/g)	0,02 ± 0,003	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,008	0,01 ± 0,004 ^f
Aorta				
NA (µg/g)	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,76 ± 0,08 ^{eee}	0,37 ± 0,09 ^{fff}
AD (µg/g)	0,47 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,98 ± 0,21	0,75 ± 0,40
DA (µg/g)	0,004 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,04 ± 0,010 ^{eee}	0,007 ± 0,003 ^{ff}
Cérebro				
NA (µg/g)	0,21 ± 0,008	0,19 ± 0,008	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,03
AD (ng/g)	1,79 ± 0,25	2,57 ± 0,15	3,95 ± 0,06 ^c	10,35 ± 2,25 ^{fff}
DA (µg/g)	0,41 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,49 ± 0,04 ^c	0,55 ± 0,07

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^{ddd} $P < 0,001$ entre os grupos do treino crónico. ^c $P < 0,05$; ^{ec} $P < 0,01$; ^{eee} $P < 0,001$ vs. grupo Ex Crónico. ^f $P < 0,05$; ^{ff} $P < 0,01$; ^{fff} $P < 0,001$ vs. grupo Ex Agudo.

A nível do cérebro, as diferenças entre os grupos, para a NA não despoletaram intervenção estatística, o mesmo não aconteceu para a AD e DA, com valores invariavelmente superiores no Ex agudo *versus* crónico ($P < 0,05$), bem como nos grupos com rhEPO *versus* sem rhEPO, tanto no crónico como no agudo (Tabela 26).

6 – Sistema serotoninérgico

6.1 – Conteúdos plasmáticos e plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA

Quer para 5-HT, quer para 5-HIAA, ocorreram aumentos da concentração plasmática nos grupos sujeitos a administração de rhEPO e a exercício físico, quer crónico quer agudo (Fig. 68). Para a concentração de 5-HT plasmática ocorreu um aumento no acto agudo e bastante pronunciado no grupo EPO+Ex ($533,39 \pm 60,73$ ng/ml; $P < 0,001$) *versus* grupo sem rhEPO, que, por sua vez, obteve um valor significativamente superior ($85,97 \pm 20,69$ ng/ml; $P < 0,01$) relativamente ao do grupo Ex do treino crónico (Fig. 68). A concentração de 5-HIAA plasmática foi análoga para os dois tipos de condicionamento (crónico e agudo), sendo mais elevada nos grupos com rhEPO, mas, no entanto, as flutuações dos valores não se revelaram estatisticamente significativas, constituindo apenas variações tendenciais.

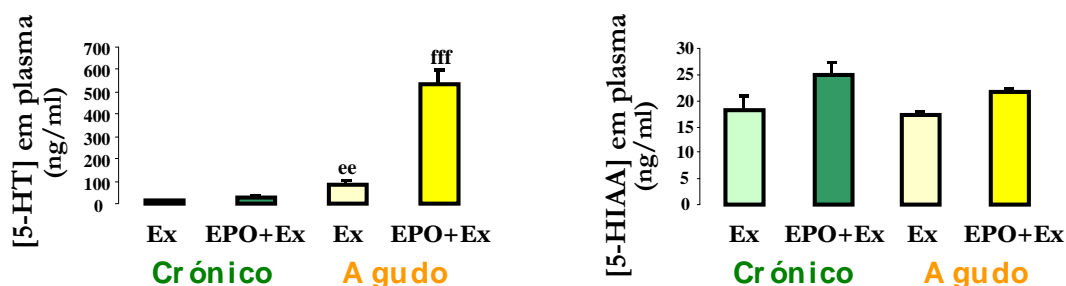


Fig. 68 – Concentrações plasmáticas de 5-HT e de 5-HIAA, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^{ee} $P < 0,01$ vs. Ex Crónico. ^{fff} $P < 0,001$ vs. Ex Agudo.

O conteúdo plaquetar de 5-HT foi idêntico nos grupos do treino crónico (Ex = 1610,80 ± 55,06 ng/ml e EPO+Ex = 1640,44 ± 39,64 ng/ml) e significativamente (P<0,001) superior ao do grupo Ex da sessão aguda, onde o grupo com rhEPO demonstrou redução significativa (P<0,05) (Fig. 69).

O grupo Ex do acto agudo apresentou a maior concentração plaquetar de 5-HIAA, de valor 4,34 ± 0,74 ng/ml, passível de significância estatística (P<0,05) com o grupo Ex (2,99 ± 0,22 ng/ml) do exercício crónico. O grupo EPO+Ex do acto agudo registou a menor concentração plaquetar de 5-HIAA, originando desavença estatisticamente significativa (P<0,01) com o grupo Ex (Fig. 69).

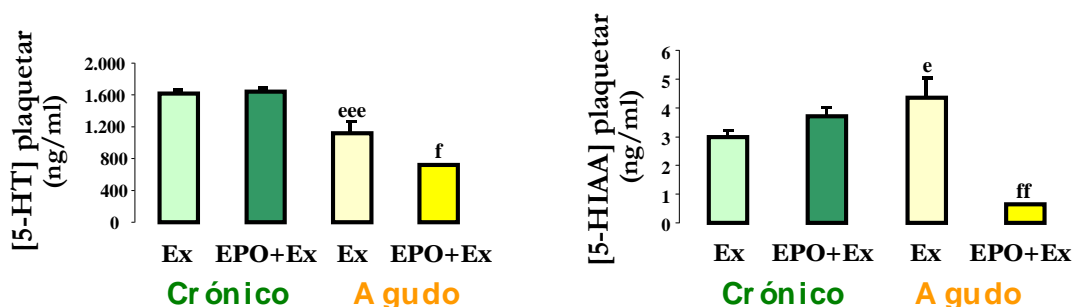


Fig. 69 – Concentrações plaquetares de 5-HT e de 5-HIAA, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m. (n=7, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; n=3, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^eP<0,05; ^{eee}P<0,001 vs. Ex Crónico. ^fP<0,05; ^{ff}P<0,01 vs. Ex Agudo.

6.2 – Conteúdo de 5-HT e de 5-HIAA no cérebro

Os valores de 5-HT no cérebro, do exercício agudo, sofreram uma redução (P<0,05 *versus* Ex) face aos do crónico, verificando-se o inverso para o 5-HIAA (P<0,001 *versus* Ex) para a sessão aguda (Tabela 27).

Tabela 27 – Concentrações neuroniais de 5-HT e de 5-HIAA

	Crónico		Agudo	
	Ex (n=7)	EPO+Ex (n=7)	Ex (n=3)	EPO+Ex (n=3)
<i>Cérebro</i>				
5-HT (µg/g)	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,14 ± 0,04 ^e	0,21 ± 0,03
5-HIAA (µg/g)	0,13 ± 0,005	0,13 ± 0,006	0,25 ± 0,02 ^{eee}	0,24 ± 0,03

Dados apresentados em médias ± e.p.m. ^eP<0,05; ^{eee}P<0,001 vs. grupo Ex Crónico.

7 – Equilíbrio oxidativo

No soro, a concentração de MDA foi idêntica para os 4 grupos, sendo tendencialmente mais elevada para o grupo EPO+Ex (0,34 ± 0,01 µM) do ensaio crónico e menor para o grupo EPO+Ex (0,22 ± 0,13 µM) do agudo. Todavia, esta conexão não foi significativa em termos estatísticos, dado o valor elevado de e.p.m. (Fig. 70).

No soro, as alterações na concentração de TAS não foram significativas entre os vários grupos, contudo podemos referir que a experiência aguda elevou ligeiramente os valores séricos de TAS face ao treino crónico; os grupos suplementados com rhEPO preconizaram efeitos díspares: diminuição (0,22 ± 0,01 mM) para a simulação crónica e aumento (0,65 ± 0,20 mM) para a sessão casual (Fig. 70).

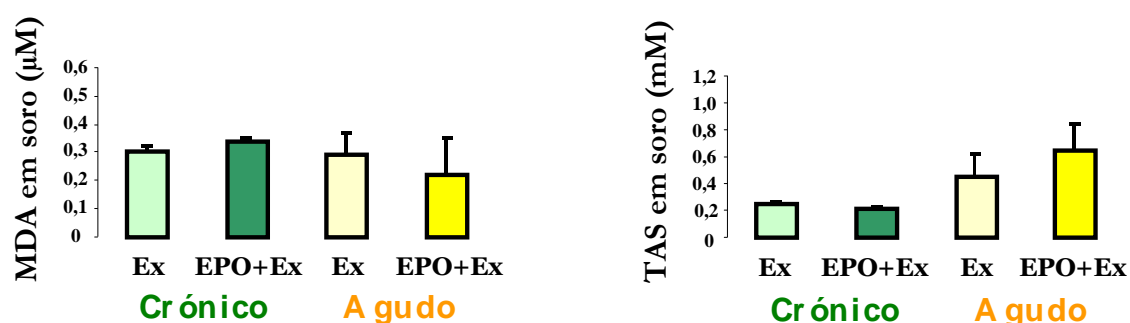


Fig. 70 – MDA e TAS no soro, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias ± e.p.m. (n=7, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; n=3, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo).

Em termos musculares, a concentração de MDA foi significativamente ($P < 0,05$) inferior no exercício agudo *versus* crónico, sendo que a presença de rhEPO aumentou o MDA muscular no crónico ($P < 0,05$) e reduziu no agudo (não significativamente) (Fig. 71). Acerca da concentração de TAS, vislumbrou-se um acréscimo nos grupos do exercício agudo (Ex = $0,27 \pm 0,04$ mM e EPO+Ex = $0,31 \pm 0,07$ mM), sendo credora de assumpção estatística significativa ($P < 0,001$) a interação Ex agudo *versus* Ex crónico (Fig. 71).

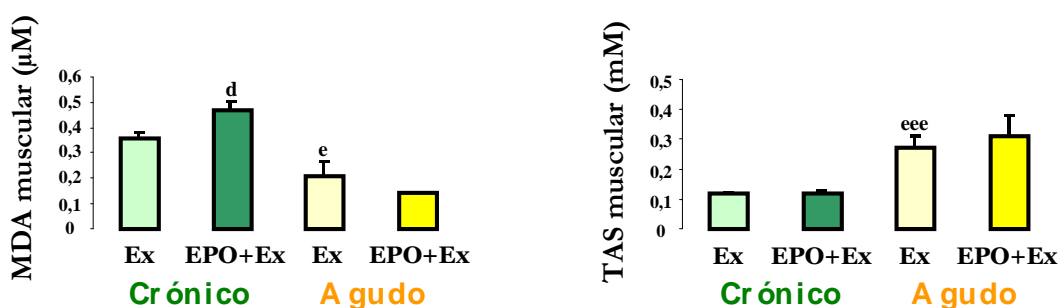


Fig. 71 – MDA e TAS no músculo, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. ($n=7$, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; $n=3$, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^d $P < 0,05$ entre os grupos do treino crónico. ^e $P < 0,05$; ^{eee} $P < 0,001$ vs. Ex Crónico.

Quer no soro, quer no músculo, verificou-se para a razão MDA/TAS ($\mu\text{M}/\text{mM}$) uma similitude e coerência na grandeza dos valores e uniformidade de comportamento dos grupos, corroborada também nas atribuições das diferenças estatisticamente significativas. Assim, os grupos do exercício agudo edificaram os registos mais reduzidos e, por consequência, $P < 0,001$ entre Ex agudo *versus* Ex crónico. A adição de rhEPO originou um aumento da razão MDA/TAS, quer em músculo, quer em soro, no exercício crónico ($P < 0,05$), e uma redução no agudo (não significativa) (Fig. 72).

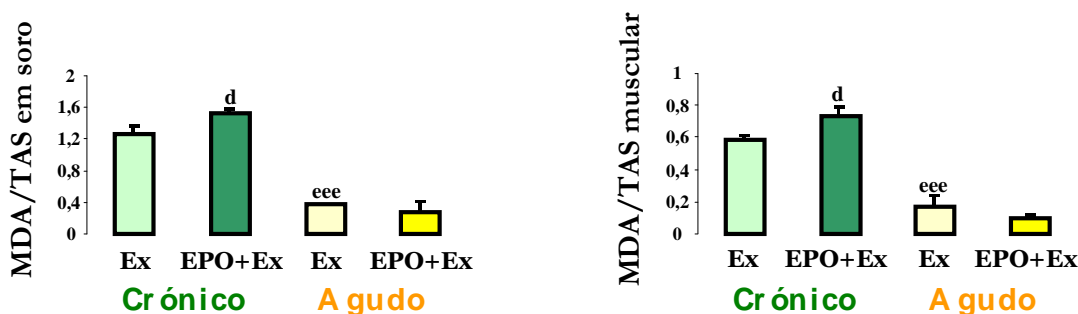


Fig. 72 – Razão MDA/TAS no soro e no músculo, em ratos submetidos a dois programas de natação distintos (treino crónico e sessão extenuante ou aguda), sem (Ex) e com (EPO+Ex) administração de rhEPO (50UI/kg/sem). Dados apresentados em médias \pm e.p.m. (n=7, para grupos Ex e EPO+Ex, no crónico; n=3, para grupos Ex e EPO+Ex, no agudo). ^dP<0,05 entre os grupos do treino crónico. ^{eee}P<0,001 vs. Ex Crónico.

Em resumo, a administração de rhEPO promoveu os seguintes efeitos no exercício (natação) crónico *versus* agudo:

- 1 – O hemograma (GVs, HCT e Hb) foi idêntico nos exercícios crónico e agudo; a rhEPO promove um aumento no crónico e uma redução no agudo;
- 2 – No Ex agudo o HCM, VCM e o nº de reticulócitos são inferiores em relação ao crónico; a rhEPO previne aqueles efeitos no crónico, excepto para os reticulócitos;
- 3 – No Ex agudo a concentração sérica de EPO foi inferior à do crónico, a rhEPO impede aquela redução no agudo;
- 4 – No Ex agudo a concentração sérica de ferritina foi superior à do Ex crónico, sem alteração de ferro e transferrina; no crónico a rhEPO não altera os níveis, enquanto que no agudo aumenta o ferro, sem reverter o aumento de ferritina;
- 5 – A glicemia foi idêntica entre crónico e agudo; a rhEPO aumenta no agudo;
- 6 – Os marcadores bioquímicos de função renal e hepática são todos mais elevados no Ex agudo; a rhEPO não tem efeitos nem no crónico nem no agudo; a CK é similar no Ex crónico e no agudo; a rhEPO reduz significativamente em ambos;
- 7 – Os parâmetros de perfil lipídico são invariavelmente mais elevados no agudo *vs* crónico; a rhEPO tende a atenuar em ambos os protocolos;

- 8 – O Ex agudo apresentou valores superiores de AD no plasma e inferiores de NA e AD plaquetar; a rhEPO aumenta as catecolaminas em plasma e diminui nas plaquetas, tanto no crónico como no agudo;
- 9 – O Ex agudo apresentou valores superiores de CAs nas SRs e aorta e inferiores no rim e VE *vs* crónico; no crónico a rhEPO aumenta a AD nas SRs e diminui a NA no VE; no Ex agudo a rhEPO diminui as CAs na aorta e aumenta a AD no cérebro;
- 10 – No Ex agudo o conteúdo de 5-HT é superior no plasma e inferior nas plaquetas e cérebro e a concentração de 5-HIAA superior nas plaquetas e no cérebro, *vs* crónico; a rhEPO não afecta aqueles conteúdos no crónico, enquanto no agudo aumenta 5-HT e 5-HIAA no plasma e diminui nas plaquetas;
- 11 – O indicador de desequilíbrio oxidativo MDA/TAS é superior no Ex crónico, tanto no soro como no músculo, *vs* Ex agudo; o efeito da rhEPO é pró-oxidante no crónico e antioxidante no agudo.

Estudo 4 – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada

1 – Variação da concentração sérica de EPO

A concentração de EPO no soro partiu de $22,25 \pm 1,00$ pg/ml em (T₀), sendo que para a EPO (20UI/kg) permaneceu praticamente constante (sofreu um aumento ligeiro em T₁, com $29,92 \pm 12,94$ e redução até T₃) enquanto que para EPO (50 UI/kg) registou um aumento contundente em T₁ ($149,08 \pm 0,83$ pg/ml) e uma redução/normalização nos tempos posteriores, culminando no tempo final (T₄), com uma concentração inferior à da dose de 20UI/kg (Fig. 73).

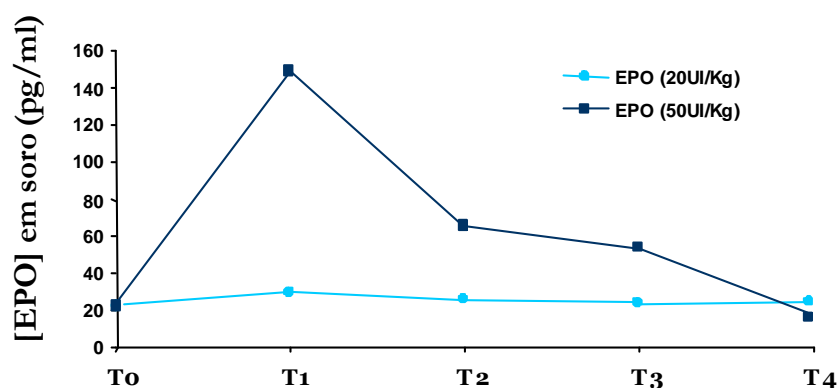


Fig. 73 – Variação da concentração sérica de EPO ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos (n=4 cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

2 – Variação do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e % de reticulócitos

O número de eritrócitos inicial (T₀) foi de $7,79 \pm 0,32 \times 10^6/\mu\text{l}$, a partir do qual houve um incremento, apenas subtilmente mais acentuado para a dose de EPO (20UI/kg) em T₁, com $8,45 \pm 0,21 \times 10^6/\mu\text{l}$. Em T₂, os níveis de eritrócitos diminuíram, divergindo o registo das doses, com $7,5 \pm 0,34$ para EPO na dose de 20UI/kg e $6,15 \pm 0,39 \times 10^6/\mu\text{l}$ na dose de 50UI/kg. Nos tempos subsequentes, o número de eritrócitos, na dose inferior subiu ligeiramente (T₄ = $7,78 \pm 0,11 \times 10^6/\mu\text{l}$), ascendendo mais incisivamente na dose mais potente até $7,07 \pm 0,36 \times 10^6/\mu\text{l}$, contudo, sem atingir o registo final (T₄) da EPO (20UI/kg) (Fig. 74).

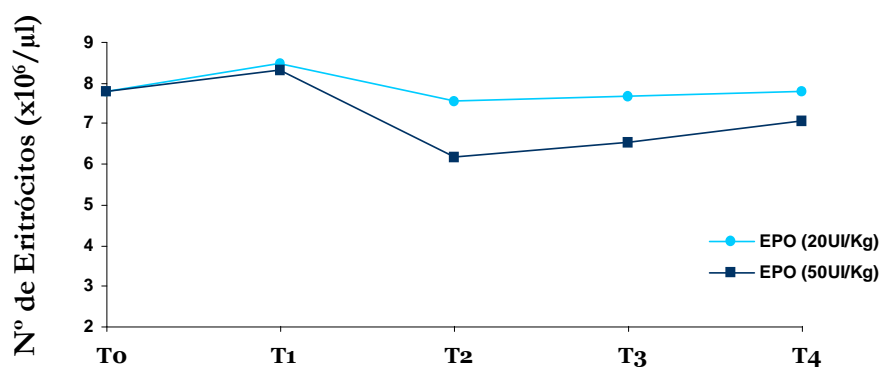


Fig. 74 – Variação do número de eritrócitos ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos (n=4 cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

Para o hematócrito e concentração de hemoglobina, é visível o mesmo padrão de resposta para as doses de EPO ao verificado para o número de eritrócitos. Para o hematócrito: T₀ = $40,53 \pm 1,19$ %; T₁ = $44,40 \pm 1,28$ e $44,35 \pm 0,30$ %; T₂ = $39,30 \pm 1,88$ e $32,37 \pm 2,19$ %; T₄ = $41,65 \pm 0,38$ e $38,43 \pm 1,71$ %, para EPO (20 e 50UI/kg), respectivamente (Fig. 75). Para a concentração de hemoglobina: T₀ = $14,16 \pm 0,38$ g/dl; T₁ = $15,57 \pm 0,29$ e $15,47 \pm 0,06$ %; T₂ = $14,15 \pm 0,60$ e $11,80 \pm 0,75$ g/dl; T₄ = $14,85 \pm 0,10$ e $13,77 \pm 0,52$ g/dl, para EPO (20 e 50UI/kg), respectivamente (Fig. 76)

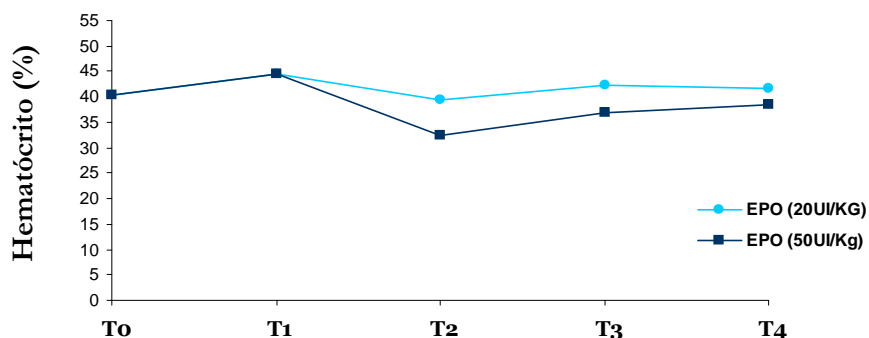


Fig. 75 – Variação do hematócrito ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos (n=4 cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

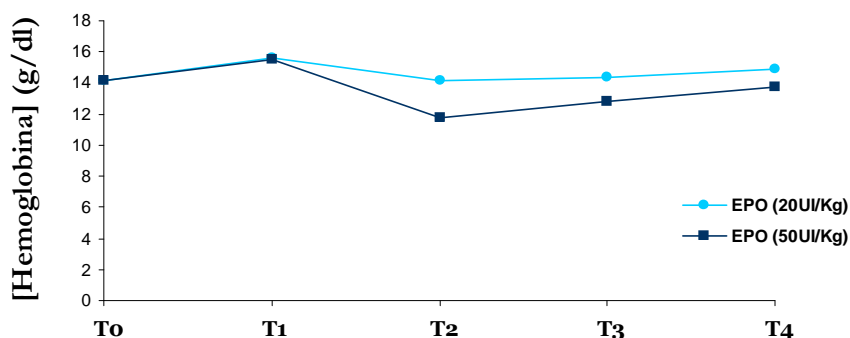


Fig. 76 – Variação da concentração de hemoglobina ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos (n=4 cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

A percentagem de reticulócitos apresentou, nas duas concentrações de EPO, variações idênticas, com oscilações num e noutro sentido (ascendente e descendente) ao longo da linha temporal. Assim, verificou-se um aumento em T1 para as duas doses, uma redução abrupta em T2, uma recuperação em T3 e novo decréscimo em T4 para valores basais (Fig. 77).

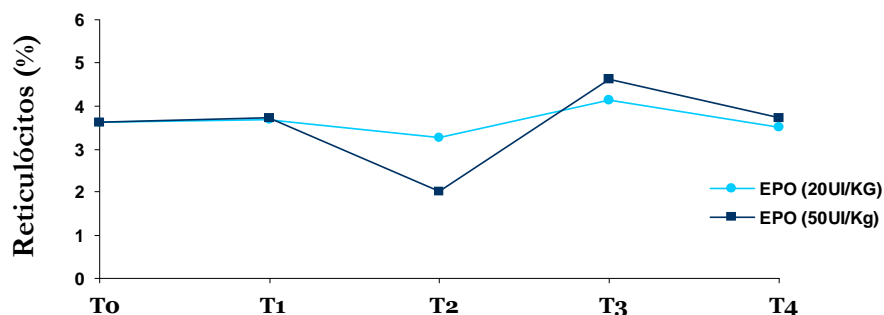


Fig. 77 – Variação da percentagem de reticulócitos ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos (n=4 cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

3 – Variação das concentrações de ferro, ferritina e transferrina

Partindo de T0 ($176,00 \pm 15,80 \mu\text{g/dl}$), a concentração de ferro no soro, para EPO (20UI/kg) permaneceu igual em T1, decresceu até T3 ($149,50 \pm 13,09 \mu\text{g/dl}$), e registou um aumento em T4 ($184,25 \pm 6,43 \mu\text{g/dl}$); para EPO (50UI/kg) assistiu-se a uma mutabilidade permanente ao longo do tempo, com destaque para o valor $207,50 \pm 20,98 \mu\text{g/dl}$ alcançado em T2 (Fig. 78).

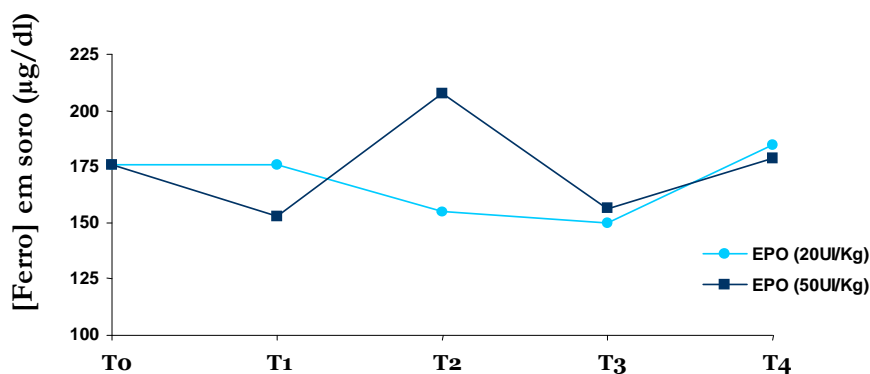


Fig. 78 – Variação da concentração sérica de ferro ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos (n=4 cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

Para a ferritina, exceptuando T1, onde EPO (20UI/kg) registou uma ligeira diminuição ($166,67 \pm 22,10 \text{ ng/dl}$) e EPO (50UI/kg) um ténue aumento ($180,85 \pm 33,06$

ng/dl) face ao valor em T0 ($172,12 \pm 7,91$ ng/dl), o padrão de resposta foi comparável para as duas doses de EPO: as concentrações aumentaram até T3 e registaram uma quebra em T4, sendo que na dose mais reduzida se atingiram concentrações numericamente superiores às da dose maior (Fig. 79).

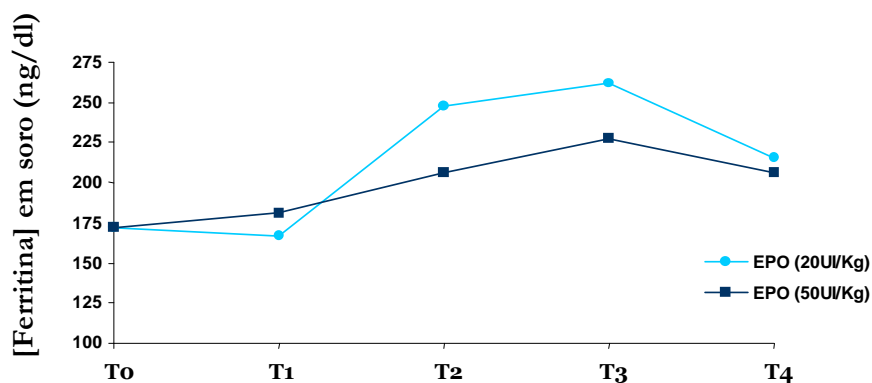


Fig. 79 – Variação da concentração sérica de ferritina ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos ($n=4$ cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

A variação dos valores da concentração de transferrina para a EPO (50UI/kg) foi ténue, iniciou com $124,67 \pm 6,74$ mg/dl em T0, passou para $128,00 \pm 4,83$ mg/dl em T2 e, por fim, atingiu $133,67 \pm 4,84$ mg/dl em T4; enquanto que para EPO (20UI/kg) o declive foi um pouco mais acentuado: desceu até $120,50 \pm 5,04$ mg/dl em T2 e culminou com $133,50 \pm 8,33$ mg/dl em T4 (Fig. 80).

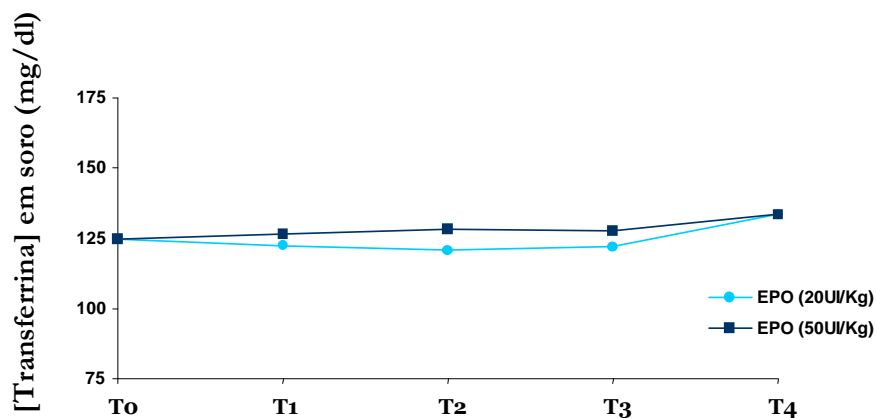


Fig. 80 – Variação da concentração sérica de transferrina ao longo do tempo, em 2 grupos de ratos ($n=4$ cada) submetidos a doses diferentes de rhEPO (20UI/kg e 50UI/kg). Dados apresentados em médias.

Capítulo III – DISCUSSÃO

A actividade física é uma condição onde ocorre um aumento da necessidade energética do organismo visando a manutenção da actividade muscular. A energia proveniente dos nutrientes ingeridos na alimentação tem importância capital para o fornecimento de energia química, assim como as reservas dos substratos energéticos que, por diferentes vias de fornecimento, contribuem para a constante homeostase energética. Os ajustes cardiovasculares ocorrem para que possa haver um aumento de fluxo sanguíneo aos músculos exercitados, em função de um aumento da necessidade metabólica local, com conseqüente aumento do consumo de oxigénio. Nesta circunstância, o aumento do débito cardíaco é resultante do aumento da frequência cardíaca e do volume de ejeção durante a sístole. Durante o exercício, mediado por um comando central e por reflexos periféricos, ocorre um aumento da descarga simpática e uma diminuição do tónus vagal que, sinergeticamente, promovem elevação da frequência cardíaca. A redistribuição do fluxo sanguíneo para os músculos em actividade decorre de uma vasodilatação mediada por compostos que, a nível local, promovem alteração de pH, temperatura, pO_2 , osmolaridade e concentração de potássio. Mesmo com aumento do débito cardíaco, o fluxo sanguíneo não aumenta indiscriminadamente para locais não exercitados porque nessas áreas ocorre aumento da resistência por vasoconstrição induzida pela activação simpática.

O condicionamento físico regular (treino) tem sido associado a vários efeitos, nomeadamente do foro cardiovascular. Algumas das áreas de maior relevância incluem: - modificações do perfil lipídico; - alterações do equilíbrio oxidativo; - perturbações tromboembólicas/plaquetares; - adaptações dos sistemas nervoso simpático e serotoninérgico. A literatura tem descrito algumas das conseqüências do exercício a estes níveis, que passaremos a referir de forma sumária como notas introdutórias da discussão.

A importância das plaquetas na fisiopatologia cardiovascular ressalta da sua influência sobre o tónus vascular, nas alterações tromboembólicas e no processo aterosclerótico. As plaquetas participam na formação e consolidação do tampão hemostático, responsável pelo tamponamento da superfície de um vaso lesado, bem

como na dissolução do coágulo que permite o restabelecimento da circulação e normal funcionamento do vaso. As plaquetas têm, portanto, um papel fundamental na hemostase.

Tem sido demonstrado uma relação directa entre inactividade física e a presença de dislipidemia, isto é, valores séricos de LDL-colesterol e triglicérideos elevados e de HDL-colesterol reduzidos, factores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudos de intervenção demonstram que perfis lipídicos e de lipoproteínas desfavoráveis melhoram com o treino físico.

O sistema nervoso simpático desempenha um papel fulcral na adaptação do organismo ao stresse, fornecendo uma resposta imediata a qualquer desafio físico, metabólico ou psicológico. Essa resposta, que afecta maioritariamente as funções cardiopressoras e metabólicas, é mediada pela libertação periférica de catecolaminas (CAs) dos terminais nervosos pós-ganglionares, que libertam noradrenalina (NA), e da medula adrenal, que, no homem, liberta essencialmente adrenalina (AD). Como o SNS está virtualmente num estado de activação contínuo, as CAs estão presentes de forma constante no sangue e os seus níveis estão directamente relacionados com o grau de actividade simpática. Por esta razão, a determinação das CAs plasmáticas tem sido amplamente usada para explorar a actividade do SNS em condições basais ou, mais importante ainda, em resposta a um estímulo stressante. Tem sido demonstrado que diferentes tipos de stresse são capazes de produzir diferentes padrões de resposta do SNS. Por exemplo, qualquer actividade física é capaz de aumentar consideravelmente os níveis de NA.

Há muito que se sabe que as plaquetas partilham muitas características com os neurónios monoaminérgicos, tais como: a presença de receptores adrenérgicos e serotoninérgicos na membrana celular; um mecanismo de transporte específico para a serotonina e actividade mitocondrial da MAO-B. As plaquetas também conseguem captar CAs da circulação sanguínea e armazená-las, em concentrações estáveis, por períodos de tempo relativamente longos (4 a 7 dias). Uma vez que as plaquetas não são capazes de sintetizar CAs, o conteúdo intra-plaquetar de CAs depende na sua totalidade da quantidade de neurotransmissores libertados pelo SNS para a corrente sanguínea. Por

estas razões, o conteúdo plaquetar de CAs tem sido usado como um índice global da actividade do SNS.

Dado o facto de a componente neuronal ser a mais relevante para a NA, espera-se que a libertação das terminações dos tecidos periféricos (ventrículo e aorta) seja a mais determinante para a justificação dos nossos resultados. Relativamente à AD será a componente adrenal a explicar os níveis de AD em circulação.

Os principais efeitos periféricos da serotonina (5-HT) resultam da sua acção sobre os vasos. As plaquetas não sintetizam 5-HT mas podem armazená-la e metabolizá-la pois possuem um sistema de captação membranar e ainda a enzima MAO. A serotonina é libertada das plaquetas em resultado da activação das mesmas, nomeadamente por aumento da agregação. A resposta vascular à 5-HT libertada pelas plaquetas depende da integridade do endotélio. Se este estiver intacto ela tem uma acção global protectora na prevenção da agregação plaquetar. Contudo, se estiver lesado, provoca vasoconstrição, favorecendo o processo hemostático e a agregação ao vaso traumatizado.

A origem e a extensão da fadiga muscular dependem da especificidade do exercício, tipo de fibra muscular e o nível de aptidão física individual. É importante estudar a fadiga como um mecanismo de defesa que é activado antes que ocorra alguma deterioração de determinadas funções orgânicas e celulares, prevenindo lesões celulares irreversíveis e numerosas lesões desportivas. Um aspecto importante relacionado com a fadiga central durante o exercício de longa duração refere-se à interacção da serotonina, como neurotransmissor cerebral.

A possível natureza pró-oxidante do exercício também é extensamente reconhecida. Em condições fisiológicas, as ROS são geradas normalmente em vários processos metabólicos, existindo, no entanto, sistemas de defesa antioxidante eficientes na protecção do nosso organismo. Contudo, em processos patológicos ou em exercícios físicos prolongados, existe a possibilidade de ocorrência de stresse oxidativo resultante de um sério desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade antioxidante, podendo causar danos celulares com diversos prejuízos fisiológicos ao nível das proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídeos membranares.

Desde os imemoriais do tempo, por todo o mundo, o homem sempre procurou descobrir substâncias de origem mineral ou vegetal que lhe pudessem proporcionar sensações novas e diferentes (excitação, euforia, menor cansaço/fadiga, exaltação da força) ou a cura e prevenção das mais variadas maleitas.

Com o nascimento do desporto moderno, estas substâncias ergogénicas serviram para coadjuvar uma melhor *performance* desportiva. Graças aos progressos farmacológicos, a escolha de produtos tornou-se mais ampla: desde morfina, efedrina e amfetaminas, a corticóides, esteróides anabolizantes e auto-hemotransfusões e nas últimas décadas, hormonas (como a hormona de crescimento e a EPO).

O uso abusivo destas substâncias proibidas não é intrínseco do mundo do desporto, antes reflecte a cultura vigente na nossa sociedade, ou pelo menos numa parte dela. Na nossa vida competitiva e egoísta, é vital demonstrar força e poder, e obter sucesso. Todos os meios se ajustam e são justificados para alcançar os objectivos pré-determinados, incluindo a utilização de fármacos, drogas e outros métodos ilegais.

Nos finais da década de 80 ocorreu o desenvolvimento da rhEPO com o fito inicial de corrigir a anemia (baixos níveis de hemoglobina) causada pela falência renal. Contudo, rapidamente foi descoberto que a capacidade da rhEPO aumentar as concentrações de hemoglobina nestes pacientes também podia ser usada para melhorar o desempenho de atletas de *endurance*, dado que a rhEPO - um agente estimulador da eritropoiese -, possibilita o aumento do hematócrito e da concentração de hemoglobina circulante, aquiescendo o arrebatamento e comprometimento de oxigénio para os músculos em actividade.

Um dos pilares, sustentatório e inatacável, da proibição do *doping* decorre dos riscos/perigos para a saúde e vida dos atletas. O uso descontrolado da rhEPO desencadeou condições policitémicas descomunais (hematócritos acima dos 60%) que, agravadas com a desidratação decorrente da prática desportiva, predispunham imediatamente os atletas a complicações tromboembólicas. Estas duas condições (hematócrito elevado e desidratação), associadas a exercício físico intenso, podem revelar risco cardiovascular não detectado em alguns atletas. Estudos em modelos animais experimentais revelaram que a interrupção da terapia intensiva com rhEPO desencadeou uma forte inibição da acção eritropoiética com anemia secundária, o que

corresponde à exaustão intrínseca da medula eritróide. Observou-se, também, que a eritrocitose genética crónica originava a disfunção cardíaca e morte prematura de ratinhos que sobre-expressavam eritropoietina (Cazzola, 2002).

O aparecimento de morte súbita na prática desportiva, infelizmente bem presente e personificada por alguns trágicos exemplos recentes, através de mecanismos não totalmente esclarecidos, poderá estar associada a defeitos cardíacos congénitos, a cargas de treino que excedem a capacidade humana individual ou ainda a práticas de *doping*.

Neste contexto, pretendeu-se, neste estudo, avaliar os efeitos bioquímicos a nível cardiovascular e metabólico da administração de rhEPO enquanto *doping* em ratos Wistar sujeitos a protocolo de treino aeróbio crónico (natação) moderado.

Para tal, os objectivos específicos deste projecto, foram os seguintes:

1º Estudo – Avaliar os efeitos da rhEPO no exercício crónico (treino):

A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo EPO *versus* grupo controlo);

B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crónico (natação);

2º Estudo – Efeitos da rhEPO em diferentes formas de exercício agudo (natação *versus* corrida);

3º Estudo – Efeitos da rhEPO no exercício (natação) crónico *versus* agudo;

4º Estudo – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada.

Na impossibilidade de, num trabalho desta natureza, abordar todos os parâmetros hipoteticamente envolvidos, foram estudados aqueles que pela sua exequibilidade, repercutibilidade e também, mas não menos relevante, ajustabilidade e importância, se julgaram mais pertinentes. Assim, foram avaliados: i) a pressão arterial e a frequência cardíaca, bem como indicadores de trefismo tecidual; ii) parâmetros hematológicos, ao nível eritrocitário, plaquetar, reticulocitário e leucocitário; iii) a concentração sérica de EPO; iv) o metabolismo do ferro, através das concentrações séricas de ferro, ferritina e transferrina; v) parâmetros bioquímicos, ao nível da função renal, hepática, glicemia e perfil lipídico; vi) a actividade do sistema nervoso simpático, através da concentração de catecolaminas em circulação (plasma e plaquetas) e tecidulares (suprarrenais, rim, aorta, ventrículo esquerdo e cérebro); vii) a actividade do sistema serotoninérgico, através da concentração de 5-HT e 5-HIAA em circulação (plasma e plaquetas) e no

cérebro; viii) marcadores de inflamação e proliferação, nomeadamente PCR, IL-2, IL-1 β , TNF- α e TGF- β ; ix) indicadores de equilíbrio oxidativo, designadamente MDA e TAS, tanto no soro, como no músculo, bem como a relação subsequente MDA/TAS e a concentração sérica de 3-NT; x) caracterização histomorfológica.

O condicionamento físico regular (treino) está associado a vários benefícios metabólicos, cardiovasculares e neurovegetativos. Contudo, algumas questões pertinentes se nos colocam: - Será que o *doping* concomitante com rhEPO modifica aquela perspectiva? - Em que sentido o poderá fazer? Sabendo que a utilização do *doping* pode visar uma prova específica, poder-se-á verificar o uso abusivo deste fármaco num período anterior. Neste caso, o exercício agudo e extenuante *per se* estará associado a uma série de efeitos fisiológicos deletérios. O *doping* com rhEPO irá agudizá-los?

Para a consecução dos nossos objectivos, e na perspectiva de encontrar respostas para estas questões, tínhamos como modalidades possíveis a natação e a corrida em tapete rolante. Para o treino crónico apenas a natação foi viável do ponto de vista logístico dado o número de ratos (15) e o tempo por sessão, já que possibilitou que se estabelecessem 3 grupos de 5 ratos cada; tal não seria exequível com a corrida, na qual apenas 2 ratos por sessão eram permitidos (havia apenas 2 pistas utilizáveis). No acto agudo envolvemos as duas modalidades, no sentido de enriquecer este trabalho, porque a corrida em tapete rolante é uma forma padronizada de exercício aeróbio usada nas experiências com roedores. Para além disso, correr envolve uma componente muscular polimétrica (excêntrica), merecendo, por isso, uma atenção particular neste estudo. Já a natação foi escolhida para o protocolo de actividades por se tratar de uma modalidade de exercício físico bastante utilizada para a área em estudo, com supostamente menor stresse emocional no animal comparado aos exercícios em tapete rolante (ao qual está acoplado um sistema de punição eléctrica para induzir a corrida) (Kokubun, 1990). Essa escolha baseou-se também nas propriedades físico-químicas do meio líquido, características que auxiliam o sistema cardiorrespiratório e osteoarticular, facilitando o retorno venoso e diminuindo o risco de lesões nas articulações, apresentando também maior regularidade no esforço físico. Mais ainda, eleva a estabilidade da homeostase e, consequentemente, terá menor risco de comprometimento da experiência.

Estudo 1 – Efeitos da rhEPO no exercício crónico

A – Efeitos da rhEPO por si só (grupo rhEPO *versus* grupo controlo)

A descoberta que a hormona eritropoietina (EPO) e o seu receptor possuem um papel biológico relevante em tecidos fora do sistema hematopoiético encrudesceu o interesse na EPO como um novo agente citoprotector tanto no sistema neuronal como no cardiovascular. A EPO é considerada como tendo aplicabilidade numa multiplicidade de desordens, entre elas, a isquémia cerebral. É responsável pela modulação de uma vasta série de processos celulares que compreendem o desenvolvimento das células progenitoras, integridade celular e angiogénese. Deste modo, a EPO confere uma protecção celular robusta e inibe mecanismos apoptóticos de lesão, como acontece na preservação da assimetria da membrana celular para prevenir a inflamação. Com o progresso da investigação das novas aplicações clínicas para a EPO, uma apreciação mais detalhada das suas interacções em todo o organismo deverá ser obtida.

A administração de rhEPO (50UI/kg/sem) durante 10 semanas configurou um aumento apenas tendencial do número de GVs, não acompanhado do esperado/previsível aumento de HTC e da concentração de Hb. Tal facto poderá dever-se a uma dessensibilização da medula óssea em relação à EPO, visto a concentração sérica de EPO ter aumentado e, logo, haver condições de induzir a pretendida estimulação eritropoiética. É de referir que a concentração sérica de EPO determinada abrange não só a endógena como também a contribuição da fornecida subcutânea e artificialmente. Tal constatação foi certificada através de duas amostras iguais, tendo uma delas sido fortificada com rhEPO, o que cimentou uma concentração de EPO superior.

Obtivemos um aumento da concentração sérica de ferritina no grupo EPO face ao grupo Ctrl, o que, tendo em conta que a concentração sérica de ferritina é um bom indicador da quantidade de ferro armazenada (Baynes, 1996; Brungnara, 2003), nos permite concluir que a rhEPO promove um aumento das reservas de ferro, sem que tal se manifeste em maior transferrina (o seu transportador) ou ferro circulante (Fig. 81).

Verificou-se um aumento das pressões arteriais e da frequência cardíaca no grupo EPO relativamente ao grupo Ctrl, em consonância com os valores superiores obtidos

para o trofismo cardíaco, bem como com os estudos que indicam um efeito hipertensor significativo após aplicação subcutânea crônica de rhEPO (Azzadin e col., 1995; Tsukahara e col., 1997).

Relativamente aos parâmetros bioquímicos, evidenciou-se na função renal uma pequena redução do azoto ureico, de certa forma corroborada com uma atrofia renal e pela redução da relação Rim/PC; na função hepática, um aumento da TGO apesar da redução do trofismo hepático.

As alterações no perfil lipídico foram maioritariamente prejudiciais, especialmente os aumentos de LDL-c e de TGs, com a tendência de incremento de Total-c e de HDL-c a não contrapor as alterações anteriores no que concerne ao cálculo das relações LDL-c/Total-c e LDL-c/HDL-c, que se encontravam aumentadas. Em contraponto, a razão Total-c/HDL-c sofreu uma redução que constituiu um efeito benéfico. A enzima CK conheceu um aumento da sua concentração sérica no grupo EPO, o que pensamos se possa dever a interações da molécula de eritropoietina com os receptores da membrana do sarcolema, condicionando positivamente a extrusão da CK para a circulação (Câmara e Silva e col., 2007).

No que concerne ao SNS, assistiu-se no grupo suplantado com rhEPO a uma diminuição significativa da concentração de NA e de AD plaquetar e nas suprarrenais (tendencial), podendo essa diminuição estar associada a uma maior libertação dessas CAs para a circulação onde poderão estar aumentados os mecanismos de inativação, de metabolização e/ou de conjugação, não se reflectindo por isso nas concentrações plasmáticas. Contudo, os valores nos tecidos periféricos foram invariavelmente superiores, o que contrasta com a ausência de diferenças nos conteúdos de NA e de AD no cérebro, não obstante o seu precursor (a DA) estar significativamente reduzida no grupo rhEPO (Fig. 81).

Já o sistema serotoninérgico patenteou, no grupo EPO, uma diminuição de 5-HT no plasma e um aumento nas plaquetas, tendo o seu metabolito, 5-HIAA, registado uma variação inversa. O aumento da concentração de 5-HT nas plaquetas poderá resultar de uma menor metabolização a 5-HIAA, cujo conteúdo estava diminuído, de uma menor libertação para o plasma, cujos níveis, uma vez mais, estavam igualmente reduzidos e, por fim, de um aumento da captação plaquetar, cujo mecanismos é semelhante ao

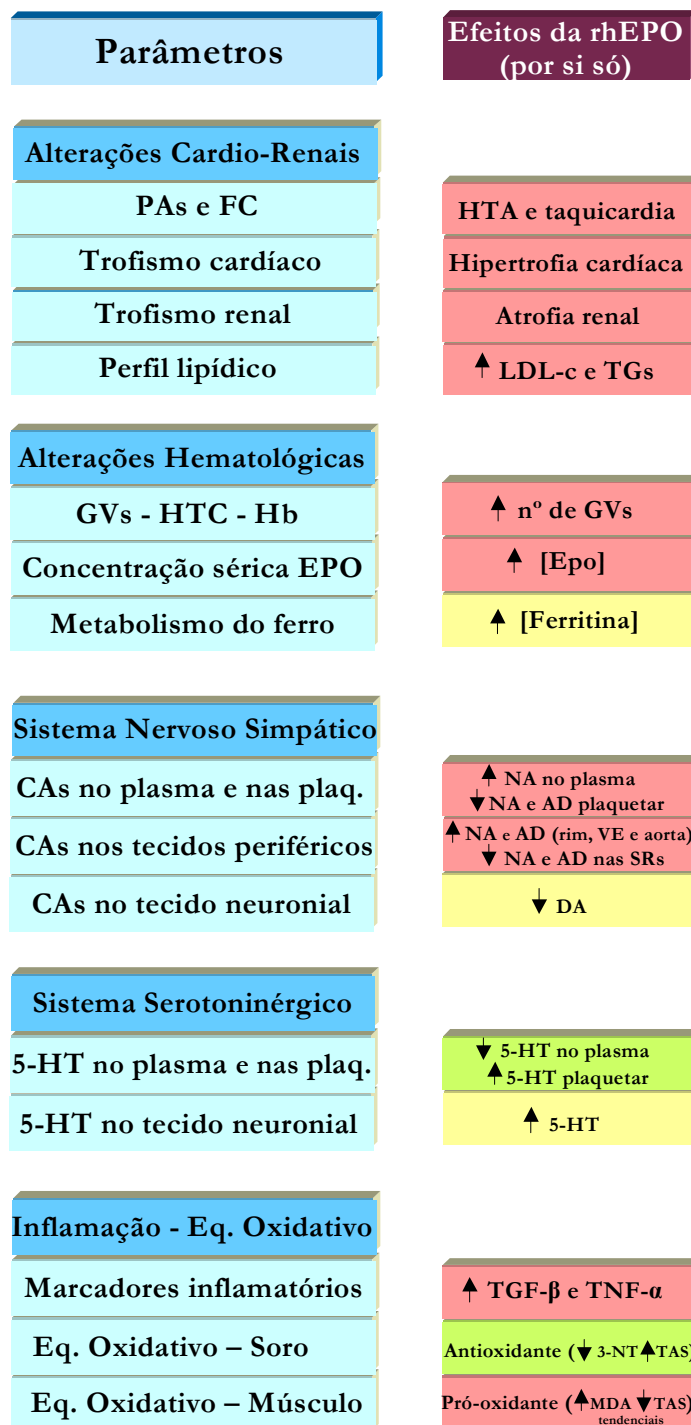


Fig. 81 – Diagrama dos principais efeitos do tratamento com rhEPO em ratos normais.

neuronal, onde o conteúdo também estava aumentado. Em termos dinâmicos, a presença de menor 5-HT no plasma (e maior nas plaquetas) é um factor que não

representa agressividade vascular/plaquetar (Fig. 81).

Os marcadores inflamatórios estudados reivindicam um papel pró-inflamatório para a acção da rhEPO, visto os valores de TNF- α e de TGF- β estarem aumentados face aos do grupo controlo. Estes resultados contrariam estudos publicados que avançam um carácter protector da administração de rhEPO contra a inflamação. Contudo, ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos pelos quais a rhEPO modula os processos inflamatórios (Jie e col., 2006).

Para a pronúnciação acerca do equilíbrio oxidativo, verificou-se um aumento de TAS e uma diminuição da concentração de 3-NT, ambos no soro, o que é sinónimo de um papel protector contra stresse oxidativo, o que está de acordo com Halliwell e Gutteridge que, em 1999, sugeriram que a rhEPO tinha uma acção forte nos sistemas de defesa antioxidante, talvez pelo aumento do número de eritrócitos, os quais são altamente efectivos na protecção contra os radicais livres. Já a nível muscular as variações são indicativas de um efeito pró-oxidante, expresso pelo aumento da razão MDA/TAS (Fig. 81). Esta aparente contradição de efeitos da EPO ao nível do equilíbrio oxidativo não é exclusiva dos nossos resultados, havendo trabalhos que a descrevem como protectora em determinadas circunstâncias, como é o caso da nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina (Kasap e col., 2008) ou em células renais de ratos Dahl sensíveis a sal, um modelo animal de lesão intersticial tubular (Katavetin e col., 2007), enquanto outros estudos a apontam como pró-oxidante. Com efeito, no estudo de Cayla e col. (2008), a EPO promoveu uma mudança da via energética, passando os ratos da via glicolítica para a oxidativa lenta (cadeia de transporte de electrões), com eventual aumento da formação de radicais livres, não obstante a melhoria da *performance* que advém da maior produção de energia e oxigenação tecidual.

Em termos sumários, poder-se-á dizer que a rhEPO, por si só, administrada por um período de 10 semanas, na dose de 50 UI/kg/semana, promove os seguintes efeitos (expressos no diagrama da Fig. 81): - aumento das pressões arteriais, frequência e massa cardíaca; - hiperlipidemia (sobretudo de LDL-c e TGs); - aumento do conteúdo plasmático de catecolaminas e plaquetar e neuronal de 5-HT; - incremento dos marcadores inflamatórios (TNF- α e TGF- β); - aumento do stresse oxidativo no tecido muscular mas protecção em circulação.

B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crónico (natação)

Constatou-se um incremento do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do hematócrito no grupo Ex+EPO relativamente a todos os outros, o que atesta um *status* fisiológico mais vantajoso para a prática desportiva, mas hipoteticamente mais nefasto em termos de risco cardiovascular, dado o expectável aumento da viscosidade sanguínea (Fig. 82).

A concentração sérica de EPO não revelou alterações nos grupos sob condicionamento físico, tendo o grupo EPO registado um aumento superior, facto que já foi descrito e discutido anteriormente. No que concerne ao metabolismo do ferro, não ocorreram alterações relevantes o que indicia uma aparente normalidade neste âmbito. Isto é, a administração de rhEPO não altera os níveis de ferro/transferrina e ferritina em relação aos do grupo exercício, cujos valores também eram praticamente normais, com um aumento tendencial do conteúdo em ferritina (Fig. 82).

No grupo submetido a tratamento com rhEPO e prática desportiva verificou-se um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca comparativamente ao grupo de ratos exclusivamente sujeitos a exercício. Estes dados estão em consonância com os resultados descritos por Natali e colaboradores (1996) que obtiveram uma acção idêntica, dando provimento ao aconselhamento da prática regular de natação como um bom coadjuvante terapêutico de doenças cardiovasculares crónicas. Também para Medeiros e col. (2000) a natação representava uma forma de exercício físico eficiente para a promoção de adaptações centrais (cardiovasculares) e periféricas (músculo-esqueléticas) em ratos. Contudo, os nossos resultados demonstram que em indivíduos desportistas/atletas, a utilização crónica de rhEPO promove um aumento das pressões arteriais.

Os grupos que efectuaram o treino físico obtiveram pesos corporais finais mais reduzidos que os grupos Ctrl e EPO, tendência essa que começou a ser mais perceptível a partir da sexta semana de treino, como mostra o gráfico da variação do peso corporal ao longo do tempo, sendo esta redução esperada dada a intensidade, mas sobretudo a frequência e duração da natação.

Os pesos do coração e do VE estavam aumentados no grupo Ex+EPO *versus* grupo Ex, aumentos esses confirmados pelas relações do trofismo cardíaco. Vislumbraram-se para as razões SRs/PC e Músculo/PC variações não observadas pelo singelo e individual peso dos órgãos, com valores mais elevados nos grupos fisicamente activos, o que indicia uma activação ou estimulação das suprarrenais que pode propiciar o seu crescimento tecidual. Tal também parece ser válido em termos musculares, sendo que o músculo recolhido para análise é o das patas posteriores dos ratos (responsáveis maiores pelos movimentos natatórios) e equivalente ao quadrípede humano.

Os principais resultados relativos aos parâmetros bioquímicos foram (Fig. 82):

- em relação à função renal, a diminuição da concentração de azoto ureico e de ácido úrico no grupo Ex, foi prevenida no grupo com rhEPO e Ex; a concentração de CK estava substancialmente aumentada nos ratos submetidos a exercício crónico, sendo grandemente reduzida após administração de rhEPO, o que é contrastante com o seu efeito em tratamento individual. Isto é, tanto o exercício como a rhEPO aumentam isoladamente a concentração de CK, mas deprimem-na quando em conjunto. Este resultado deverá merecer atenção e confirmação em trabalhos futuros;

- no perfil lipídico, o treino físico possibilitou reduções de Total-c e TGs e um aumento de LDL-c (potencialmente nefasto), o que está de acordo com Burneiko e col. (2004) que obtiveram, com o mesmo tipo de ratos e com protocolo de natação similar, efeitos benéficos no perfil lipídico sérico, fortalecendo assim os nossos resultados. A administração de rhEPO não modificou significativamente os valores do perfil lipídico em relação aos ratos apenas em treino (sem rhEPO).

O grupo Ex+EPO obteve concentrações mais elevadas de NA e AD no plasma que os restantes grupos, nomeadamente que o grupo Ex. No caso da AD esse aumento poderá resultar de uma redução do conteúdo nas plaquetas. No que diz respeito aos tecidos periféricos, constatou-se que a administração de rhEPO em ratos sujeitos a treino crónico promoveu (em relação ao grupo exercício mas sem rhEPO) uma redução tendencial de NA, AD e DA no ventrículo esquerdo, na aorta, no rim (excepto NA) e nas SRs (excepto AD). Estas alterações fazem supor um aumento da activação do SNS, com libertação de catecolaminas, que se acumulam no plasma, originando perturbações vasculares, plaquetares e cardíacas (Fig. 82).

Quanto ao sistema serotoninérgico, assistiu-se a um aumento quase generalizado das concentrações de 5-HT e de 5-HIAA, sendo a exceção o valor de 5-HT nas plaquetas, idêntico ao do grupo Ex. Isto é, enquanto para o grupo Ex as plaquetas e os mecanismos de metabolização e de inativação atenuam de alguma forma o conteúdo plasmático, para o grupo Ex+EPO esses factores parecem não ser suficientes, representando, por isso, um risco cardiovascular acrescido devido à maior quantidade circulante desta substância endógena vasoconstritora e pró-agregante. Estes dados estão de acordo com o efeito hipertensor atrás mencionado e já descrito em outros estudos (Azzadin e col., 1995; Tsukahara e col., 1997). De acordo com Azzadin e col. (1995), as alterações dos conteúdos de 5-HT no plasma e nas plaquetas poderão estar envolvidas no efeito hipertensor originado pela EPO.

No que diz respeito aos marcadores de inflamação, observou-se um aumento da IL-2 e do TGF- β no grupo Ex+EPO face ao grupo Ex, o que perfaz uma deterioração da condição inflamatória no grupo suplantado com rhEPO. Dada a natureza anti-inflamatória atribuída à rhEPO, por si só, esta sinergia agudizante ficará a dever-se à combinação de condições (rhEPO+Ex crónico), suportando uma vez mais a ideia de que em condições de exercício crónico a administração de rhEPO é potencialmente nefasta.

O mesmo entendimento parece ser observado para os indicadores de equilíbrio oxidativo, nomeadamente a nível muscular. Com efeito, no soro os principais dados apontam para uma redução de MDA no grupo Ex face ao Ctrl, que pode ser visto como um efeito benéfico se tal variação for o efeito da natação por si só. A administração de rhEPO não produziu alterações significativas *versus* grupo Ex, tanto no MDA e 3-NT, como no TAS, ainda que a tendência seja pró-oxidante, como parecem demonstrar os valores da razão MDA/TAS. Já no tecido muscular o exercício por si só tende a aumentar a concentração de MDA e a reduzir a de TAS, com aumento da razão MDA/TAS, ou seja, efeito igualmente pró-oxidativo (Fig. 82), o que parece ser contrário a alguma literatura nesta área (Cooper e col., 2002; Aguilo e col., 2003; Katavetin e col., 2007; Kasap e col., 2008), mas em concordância com outros estudos, nomeadamente o de Cayla e col. (2008) em ratos com rhEPO, reafirmando um aspecto duplo da EPO a este nível, aparentemente dependendo das circunstâncias em causa.

Parâmetros	Efeitos do Ex. Crônico (natação)	Efeitos da rhEPO no Ex. crônico
Alterações Cardio-Renais		
PA's e FC	Hipertensão	↑ HTA e taquicardia
Trofismo cardíaco	Não altera	Hipertrofia cardíaca
Trofismo renal	Não altera	Não afecta
Função renal	↓ Az. Ureico e Ác. Úrico	Repõe
Perfil lipídico	↓ Total-c e TG's ↑ LDL-c	Não afecta
Alterações Hematológicas		
GVs - HTC - Hb	Tende a ↑ n° de GV's	↑ GV's, HTC e Hb
Concentração sérica EPO	Tende a ↑ [Epo]	Não afecta
Metabolismo do ferro	Tende a ↑ [Ferritina]	Não afecta
Sistema Nervoso Simpático		
CAs no plasma e nas plaq.	↑ NA e AD plaquetar	↑ CAs no plasma Previne ↑ plaquetar
CAs nos tecidos periféricos	↑ CAs rim, VE e aorta ↓ AD e DA nas SRs	Atenua parcialmente Previne ↓ nas SRs
CAs no tecido neuronal	↓ DA	↑ DA e AD
Sistema Serotoninérgico		
5-HT no plasma e nas plaq.	↓ 5-HT no plasma ↑ 5-HT plaquetar	↑ 5-HT no plasma Não reverte ↑ plaquetar
5-HT no tecido neuronal	Não altera	Não afecta
Inflamação - Eq. Oxidativo		
Marcadores inflamatórios	Não altera	↑ TGF-β e tende ↑ IL-2
Eq. Oxidativo – Soro	Antioxidante (↓ MDA/TAS)	Não afecta
Eq. Oxidativo – Músculo	Pró-oxidante (↑ MDA/TAS)	Agrava

Fig. 82 – Diagrama dos principais efeitos do exercício crônico e da influência da rhEPO.

No início da oitava semana de treino um rato pertencente ao grupo Ex+EPO (n=8) sucumbiu subitamente durante os minutos iniciais de uma sessão de natação, de 60 minutos. Todos os esforços e tentativas de reanimação foram realizados o mais rapidamente possível, revelando-se, contudo, infrutíferos. A recolha de sangue, que seria um elemento essencial para o auxílio ao diagnóstico da causa de morte, ficou comprometida pelo tempo e diligência impostos no socorro do animal. Assim, procedeu-se à recolha e pesagem de rins, pulmões, cérebro, coração e fígado para avaliação da possível causa da morte.

Constatou-se que o peso do coração deste rato era de 1,82 gramas e a relação peso coração/PC era de 4,04 o que, comparativamente às médias obtidas para os restantes elementos do grupo Ex+EPO (1,40 e 3,06 gramas, respectivamente), evidencia o tremendo esforço a que o coração deste rato estava sujeito.

Para o desiderato anterior ser tangível contamos com a preciosa colaboração da Anatomia Patológica da FMUC e HUC, que nos facultaram, após observação histológica, os seguintes resultados: alterações, ainda que ligeiras, na estrutura do tecido renal, com eosinofilia na região glomerular e aumento do volume celular tubular. Pulmão sem marcas de afogamento, exibindo sinais de congestão, hemorragia alveolar e anóxia. O coração apresentava hipertrofia VE e desregulação de algumas fibras cardíacas, colocando-se a hipótese de fibrilhação ventricular como causa de morte. O fígado encontrava-se congestionado, nomeadamente na região centro-lobular, sendo também denominado de “fígado cardíaco”. Mais ainda, também o cérebro apresentava congestão vascular generalizada, possivelmente resultante de isquémia e anóxia.

Em suma, podemos dizer que a administração de rhEPO em ratos submetidos a exercício físico continuado promove um aumento da concentração de GVs, da hemoglobina e do hematócrito, sugerindo um aumento da viscosidade sanguínea, mas também hipertensão arterial, hipertrofia cardíaca e ventricular esquerda; hiperactivação simpática e serotoninérgica, stresse oxidativo muscular e inflamação, sugerindo um claro aumento do risco cardiovascular. A morte de um rato no grupo Ex+EPO, com modificações cardíacas estruturais evidentes, ou seja, presumivelmente por um incidente cardíaco resultante dos efeitos cumulativos da rhEPO, num universo de oito elementos administrados com rhEPO (>10%), representa um inequívoco alerta acerca dos riscos, inclusive de vida, da prática de *doping* continuado com rhEPO em atletas.

Estudo 2 – Efeitos da rhEPO em diferentes formas de exercício agudo (natação *versus* corrida)

A prova extenuante ilustrou de forma inequívoca que os ratos dopados com rhEPO (grupos EPO+Ex) foram mais resistentes, em cerca de 5 minutos, para ambas as modalidades de exercício aeróbio (natação e corrida). A corrida em passadeira permitiu a recolha do dado relativo à distância percorrida, tendo, uma vez mais, os ratos do grupo EPO+Ex alcançado maior destaque. Estes itens sugerem, por extrapolação, que numa prova cronometrada estes ratos beneficiariam dos melhores registos e porventura coroação desportiva (medalhas). Ekblom e col. (1991) mostraram que o *doping* sanguíneo aumentava o $VO_{2máx}$ e o tempo de corrida até exaustão em 9% e 23%, respectivamente, o que corrobora os nossos resultados.

O número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o hematócrito reflectiram o mesmo padrão comportamental para ambas as modalidades sujeitas à sessão extenuante. Verificou-se uma redução efectiva no grupo EPO+Ex face ao grupo Ex da natação e tendencial no grupo EPO+Ex da corrida *versus* Ex, o que denota desde logo uma ineficácia da rhEPO na estimulação da eritropoiese. Considerando que a concentração de EPO quantificada foi superior no grupo Ex+EPO relativamente ao grupo Ex, tanto na natação como na corrida, estamos perante uma de duas possibilidades: a) poderá ter ocorrido uma dessensibilização à rhEPO, por efeitos eventualmente ao nível dos seus receptores eritropoiéticos, o que originaria uma redução da produção de GVs e, conseqüentemente do hematócrito; b) poderá ter ocorrido ainda, no grupo da natação, o que sofreu maior redução do hematócrito, um aumento da volémia e hemodiluição, por ingestão da água do “banho”. A ser verdade, este efeito será estimulado pela presença de rhEPO, uma vez que no grupo da natação sem rhEPO o hematócrito foi substancialmente mais elevado. A diminuição na percentagem de reticulócitos, eritrócitos imaturos que são libertados para a corrente sanguínea em resposta a um estímulo da EPO, no grupo EPO+Ex da natação corrobora a impotência da estimulação eritropoiética (Fig. 83).

O metabolismo do ferro indicou um aumento da concentração sérica de ferro no grupo EPO+Ex da natação face aos demais grupos, enquanto a corrida propiciou valores

superiores de concentração de transferrina no soro em relação à natação, mas sem diferenças com e sem rhEPO. Podemos supor que, estando mais de 2/3 do ferro ligado à hemoglobina e tendo o grupo EPO+Ex da natação apresentado uma concentração de hemoglobina mais reduzida, este se encontra livre e assim legitime o aumento da concentração sérica de ferro verificada. A concentração sérica de ferritina asseverou aumentos apenas tendenciais na natação face à corrida em virtude dos elevados erros padrão da média (e.p.m.), esta contenda explica assim a superioridade evidenciada pela corrida na concentração sérica de transferrina, visto que as funções desempenhadas por ambas se complementam, como formas alternativas de admissão e aglomeração de ferro. Contudo, a presença de rhEPO não afectou, nem na corrida nem na natação, os valores séricos de transferrina e ferritina (grupos Ex+EPO *versus* grupos Ex) (Fig. 83).

Ao nível da bioquímica, a concentração de glicose revelou aumentos nos grupos EPO+Ex quer da natação quer da corrida, consignando quiçá uma melhor recuperação do esforço através de uma mobilização aprimorada de substratos energéticos. A concentração de azoto ureico obtida foi tendencialmente menor nos grupos da corrida face aos grupos da natação, sem diferenças entre grupos com e sem rhEPO.

No que diz respeito ao perfil lipídico, os valores foram genericamente mais elevados no grupo em natação comparativamente ao grupo da passadeira. O grupo EPO+Ex da natação apresentou uma redução do LDL-c e TGs face ao grupo Ex homólogo, o que numa sessão levada ao limite da fadiga, não tanto pela carga mas pelo seu volume, concedeu modificações benéficas no imediato, ditadas pela necessidade imperiosa de catabolização de ácidos gordos dos tecidos adiposos.

A actividade do sistema nervoso simpático periférico, caracterizada através da concentração plasmática de NA e de AD, deslindou um aumento no grupo da natação face ao da corrida, o que está de acordo com os resultados dos nossos trabalhos anteriores (Baptista e col., 2008). A utilização de rhEPO na corrida não promoveu alterações face ao grupo correspondente, enquanto que na natação a administração de rhEPO originou uma atenuação dos valores plasmáticos. Nos tecidos periféricos verificou-se que o grupo com rhEPO e natação atenuou algumas alterações originadas pelo exercício por si só, nomeadamente o aumento de CAs nas SRs e na aorta e a redução de AD no VE, contrariamente ao efeito quando adicionada a ratos em corrida.

Parâmetros	Natação vs Corrida	Efeitos da rhEPO na Natação	Efeitos da rhEPO na Corrida
Alterações Cardio-Renais			
Creatina cinase	Corrida tende para > CK	Tende a reduzir	Tende a corrigir
Função hepática	Valores idênticos	Não afecta	Não afecta
Função renal	< Az. Ureico na corrida	Não afecta	Não corrige
Perfil lipídico	Mais altos na natação	↓ LDL-c e TGs	↑ TGs
Alterações Hematológicas			
GVs - HTC - Hb	Valores idênticos	Corrige GVs/HTC/Hb	Não afecta
Concentração sérica EPO	Valores idênticos	↑ Epo	↑ Epo
Metabolismo do ferro	> Transferrina na corrida	↑ Ferro	Não corrige
Sistema Nervoso Simpático			
CAs no plasma e nas plaq.	> NA plaq./plasma natação	↓ CAs no plasma	Não afecta
CAs nos tecidos periféricos	> nas SRs e aorta na natação < AD no VE na natação	Atenua	↑ nas SRs e aorta Atenua > AD no VE
CAs no tecido neuronal	> AD na corrida no cérebro	↑ AD e ↓ DA	Atenua
Sistema Serotoninérgico			
5-HT no plasma e nas plaq.	Valores idênticos	↑ 5-HT/5-HIAA no plasma ↓ nas plaquetas	Tende para redução
5-HT no tecido neuronal	Valores idênticos	↑ 5-HT	Tende para ↑ 5-HT
Equilíbrio Oxidativo			
Eq. Oxidativo – Soro	Corrida é > pró-oxidante	Tende para antioxidante	Corrige parcialmente
Eq. Oxidativo – Músculo	Corrida é > pró-oxidante	Tende para antioxidante	Corrige parcialmente

Fig. 83 – Diagrama dos principais efeitos do exercício agudo (natação *versus* corrida) e da influência da rhEPO em ambos.

A nível central, a corrida apresenta valores superiores de AD *versus* natação. O tratamento concomitante com rhEPO atenuou aquele efeito na corrida e originou diminuição de DA e aumento de AD na natação (Fig. 83).

Relativamente ao sistema serotoninérgico, os valores de 5-HT e de 5-HIAA em circulação (plasma e plaquetas) e a nível central (cérebro) foram idênticos nos dois tipos de exercício. A administração de rhEPO originou efeitos diferenciados consoante o exercício em causa: tendeu para uma redução das concentrações circulantes e aumento de 5-HT no cérebro para a corrida, enquanto que na natação origina aumento no plasma e no cérebro e redução nas plaquetas (Fig. 83). Isto é, a associação de rhEPO à sessão aguda de natação revelou-se propiciadora de maior activação serotoninérgica (aumento de 5-HT no plasma por eventual síntese e/ou libertação pelos tecidos produtores e armazenadores: as células enterocromafins e os neurónios serotoninérgicos). Num estudo com ratos com insuficiência renal (uremia), os autores procederam à administração de rhEPO para protecção renal e correcção da anemia, tendo os animais desenvolvido hipertensão arterial, para a qual poderão ter contribuído as alterações ao nível do sistema serotoninérgico periférico, designadamente a acumulação de 5-HT em circulação (Azzadin e col., 1995).

A peroxidação lipídica, sendo um dos indicadores de lesão oxidativa, pode ser avaliada pela determinação de um dos seus produtos, o MDA, enquanto que a capacidade antioxidante total (TAS) permite-nos adquirir uma noção do estado das defesas antioxidantes; o cálculo da relação MDA/TAS confere, pois, maior elucidação sobre o equilíbrio oxidativo. Relativamente ao exercício agudo, não se obtiveram alterações significativas entre os dois tipos de exercício, ainda que a corrida seja claramente mais pró-oxidante, tal como já havia sido sugerido por nós em trabalhos anteriores (Baptista e col., 2008), e também por Souza e col. (2005) que obtiveram em corrida de passadeira de alta intensidade e de longa duração, realizada por humanos, um aumento da concentração plasmática de MDA, ou seja, uma estimulação do stresse oxidativo. Este dado poderá ser compatível com o nosso estudo, se se encarar o protocolo de corrida escolhido como uma forma de exercício intenso para os ratos. O tratamento com rhEPO tende a corrigir o efeito do exercício em passadeira e é tendencialmente antioxidante na natação, tanto a nível sistémico como muscular (Fig.

83). Um outro estudo, realizado por Cayla e col. (2008), em ratos submetidos a treino de *endurance*, demonstrou um perfil potencialmente pró-oxidativo da EPO face à maior oxigenação tecidual, mas também à eventual formação de espécies reactivas. De igual modo, em circunstâncias de exercício agudo extenuante a EPO revelou ter propriedades benéficas, nomeadamente ao nível da redução da inflamação, da promoção da angiogénese e da proliferação. Ou seja, estes dados parecem convergir para um efeito pró-oxidante da EPO em circunstâncias de exercício crónico e antioxidante quando associada a sessão aguda extenuante, sejam elas corrida ou natação.

Em suma, as principais diferenças entre a natação e a corrida foram: - melhores indicadores de perfil lipídico no grupo da corrida, mas marcadores oxidativos agravados; - maior activação do SNS para a natação. Relativamente ao efeito da administração de rhEPO no exercício físico agudo, as modificações mais relevantes foram: - maior resistência física; - hiperglicemia; - redução dos valores de perfil lipídico e protecção ampliada contra o stresse oxidativo. No caso da natação, realçam-se as modificações na hiperactivação simpática e serotoninérgica pré-existentes.

Estudo 3 – Efeitos da rhEPO no exercício (natação) crónico *versus* agudo

O número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o hematócrito do grupo que foi sujeito a treino físico e simultaneamente administração de rhEPO durante 10 semanas estavam aumentados comparativamente com o grupo suplementado *a priori* com rhEPO por um período de 3 semanas e que realizou uma sessão aguda ou extenuante (Fig. 84).

Tal disparidade não se ficou a dever, contudo, a uma menor concentração de EPO no soro, como poderíamos pensar em função do menor tempo de administração de rhEPO, ou seja, algum mecanismo enigmático subjacente aos constituintes do sangue e sua produção poderá estar comprometido, já que também os valores aumentados de HCM, CHCM e de VCM no grupo EPO+Ex do acto agudo parecem não estar ajustados com os da concentração de hemoglobina e de hematócrito, bem como a percentagem de reticulócitos, que registou uma diminuição abissal, o que atesta essa anormalidade.

Já o incremento no número de plaquetas e do PCT do grupo EPO+Ex do compromisso agudo parecem sugerir uma maior reactividade plaquetar, talvez adstrita a uma maior predisposição para eventos tromboembólicos.

Relativamente ao metabolismo do ferro, realça-se o aumento acentuado de ferritina no exercício agudo (idêntico nos grupos com e sem rhEPO), acompanhado por uma ligeira redução da transferrina. Em relação ao efeito da rhEPO, constatou-se que não afecta de forma significativa nenhum dos parâmetros no exercício crónico (treino), e aumenta substancialmente a concentração de ferro no exercício agudo, apesar de uma ligeira redução da transferrina.

A glicemia dos grupos que realizaram a sessão mais desgastante em termos energéticos estava aumentada, particularmente a do grupo EPO+Ex, o que associa a rhEPO a uma melhor harmonização e distribuição de glicose para os tecidos carenciados, sendo este factor apenas notório em estimulações curtas (exercício agudo). Os parâmetros bioquímicos inerentes à função renal e hepática revelaram-se superiores nos grupos sujeitos ao exercício agudo, o que não deve ser alheio a uma maior severidade metabólica/hemostática, reproduzível no imediato (Fig. 84).

A concentração de CK foi praticamente idêntica nos grupos Ex tanto do treino

crónico como do acto agudo, enquanto os grupos EPO+Ex de ambas as formas de exercício obtiveram valores bastante mais reduzidos, o que poderá indicar que a administração de rhEPO associada à prática desportiva confere um funcionamento muscular melhorado, representado pela permanência da enzima CK no sarcolema, desde que esta esteja activa.

Parâmetros	Ex. Crónico vs Ex. Agudo	Efeitos da rhEPO no Ex. crónico	Efeitos da rhEPO no Ex. agudo
Alterações Cardio-Renais			
Creatina cinase	Idêntica	Não afecta	Não afecta
Função hepática	Mais elevados no agudo	Não afecta	Não afecta
Função renal	Mais elevados no agudo	Não afecta	Não afecta
Perfil lipídico	Mais elevados no agudo	Atenua	Atenua
Alterações Hematológicas			
GVs - HTC - Hb	Aumento em ambos	↑ GVs, HTC e Hb	Corrige
Concentração sérica EPO	↑ [Epo] no crónico	Não corrige ↑Epo	Corrige ↓ Epo
Metabolismo do ferro	Ferritina > no agudo	Não corrige ↑ Ferritina	Não corrige ↑ Ferritina
Sistema Nervoso Simpático			
CAs no plasma e nas plaq.	Plasma > no agudo	↑ CAs no plasma Previne ↑ plaquetar	↑ CAs no plasma Previne ↑ plaquetar
CAs nos tecidos periféricos	Agudo > aorta e SRS Agudo < rim e VE	↓ NA no VE ↑ AD nas SRs	↓ CAs na aorta
CAs no tecido neuronal	> no agudo	↑ DA e AD	↑ AD
Sistema Serotoninérgico			
5-HT no plasma e nas plaq.	Agudo com > 5-HT plasma e < nas plaquetas	↓ 5-HT no plasma Não reverte ↑ plaquetar	↑ 5-HT no plasma ↑ nas plaquetas
5-HT no tecido neuronal	Agudo com < 5-HT	Não afecta	Não afecta
Equilíbrio Oxidativo			
Eq. Oxidativo – Soro	Crónico é > pró-oxidante	Pró-oxidante	Tende para antioxidante
Eq. Oxidativo – Músculo	Crónico é > pró-oxidante	Pró-oxidante	Tende para antioxidante

Fig. 84 – Diagrama dos principais efeitos do exercício crónico *versus* agudo e da influência da rhEPO em ambos.

No trabalho de King e col. (1995) foi sugerido que o tipo e intensidade do exercício físico poderá afectar de forma diferenciada o perfil lipídico. No estudo por eles realizado, constatou-se que a prática de exercícios aeróbios de intensidade moderada, por indivíduos de meia-idade, pode resultar em alterações benéficas nos níveis lipoproteicos, salientando-se que a frequência do exercício pode ser importante na produção dessas mudanças. No nosso estudo assistiu-se ao desenvolvimento de alterações claramente prejudiciais com o exercício agudo em relação ao exercício crónico, tendo a administração de rhEPO produzido efeitos benéficos em ambos os exercícios. Na literatura existe ainda controvérsia relativamente aos efeitos da rhEPO no metabolismo lipídico, não estando esses efeitos bem esclarecidos (Watson, 1989; Prata e col., 1990; Pollock e col., 1994; Allegra e col., 1997).

No exercício agudo assistiu-se a variações superiores dos teores de catecolaminas, estando aumentada no plasma, nas SRs, na aorta e cérebro *versus* exercício crónico. O tratamento com rhEPO promoveu um aumento dos teores plasmáticos e redução dos plaquetares (sobretudo para a NA), tanto no treino como no exercício extenuante. Ou seja, a rhEPO origina libertação de NA das plaquetas para o plasma. Já a concentração plasmática de AD estava bastante aumentada no grupo EPO+Ex do acto agudo, enquanto a plaquetar descortinou valores reduzidos no grupo Ex do exercício agudo, e por efeito da rhEPO. No que diz respeito à concentração nas SRs verificou-se que a sessão aguda promoveu aumentos relativamente ao treino crónico, tendo no rim ocorrido o inverso. A rhEPO não promoveu alterações de relevo em ambos os exercícios. No VE salientou-se o aumento de NA no grupo Ex do treino crónico face ao grupo EPO+Ex congénere. Já na aorta, e para as três CAs, os grupos da sessão aguda prevaleceram, com valores superiores aos do treino crónico. O conteúdo cerebral revelou concentrações de AD e de DA aumentadas no acto agudo, tendo os grupo EPO+Ex obtido incrementos relativamente aos grupos Ex, sem alterações significativas de NA (Fig. 84). Podemos dizer que a sessão aguda de natação despertou uma activação mais consistente que o treino crónico, em função dos aumentos verificados nas SRs, aorta e cérebro, ampliada pela hipotética libertação do conteúdo plaquetar de NA e de AD, com repercussão no plasma apenas para a AD. O efeito da rhEPO manifesta-se em circulação por aumento da NA plasmática (sobretudo no crónico) e AD (sobretudo no

agudo) eventualmente provenientes das plaquetas, cujo conteúdo de NA e AD diminui. Paralelamente, no exercício crónico há uma grande redução da concentração de NA no VE e tendencial nas SRs, enquanto que no agudo a rhEPO promove nos tecidos uma redução dos conteúdos neuroniais de AD e DA e de NA na aorta e tendencial no VE.

Em relação ao sistema serotoninérgico, realça-se o aumento plasmático de 5-HT no acto agudo, especialmente no grupo EPO+Ex, como resultado da eventual libertação pelas plaquetas, já que dispuseram uma concentração plaquetar de 5-HT inferior à do treino crónico, mas também por eventual aumento da síntese e posterior libertação pelo tecido neuronal, cujo conteúdo estava acrescido. As variações de metabolização parecem ter pouco significado para as variações de 5-HT. O valor de 5-HT aumentado no cérebro poderá remeter para fadiga central, compatível com o exercício agudo.

Em relação ao stresse oxidativo, verificou-se um efeito potencialmente pró-oxidante quando a rhEPO foi administrada em ratos treinados cronicamente do que quando dada a ratos em sessão extenuante. Este efeito no exercício agudo poderá ser entendido como uma protecção face às condições nefastas inerentes a esta prática. Pelo contrário, a potencial degradação face ao exercício crónico está de acordo com os restantes dados do trabalho, que indicam que a rhEPO é nefasta em treino prolongado. Este comportamento deverá ser futuramente comprovado, para se poder perceber se resulta ou não do facto de se proceder à administração de uma substância (hormona) quando em termos fisiológicos ela não é em teoria requerida.

Em suma, podemos dizer que a administração de rhEPO em ratos submetidos a exercício físico continuado (treino crónico) promove um efeito muito mais nefasto do que quando administrada para uma sessão de exercício pontual (agudo). Com efeito, verificou-se na administração prolongada (exercício crónico) um aumento da concentração de GVs, da hemoglobina e do hematócrito, sugerindo um aumento da viscosidade sanguínea, conjuntamente com desenvolvimento de hipertensão arterial, hiperactivação simpática, para além de agravamento dos perfis oxidativo e inflamatório, factores que na globalidade insinuam um explícito aumento do risco cardiovascular. Por outro lado, o efeito da rhEPO no exercício agudo manifestou-se principalmente por uma activação plaquetar, aumento da glicemia e contundente activação serotoninérgica, promovendo mesmo uma melhoria do equilíbrio oxidativo.

Estudo 4 – Variação da concentração sérica de EPO e do hemograma ao longo do tempo e em função da dose de rhEPO administrada

A variação do número de eritrócitos, do hematócrito e da concentração de hemoglobina obedeceu ao mesmo padrão de resposta nas duas doses de rhEPO testadas. Assim, observámos para a dose de EPO de 20 UI/kg que as aplicações subcutâneas após 3 semanas, ou seja, em T1, provocaram um aumento, dissipado e atenuado no final da 5ª semana de administração (T2), sendo corrigido nos tempos subsequentes (T3 e T4), que correspondem, respectivamente, a 2 e 5 semanas sem EPO exógena. Já para a dose de 50 UI/kg a diminuição sofrida em T2 teve maior amplitude, não se consumando uma correcção total em T4. Estes dados sugerem que numa 1ª fase a presença de rhEPO promove estimulação eritropoiética, que na 3ª semana (T1) é muito incipiente. Os valores encontrados após 1 ou 2 semanas deverão ser posteriormente verificados, no sentido de perceber se a estimulação máxima ocorre antes de T1. Contudo, é evidente que há no T2 (5 semanas) uma dessensibilização à rhEPO, que é mais acentuada para concentrações de EPO exógena superiores. Após a retirada da EPO exógena, a síntese de GVs recupera progressivamente, sendo mais fácil para doses inferiores de rhEPO. Assistiu-se, portanto, a uma diminuição da massa eritrocitária no final do tratamento com rhEPO, o que não é normal visto que após a interrupção da administração o efeito da hormona sobre a medula óssea se costuma prolongar por vários dias. O aumento obtido do hematócrito não foi o esperado já que pequenas doses de rhEPO (3x 15 UI/kg) provaram ser suficientes para elevá-lo significativamente (Jelkmann, 2002).

A percentagem de reticulócitos exibiu uma reacção semelhante em termos de resposta até ao T2. Contudo, após a retirada da rhEPO (em T3) verifica-se um acréscimo muito mais acentuado do que no número de GVs e hematócrito, valor que se aproxima dos níveis basais em T4. Ou seja, confirma-se a dessensibilização eritropoiética em T2 e a sua recuperação após retirada da rhEPO.

No que diz respeito à variação da concentração sérica de EPO assistiu-se para a dose de EPO mais pequena (20 UI/kg) a um incremento (quase insignificante) coincidente com as semanas de suplementação (T1 e T2), após a qual, houve uma regressão para perto dos valores iniciais em T4. Já para a dose mais elevada (50 UI/kg) ocorreu uma elevação significativa em T1 (3 semanas após o início da administração de rhEPO), seguida de uma queda em T2, eventualmente devido a uma hemostase na produção de EPO endógena (relembra-se que a EPO doseada corresponde à soma da endógena com a exógenamente administrada). Após a retirada da rhEPO em T2, verifica-se uma normalização progressiva para níveis similares aos basais (em T5).

Estas variações da concentração de EPO sugerem os seguintes comentários:

- Na dose mais moderada, a adição de rhEPO faz diminuir a concentração de EPO endógena, sendo a concentração de EPO medida (endógena + exógena) praticamente constante ao longo do tempo;

- A variação suave da concentração de EPO nesta dosagem foi acompanhada por uma também suave variação do perfil eritrocitário, com um pequeno aumento em T1, dessensibilização suave em T2 e recuperação após retirada da rhEPO.

- Na dose mais elevada ocorre uma elevação da EPO sérica em T1 (3ª semana), que corresponderá ao somatório da fornecida com a produzida endógenamente, altura onde a estimulação eritrocitária é aumentada, ainda que de forma suave.

- Na dose mais elevada verifica-se após a 5ª semana de administração (em T2) uma redução significativa dos valores de EPO doseada, que deverá resultar de uma resposta compensatória com supressão da produção endógena. Neste momento a estimulação eritrocitária volta a aproximar-se dos valores basais.

- Após a retirada da rhEPO, os níveis de EPO medidos diminuíram e a síntese eritropoiética recupera, ou seja, a EPO torna-se mais efectiva (funcional).

Não obstante a boa recuperação dos valores de EPO após uma administração prolongada (em T2: 5 semanas de tratamento), bem como do hemograma, o tempo de exposição parece ser suficiente para originar efeitos nefastos, que se descreveram nas sessões crónicas de exercício e tratamento com rhEPO. Para além disso, após a sua

retirada parece haver um período de tempo significativo até que os níveis de EPO (endógena) e a estimulação eritropoiética correspondente se aproximem de níveis basais. Se isto for transposto para a prática desportiva, podemos ter atletas com risco cardiovascular elevado enquanto praticavam exercício crónico e tomavam rhEPO, a avaliar pelos efeitos da rhEPO do estudo 1, que se somam aos problemas potenciais mesmo após deixar de tomar rhEPO, nomeadamente anemia e perpetuação das complicações relatadas (uma vez que os níveis de EPO não voltam tão cedo ao normal).

A concentração de ferro no soro compreendeu para a dose de EPO de 50 UI/kg um padrão de resposta inverso ao desta mesma dose para a concentração sérica de EPO e o hemograma, com excepção do T5. Ou seja, quando a concentração de EPO, o número de GVs, o hematócrito e a hemoglobina foram máximos (3 semanas após o início do tratamento com rhEPO), o conteúdo em ferro foi o menor, o mesmo sucedendo em T2, quando aqueles parâmetros foram revertidos e a concentração em ferro aumentou. Com excepção do T1, a ferritina registou um padrão de resposta idêntico para as duas doses em questão, sendo de referir que para a dose de EPO de 50 UI/kg as variações foram mais lineares e não tão bruscas como na dose menor. Já para a transferrina as duas doses de EPO originaram variações pouco perceptíveis entre si, diferindo, ainda que ligeiramente, na resposta à estimulação com rhEPO até T2, com a dose 20 de UI/kg a decair enquanto a de 50 UI/kg aumentava, concluindo o percurso, em T4, com valores iguais. Ou seja, o aumento da ferritina é patente desde a 3ª semana de administração de rhEPO, e permanece para além da sua retirada. Já o ferro varia inversamente aos níveis de EPO (endógena + exógena). A transferrina parece ser totalmente independente da rhEPO. Estas variações deverão merecer atenção particular em estudos subsequentes.

Assim, podemos afirmar que a dose de EPO de 50 UI/kg apresentou um carácter mais efectivo que a dose de 20 UI/kg, sendo a escolha por nós efectuada (50UI/kg), para assessoria do exercício crónico e agudo neste modelo animal experimental, a que desenvolve maior instabilidade no organismo e portanto, nos parece mais adequada para expor/reflectir os imbróglis da administração de rhEPO enquanto *doping*.

Advertências a reter para a prática desportiva humana

O *doping* e o desporto são dois termos antagónicos, ou seja, que nada têm em comum, ou supostamente não deviam ter. A prática do desporto deve ser um meio para melhorar a saúde do cidadão e para obter o domínio físico da pessoa por métodos naturais. Ora, o recurso a substâncias cuja finalidade consiste em aumentar, de maneira artificial, a *performance*, representa uma adulteração da prática desportiva, que deve ser repudiada e combatida.

Uma primeira explicação possível para a proliferação do *doping* encontra-se na anuência, pelas sociedades ocidentais, de uma certa cultura anárquica, pró-liberalização de drogas e da utilização de substâncias químicas/tóxicas como meio para melhorar as capacidades individuais em diferentes domínios. A nossa sociedade parece aceitar, de maneira implícita, a auto-estimulação através de substâncias e métodos artificiais, verificando-se um aumento da auto-medicação e do recurso a uma má utilização de medicamentos, muitas vezes sem nenhum controlo médico.

Outra das explicações possíveis é a comercialização crescente do desporto, as verbas de dinheiro envolvidas e a necessidade de rentabilizar os enormes investimentos dos patrocinadores. A pressão exercida pelos grandes patrocinadores e promotores sobre os atletas e aqueles que os enquadram explica, mas não desculpa, o recurso cada vez mais frequente aos métodos de *doping*. Os contratos cada vez mais exigentes das cadeias de televisão e dos intervenientes desportivos, as somas económicas astronómicas ligadas à publicidade, ao *marketing* e à obtenção de novos recordes do mundo levam os atletas a práticas contrárias à ética desportiva.

A eritropoietina (EPO) é uma hormona glicoproteica sintetizada predominantemente nos rins, que estimula a proliferação e a maturação final dos precursores das células eritrocitárias na medula óssea. O aumento dos glóbulos vermelhos em circulação pode elevar o fornecimento de oxigénio aos músculos, melhorando a *performance* desportiva. O aparecimento em termos terapêuticos/comerciais da eritropoietina recombinante humana (rhEPO) permitiu o seu uso indevido e diversificado no desporto. As autoridades desportivas proibiram a utilização da rhEPO

em 1988, e presentemente qualquer substância análoga ou mimética está também incluída na lista de substâncias proibidas da Agência Mundial Antidopagem (AMA).

A administração de rhEPO expande o poder aeróbio, um efeito mediado principalmente pela elevação do conteúdo de oxigênio no sangue que resulta de aumentos da concentração de hemoglobina e do hematócrito. Para os ciclistas e corredores altamente treinados, o poder aeróbico máximo ($VO_{2máx}$) é um dos pré-indicadores chave da *performance* em competições de *endurance*.

O Conselho Nacional Antidopagem (CNAD) obteve em 2007 96 análises positivas para a rhEPO, das quais 65 foram em ciclistas, 28 em praticantes de atletismo e 3 em triatletas, ou seja, desportos em que predomina a componente aeróbia e que são considerados de *endurance*. Figuras proeminentes do ciclismo profissional têm visto o seu nome associado ao *doping* com EPO em escândalos noticiados pelos *media*. O vencedor do *Tour* de 1996, o dinamarquês Bjarne Riis admitiu o uso desta hormona produzida artificialmente. Em 2005, o diário gaulês *L'Equipe* alegou que as amostras, de 1999, guardadas do campeão Lance Armstrong, evidenciavam o uso esta substância. Em Julho de 2007, o espanhol Iban Mayo acusou positivo no dia de descanso da Volta a França em bicicleta.

É intenção das autoridades de que a detecção da rhEPO seja cada vez mais aperfeiçoada, no entanto novas moléculas estimuladoras da eritropoiese, geradas a partir de EPO modificada, vêm sendo desenvolvidas pela indústria farmacêutica com a finalidade de prolongar a duração dos seus efeitos e reduzir a frequência da administração, tornando-se assim de grande interesse para atletas que fazem uso deste tipo de recurso ilícito. Os ciclistas italianos, Riccardo Riccò e Leonardo Piepoli, testaram positivo para CERA (EPO de 3ª geração) em 2008. Em Janeiro de 2009, numa entrevista à *Gazzeta dello Sport*, Piepoli reconheceu a utilização desta substância “num momento de fraqueza”.

O *doping* com rhEPO é não só ilegal e eticamente reprovável como potencialmente perigoso, dado que a eritrocitose excessiva e o previsível aumento da viscosidade sanguínea e, também, da trombogenicidade, acarretam riscos críveis e porventura fatais, já que elevar a densidade do sangue é sinónimo de risco aumentado de coagulação sanguínea, o que pode bloquear os vasos sanguíneos causando enfartes

do miocárdio ou acidentes cerebrovasculares. O uso de rhEPO também causa hipertensão e pode ocasionar ataque apoplético e falência congestiva do coração.

Desporto é desafio, superação dos limites, infelizmente, com o abuso de rhEPO, o limite a ser testado é o do hematócrito, visto que à medida que o atleta fica desidratado durante o treino ou competição, o volume sanguíneo é reduzido, ocasionando a ascensão do hematócrito e a resistência do sangue para fluir, o que pode pôr em risco a vida dos atletas.

O aparecimento trágico e cada vez menos ocasional de morte súbita com a prática desportiva, através de mecanismos não totalmente esclarecidos, poderá estar subjacente a práticas de *doping*, salientando-se a interacção promíscua entre rhEPO e risco cardiovascular. Esta associação reforça a necessidade e importância de um estudo mais aprofundado e revelador sobre os efeitos nefastos da rhEPO com o desiderato de alertar a comunidade médica e desportista. Tal intuito deve repercutir-se no exercício crónico como no agudo porque, como é sabido, são diferentes as suas implicações fisiológicas, inclusive a níveis distintos.

Do nosso trabalho, extrai-se de forma clara e inequívoca que a rhEPO origina importantes modificações cardiometabólicas quando associada ao exercício físico.

No exercício crónico (natação) verificámos que o grupo EPO+Ex registou níveis superiores de GVs, concentração de Hb e do HTC, o que sugere aumento da viscosidade sanguínea, aumentos das pressões arteriais, hiperactivação simpática e serotoninérgica, agravamento ou estabelecimento de inflamação e do stresse oxidativo; o que consigna a rhEPO como pró-risco hemorreológico e cardiovascular no treino continuado.

O exercício agudo apresenta por si só diferenças *versus* o exercício regular, sendo mais agressivo para o organismo em alguns aspectos, o que foi confirmado neste trabalho. No entanto, a conjugação com a administração precedente (durante 3 semanas) de rhEPO não revelou para as duas modalidades o esperado aumento dos marcadores indirectos de eritropoiese (membros do implementado “passaporte hematológico”), apesar do aumento da resistência física, ocorrendo mesmo uma tendência para protecção antioxidante da rhEPO. Assim, a administração de rhEPO em ratos submetidos a exercício físico manifestou-se mais funesta em circunstâncias que mimetizam o comportamento de um atleta de alta competição (treino crónico) do que

em condições que simulam a preparação (perspectiva do *doping*) e realização de uma sessão extenuante pontual (exercício agudo). Este facto poderá eventualmente justificar-se pelo facto de nestas circunstâncias (sessão aguda extenuante) ocorrer maior agressão orgânica, para a qual a EPO é protectora, até pelo menor tempo de exposição. Por outro lado, em circunstâncias de treino regular e continuado, aparentemente menos lesivo para o organismo, seus tecidos e órgãos, a rhEPO administrada expressa manifestações nefastas decorrentes dos seus efeitos sobre diferentes sistemas e órgãos (hematopoiéticos e não-hematopoiéticos).

Estes dados fazem questionar as razões da maleficência associada ao *doping* com rhEPO no exercício crónico, quando até nem parece danosa a nível cardiovascular quando é utilizada, por exemplo, para correcção de anemias em doentes com insuficiência renal crónica ou em lesões isquémicas cardíacas (Garrido, 2008).

Uma primeira questão é-nos colocada: - Seria de uma exposição (10 semanas), muito prolongada ao fármaco? Esta hipótese terá de ser melhor avaliada, até pelo facto de se saber que doentes com anemia, nomeadamente secundária à insuficiência renal, bem como atletas, usarem rhEPO continuamente por períodos de tempo que vão até os 6 meses (Lasne e de Ceaurriz, 2000). Pareceu-nos mais adequado apreciar o contributo de vários factores, como a administração ocorrer em circunstâncias desnecessárias (ou seja, sem que haja anemia), com possível acumulação de efeitos que desequilibram a homeostasia orgânica, fisiológica e bioquímica do organismo.

O abrupto acontecimento da morte súbita de um rato, pertencente ao grupo administrado com rhEPO e que realizava actividade física frequentemente, não poderia coadunar-se melhor com o que, aparentemente, sucede no desporto, em que alguns atletas (percentagem diminuta mas importantíssima, quando em causa está a vida humana) têm episódios inesperados face ao seu historial clínico, nomeadamente em modalidades mais conotadas ao *doping* e a esforços de *endurance*, como o ciclismo, o triatlo, o *ski* de fundo, corredores de atletismo de longa distância, entre outros.

Este trabalho evidenciou riscos e perigos importantes que poderão ser eventualmente reproduzíveis no homem, procurando uma consciencialização face ao torpor vigente e alertar para a afronta à saúde, que a utilização abusiva e ilegal, desleal e descomedida de substâncias dopantes poderá originar.

Capítulo IV – CONCLUSÕES

Estudo 1 – Efeitos da rhEPO no exercício crónico (treino)

A – Efeitos da rhEPO por si só

A administração de rhEPO, por um período de 10 semanas, na dose de 50 UI/kg/semana, em ratos não treinados, promoveu: - aumento das pressões arteriais, frequência e massa cardíaca; - hiperlipidemia (sobretudo de LDL-c e TGs); - aumento do conteúdo plaquetar e neuronal de 5-HT; - elevação dos marcadores inflamatórios (TNF- α e TGF- β); - aumento do stresse oxidativo muscular mas, todavia, conferindo protecção antioxidante em circulação (aumento de TAS e redução de 3-NT, ambos no soro).

B – Efeitos da rhEPO em ratos submetidos a treino aeróbio crónico (natação)

i) – Numa situação de exercício físico continuado, o tratamento com rhEPO originou: - aumento do hemograma (GVs, hemoglobina e hematócrito), o que sugere um aumento da viscosidade sanguínea, instigando ainda - hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca e do VE; - hiperactivação simpática e serotoninérgica; - stresse oxidativo, sobretudo no tecido muscular, e - inflamação, consolidando um risco cardiovascular acrescido.

ii) – A morte de um rato no grupo Ex+EPO (presumivelmente por um episódio cardíaco em resultado das modificações funcionais/estruturais acumuladas), num universo de oito elementos administrados com rhEPO (50 UI/kg/sem), representa um risco de vida com probabilidade superior a 10%, o que, quando transposto para a realidade desportiva humana, constitui um alerta eloquente acerca dos perigos da prática de *doping* continuado com rhEPO em atletas.

Estudo 2 – Efeitos da rhEPO no exercício agudo: natação vs corrida

i) – A prova aguda admitiu efeitos distintos consoante a modalidade em causa: - a corrida proporcionou, essencialmente, reduções benéficas do perfil lipídico (Total-c e LDL-c) e aumentos perniciosos dos marcadores pró-oxidantes; - enquanto a natação favoreceu claramente uma hiperactivação do sistema nervoso simpático.

ii) – Numa situação de exercício físico agudo, o tratamento precedente com rhEPO (durante 3 semanas) originou, tanto na corrida como na natação: - maior resistência física; - hiperglicemia; - melhoria do perfil lipídico e protecção ampliada (muscular e sistémica) contra o stresse oxidativo. Na natação, em particular, a rhEPO agrava a já existente activação do sistema nervoso simpático e serotoninérgico.

Estudo 3 – Efeitos da rhEPO no exercício crónico vs agudo

A aplicação subcutânea de rhEPO em ratos submetidos a exercício físico continuado (treino crónico) desenvolveu um efeito muito mais nefasto do que quando administrada por um espaço de tempo mais curto, para uma sessão de exercício pontual (agudo). Com efeito, verificou-se na administração prolongada (exercício crónico) o esperado aumento dos marcadores eritropoiéticos, sugerindo uma maior viscosidade sanguínea, acompanhado por desenvolvimento de hipertensão arterial, hiperactivação simpática e serotoninérgica, stresse oxidativo e inflamação, consubstanciando um risco cardiovascular acumulado. Por outro lado, o efeito da rhEPO no exercício agudo manifestou-se, principalmente, por propiciar activação plaquetar, aumento da glicemia e incisiva activação serotoninérgica, sem fornecer modificações de relevo ao nível do sistema nervoso simpático e inflamação, fomentando mesmo uma melhoria do perfil oxidativo.

Assim, conclui-se que os atletas em treino regular e doping com rhEPO são aqueles que se encontram em maior risco de sofrer complicações cardiometabólicas, ficando ainda sujeitos a outros riscos (nomeadamente anemia) após a retirada da rhEPO (estudo 4).

Parte IV – *Referências bibliográficas*

A

- ADAMSON JW.** Recombinant erythropoietin to improve athletic performance. *N Engl J Med.* 1991; 324: 698-9.
- ADAMSON JW.** Regulation of red blood cell production. *Am J Med.* 1996; 101: S4-6.
- AGUILO A, TAULER P, PILAR GUIX M, VILLA G, CORDOVA A, TUR JA, PONS A.** Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J Nutr Biochem.* 2003; 14 (6): 319-25.
- ALBERT CM, MITTLEMAN MA, CHAE CU, LEE IM, HENNEKENS CH.** Triggering of sudden death from cardiac causes by vigorous exertion. *N Engl J Med.* 2000; 343 (19): 1355-61.
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD.** Molecular biology of the cell. 3rd ed. *Garland Publishing.* 1994.
- ALESSIO HM, HAGERMAN AE, FULKERSON BK, AMBROSE J, RICE RE, WILEY RL.** Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32 (9): 1576-81.
- ANDERSON G, GORDON KC.** Tissue processing, microtomy and paraffin sections. Theory and practice of histological techniques. 4^a Ed. *Bancroft & Stevens.* 1996; 47-67.
- ARAÚJO CGS.** Fisiologia do exercício físico e hipertensão arterial. Uma breve introdução. *Rev Hipert.* 2001; 4.
- ARPAD AA, MASTROCOLLA LE, BERTOLAMI MC.** Actuação do exercício físico sobre os factores de risco para doenças cardiovasculares. *Rev Socesp.* 1996; 6: 1-5.
- ARRAIZ GA, WIGLE DT, MAO Y.** Risk assessment of physical activity and physical fitness in the Canada Health survey mortality follow-up study. *J Clin Epidemiol.* 1992; 45 (4): 419-28.
- ASHENDEN MJ, HAHN AG, MARTIN DT, LOGAN P, PARISOTTO R, GORE CJ.** A comparison of the physiological response to simulated altitude exposure and r-HuEPO administration. *J Sports Sci.* 2001; 19: 831-837.
- AZZADIN A, MYSLIWIEC J, WOLLNY T, MYSLIWIEC M, BUCZKO W.** Serotonin is involved in the pathogenesis of hypertension developing during erythropoietin treatment in uremic rats. *Thromb Res.* 1995; 77 (3): 217-24.

B

- BAER JT, AYRES SA.** Estrogen levels and lipid peroxidation following exercise. *Prev Cardiol.* 2001; 4 (2): 85-87.
- BABTISTA S, PILOTO N, REIS F, TEIXEIRA DE LEMOS E, GARRIDO AP, DIAS A, LOURENÇO M, PALMEIRO A, FERRER ANTUNES C, TEIXEIRA F.** Treadmill running and swimming imposes distinct cardiovascular physiological adaptations in the rat: focus on serotonergic and sympathetic nervous systems modulation. *Acta Phys Hung.* 2008; 95 (2): 235-251.
- BARROS NETO TL, CÉSAR MC, TEBEXRENI AS.** Fisiologia do exercício. O exercício. Preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos especiais e preventivos. *S P Atheneu.* 1999; 3-13.
- BARTSCH P, WELSCH B, ALBERT M, FRIEDMANN B, LEVI M, KRUTHHOF EK.** Balanced activation of coagulation and fibrinolysis after a 2-h triathlon. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27 (11): 1465-70.
- BAUMGARTNER HR, HOSANG M.** Platelets, platelet-derived growth factor and arteriosclerosis. *Experientia.* 1988; 44 (2): 109-12.
- BEGONHA R, MOURA D, GUIMARÃES S.** Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J Pharm Pharmacol.* 1995; 47 (6): 510-3.
- BELL C, ABRAMS J, NUTT D.** Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Br J Psyc.* 2001; 178: 399-405.
- BENZIE IFF, STRAIN JJ.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996; 239 (1): 70-76.
- BIRKELAND KI, STRAY-GUNDERSEN J, HEMMERSBACH P, HALLEN J, HAUG E, BAHR R.** Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 37: 1238-1243.
- BRUICK RK, MCKNIGHT SL.** A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001; 294: 1337-1340.
- BRUM PC, FORJAZ CM, TINUCCI T, NEGRÃO CE.** Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev Paul Educ Fís.* 2004; 18: 21-31.
- BULLEN JJ, ROGERS HJ, SPALDING PB, WARD CG.** Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 3-8.

BUTI A, FRIDMAN S. Drugs, sports and the law. *S Publ.* 2001; 27.

C

CAIRNS JA, GENT M, SINGER J, FINNIE KJ, FROGGATT GM, HOLDER DA, JABLONSKY G, KOSTUK WJ, MELENDEZ LJ, MYERS MG. Aspirin, sulfipyrazone, or both in unstable angina. Results of a Canadian multicenter trial. *N Engl J Med.* 1985; 313 (22): 1369-75.

CÂMARA E SILVA IA, DIAS R, SOTO-BLANCO B. Determinação das atividades séricas de creatina cinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em equídeos de diferentes categorias de actividade. *Arq Bras Med Zootec.* 2007; 59: 250-252.

CAYLA JL, MAIRE P, DUVALLET A, WAHRMANN JP. Erythropoietin induces a shift of muscle phenotype from fast glycolytic to slow oxidative. *Int J Sports Med.* 2008; 29 (6): 460-5.

CAZZOLA M. A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. *Haematologica.* 2002; 12: 68-72.

CAZZOLA M. Further concerns about the medical risks of blood doping. *Haematologica.* 2002; 87: 232.

CAZZOLA R, RUSSO-VOLPE S, CERVATO G, CESTARO B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33 (10): 924-30.

CHOI D, KIM M, PARK J. Erythropoietin: physical and biochemical analysis. *J Chromatogr B.* 1996; 687: 189-99.

CLEMENT DB, SAWCHUCK LL. Iron status and sports performance. *Sports Med.* 1984; 1: 65-74.

CLYNE N, BERGLUND B, EGBERG N. Treatment with recombinant human erythropoietin induces a moderate rise in hematocrit and thrombin anti-thrombin in healthy subjects. *Thromb Res.* 1995; 79: 125-9.

CONSTANTINESCU SN, GHAFARI S, LODISH HF. The erythropoietin receptor: structure activation and intracellular signal transduction. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10: 18-23.

COOK HC. Carbohydrates. Theory and practice of histological techniques. 4^a Ed. *Bancroft & Stevens.* 1996; 173-211.

- COOK JD.** The effect of endurance training on iron metabolism. *Semin Hematol.* 1994; 31: 146-54.
- COOPER CE, VOLLAARD NB, CHOUEIRI T, WILSON MT.** Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30 (2): 280-5.
- CORRY DB, TUCK ML.** Obesity, hypertension, and sympathetic nervous system activity. *Curr Hypertens Rep.* 1999; 1 (2): 119-26.
- COSTA ROSA LFBP.** Exercise as a time-conditioning effector in chronic disease: a complementary treatment strategy. *eCAM.* 2004; 1: 63-70.
- COWGILL LD, JAMES KM, LEVY JK, BROWNE JK, MILLER A, LOBINGIER RT.** Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *J Am Vet Med Assoc.* 1998; 212: 521–528.
- CUNLIFFE A, OBEID OA, POWELL-TUCK J.** A placebo controlled investigation of the effects of tryptophan or placebo on subjective and objective measures of fatigue. *Eur J Clin Nutr.* 1998; 52: 425-30.
- CUNLIFFE A, OBEID OA, POWELL-TUCK J.** Post-prandial changes in measures of fatigue: effect of a mixed or a pure carbohydrate or pure fat meal. *Eur J Clin Nutr.* 1997; 51: 831-8.
- CURZON G, KNOTT PJ.** Effects on plasma and brain tryptophan in the rat of drugs and hormones that influence the concentration of unesterified fatty acid in the plasma. *Br J Pharmac.* 1974; 50: 197-204.

D

- DALLMAN PR.** Manifestations of iron deficiency. *Semin Hematol.* 1982; 19: 19.
- DAVIES MJ, THOMAS AC, KNAPMAN PA, HANGARTNER JR.** Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation.* 1986; 73 (3): 418-27.
- DAVIS RB, BOYD DG, MCKINNEY ME, JONES CC.** Effects of exercise and exercise conditioning on blood platelet function. *Med Sci Sports Exerc.* 1990; 22 (1): 49-53.
- DEKKERS JC, VAN DOORNEN LJ, KEMPER HC.** The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 1996; 21 (3): 213-38.

DIAMANT-KANDARAKIS E. Erythropoietin abuse and erythropoietin gene doping: detection strategies in the genomic era. *Sport Med.* 2005; 35: 931-840.

DI MEO S, VENDITTI P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept.* 2001; 10 (1-2): 125-40.

DINE G, VAN LIERDE, REHN Y, GILLIER N. Problèmes associés à l`usage de l`érythropoietin en milieu sportif. *Immunoanal Biol Spéc.* 2001; 16: 235-43.

DINIZ YS, CICOGNA AC, PADOVANI CR, SILVA MD, FAINE LA, GALHARDI CM, RODRIGUES HG, NOVELLI EL. Dietary restriction and fibre supplementation: oxidative stress and metabolic shifting for cardiac health. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81 (11):1042-8.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82 (1): 47-95.

DUNN J, MARKHAM A. Epoetin beta, a review of its pharmacological properties and clinical use in the management of anemia with chronic renal failure. *Drugs.* 1996; 5: 299-318.

E

EDGERTON VR, OHIRA Y, HETTIARACHI J, GARDNER GW. Elevation of hemoglobin and work tolerance in iron deficient subjects. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1981; 27: 77.

EICHNER ER. Sports anemia, iron supplements and blood doping. *Med Sci Sports Exerc.* 1992; 24: S315-S318.

EKBLOM B. Blood doping and erythropoietin. The effects of variation in hemoglobin concentration and other related factors on physical performance. *Am J Sports Med.* 1996; 24: S40–S42.

EKBLOM BT. Blood boosting and sport. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000; 14: 89–98.

EKBLOM BT. Erythropoietin and performance-enhancing substances in sport and exercise. *Human Kinetics.* 2002; 101-107.

ELLIOTT S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *B J Pharm.* 2008; 154: 529–541.

ELLIOTT S, LORENZINI T, ASHER S, AOKI K, BRANKOW D, BUCK L. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 414–421.

EL-SAYED MS. Effects of exercise on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Sports Med.* 1996; 22 (5): 282-98.

EPSTEIN AC, GLEADLE JM, MCNEILL LA, HEWITSON KS, O'ROURKE J, MOLE DR. EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001; 107: 43–54.

ESTEPA V, RÓDENAS S, MARTÍN MC. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. Farm.* 2001; 67 (3): 1-17.

ESTERBAUER H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol. Biol.* 1996; 44 (1): 25-8.

F

FENSTER CP, WEINSIER RL, DARLEY-USMAR VM, PATEL RP. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes Res.* 2002; 10 (9): 964-8.

FINCH CA, HUEBERS MD. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med.* 1982; 25: 1520.

FISHER J. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Soc Exp Biol and Med.* 2003.

FITZGERALD DJ, ROY L, CATELLA F, FITZGERALD GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med.* 1986; 315 (16): 983-9.

FURLANI D, KLOPSCH C, GABEL R, UGURLUCAN M, PITTERMANN E, KLEE D, WAGNER K, LI W, WANG W, ONG LL, NIZZE H, TITZE U, LUTZOW K, LENDLEIN A, STEINHOF G, MA N. Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by forced swim test. *Transplant Proc.* 2008; 40 (4): 962-6.

G

GAREAU R, AUDRAN M, BAYNES RD, FLOWERS CH, DUVALLET A, SENÉCAL L. Erythropoietin abuse in athletes. *Nature.* 1996; 380: 113.

- GATÉ L, PAUL J, BA GN, TEW KD, TAPIERO H.** Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53 (4): 169-80.
- GAUDARD A, VARLET-MARIE E, BRESOLLE F, AUDRAN M.** Drugs for increasing oxygen transport and their potential use in doping a review. *Sports Med.* 2003; 33: 187–212.
- GAUTHIER J.** Effets cardiovasculaires du dopage. *Ann Cardiol Angeiol.* 2001; 50: 293-8.
- GIANNINI SD.** Aterosclerose/Dislipidémias, clínica e terapêutica: fundamentos práticos. *B G Cultural.* 1998.
- GINSBURG GS, O'TOOLE M, RIMM E, DOUGLAS PS, RIFAI N.** Gender differences in exercise-induced changes in sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon. Ginsburg-gender and exercise-induced lipid peroxidation. *Clin Chim Acta.* 2001; 305(1-2): 131-9.
- GOLDBERG MA.** Erythropoiesis, erythropoietin and iron metabolism in selective surgery: preoperative strategies for avoiding allogeneic blood exposure. *Am J Surg.* 1995; 179: S37-43.
- GOLDFARB AH.** Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25 (2): 232-6.
- GOLYSHENKOV SP, MEL'NIKOVA NA, LAPSHINA MV.** The effect of exercise on platelet aggregability and lipid peroxidation. *Fiziol Cheloveka.* 2004; 30(6): 96-102.
- GONZALES F, MANAS M, SEIQUER I, QUILES J, MATAIX FJ, HUERTAS JR.** Blood platelet function in healthy individuals of different ages. Effects of exercise and exercise conditioning. *J Sports Med Phys Fitness.* 1996; 36 (2): 112-6.
- GRANDJEAN PW, CROUSE SF, ROHACK JJ.** Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. *J Appl Physiol.* 2000; 89 (2): 472-80.
- GRASSI G, DELL'ORO R, FACCHINI A, QUARTI TREVANO F, BOLLA GB, MANCIA G.** Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens.* 2004; 22 (12): 2363-9.
- GREGG EW, GERZAFF RB, CASPERSEN CJ.** Relationship of walking to mortality among US adults with diabetes. *Arch Inter Med.* 2003; 163: 1440-7.
- GUEZENNEC CY.** Le dopage: efficacité, conséquences, prévention. *Ann Encocrinol.* 2001; 62: 33-41.

GUIMARÃES S, MOURA D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 2001; 53 (2): 319-56.

H

HALLE M, BERG A, BAUMSTARK MW, KEUL J. Association of physical fitness with LDL and HDL subfractions in young healthy men. *Int J Sports Med.* 1999; 20: 464-9.

HAMILTON KL, STAIB JL, PHILLIPS T, HESS A, LENNON SL, POWERS SK. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol. Med.* 2003; 34 (7): 800-9.

HAWKEY CM, BRITTON BJ, WOOD WG, PEELE M, IRVING MH. Changes in blood catecholamine levels and blood coagulation and fibrinolytic activity in response to graded exercise in man. *Br J Haematol.* 1975; 29 (3): 377-84.

HENRIKSEN EJ. Invited review: effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol.* 2002; 93: 788-96.

HELLSTEIN Y, APPLE F, SJODIN B. Effects of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1996; 81: 1484-7.

HELSTENSON CE, MACRES M, KATS AS, SCHNIEDERS JR, WATANABE M, SOBOTA JT. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. *Clin Pharmacol Ther.* 1991; 50: 702-12.

HIRSH PD, HILLIS LD, CAMPBELL WB, FIRTH BG, WILLERSON JT. Release of prostaglandins and thromboxane into the coronary circulation in patients with ischemic heart disease. *N Engl J Med.* 1981; 304 (12): 685-91.

HOLMSEN H, DAY HJ, STROMORKEN H. The blood platelet release reaction. *Scand J Haematol Suppl.* 1969; 8: 3-26.

HON WC, WILSON MI, HARLOS K, CLARIDGE TD, SCHOFIELD CJ, PUGH CW. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature.* 2002; 417: 975-978.

I

IACCARINO G, BARBATO E, CIPOLETTA E, FIORILLO A, TRIMARCO B. Role of the sympathetic nervous system in cardiac remodeling in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2001; 23 (1-2):35-43.

INAL M, AKYUZ F, TURGUT A, GETSFRID WM. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33: 564-7.

IRIGOYEN MC, ANGELIS KD, SCHAAN BDA, FIORINO P, MICHELINI LC. Exercício físico na diabetes mellitus associado à hipertensão arterial sistêmica. *Rev Bras Hipertens.* 2003; 10: 109-17.

IVAN M, KONDO K, YANG H, KIM W, VALIANDO J, OHH M. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001; 292: 464-468.

J

JANSEN JD, JANSEN LW, MADSEN JK, POULSEN J. The metabolism of erythropoietin in liver cirrhosis patients compared with healthy volunteers. *Eur J Haematol.* 1995; 54: 111-6.

JANSEN JD, MADSEN JK, JANSEN LW. Comparison of dose requirement, serum erythropoietin and blood pressure following intravenous and subcutaneous erythropoietin treatment in dialysis patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996; 50: 171-7.

JELKMANN W, PETERS C, SCHULZ T, MICHNA H. Biomedical side effects of doping. *Project European Union.* 2002; 6: 35-42.

JÓZKO AF, FAFF J, SIERADZAN-GABELZKA B. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur J Appl Physiol.* 1996; 74: 470-474.

K

KASAP B, SOYLU A, KURALAY F, SARIOGLU S, KIRAY M, TUGYAN K, TURKMEN M, KAVUKCU S. Protective effect of EPO on oxidative renal injury in rats with cyclosporine nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23 (11): 1991-9.

KATAVETIN P, INAGI R, MIYATA T, SHAO J, SASSA R, ADLER S, ETO N, KATO H, FUJITA T, NANGAKU M. Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 359 (4): 928-34.

KEYNES RG, GARTHWAITE J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Curr Mol Med.* 2004; 4 (2): 179-91.

KIM JD, YU BP, MCCARTER RJ, LEE SY, HERLIHY JT. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20 (1): 83-8.

KING CA, HASKELL WL, YOUNG DR, OKA RK, STEFANICK ML. Long-term effects of varying intensities and formats of physical activity on participation rates, fitness, and lipoproteins in men and women aged 50 to 65 years. *Circulation.* 1995; 91: 2596-604.

KINNUNEN S, HYYPA S, LAPPALAINEN J, OKSALA N, VENOJARVI M, NAKAO C, HANNINEN O, SEN CK, ATALAY M. Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *Eur J Appl Physiol.* 2005; 93 (4): 496-501.

KLETZMAYR J, SUNDER-PLASSMANN G, HORL WH. High dose intravenous iron: a note of caution. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 962–965.

KONIG D, WAGNER KH, ELMADFA I, BERG A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. *Exerc Immunol Rev.* 2001; 7: 108-33.

KRAUS WE, HOUMARD JA, DUSCHA BD, KNETZGER KJ, WHARTON MB, MCCARTNEY JS. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N England J Med.* 2002; 347: 1483-92.

KUMAR TC, REDDY VK, PRASAD M, THVAGARAJU K, REDDANNA M. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem.* 1992; 111: 109-15.

L

LAAKSONEN DE, LAKKA HM, SALONEN JT. Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2002; 25: 1612-18.

LAGE JMM, PANIZO C, MASDEU J, ROCHA E. Cyclist's doping associated with cerebral sinus thrombosis. *Neurology.* 2002; 360: 99-100.

LAHOVAARA S, PAASONEN MK, AIRAKSINEN MM. Rate of metabolism of adrenaline and 5-hydroxytryptamine by blood platelets. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 1968; 46 (3): 453-6.

LAMPRECHT M, GREILBERGER J, OETTL K. Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *Nutrition.* 2004; 20 (7-8): 728-30.

- LAVOIE C, DIGUET A, MILOT M, GAREAU R.** Erythropoietin (rHuEPO) doping: effects of exercise on anaerobic metabolism in rats. *Int J Sports Med.* 1998; 19: 281–286.
- LEAF DA, PARKER DL, SCHAAD D.** Changes in VO_{2max} , physical activity, and body fat with chronic exercise: effects on plasma lipids. *Med Sci Sports Exerc.* 1997; 29: 1152-9.
- LEHMANN M, HASLER K, BERGDOLT E, KEUL J.** Alpha-2-adrenoreceptor density on intact platelets and adrenaline-induced platelet aggregation in endurance- and nonendurance-trained subjects. *Int J Sports Med.* 1986; 7 (3): 172-6.
- LEVINE BD, STRAY-GUNDERSEN J.** ‘Living high-training low’ effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol.* 1997; 83: 102–112.
- LEWIS HD, DAVIS JW, ARCHIBALD DG, STEINKE WE, SMITHERMAN TC, DOHERTY JE, SCHNAPER HW, LEWINTER MM, LINARES E, POUGET JM, SABHARWL SC, CHESLER E, DEMOTS H.** Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med.* 1983; 309 (7): 396-403.
- LIN X, EL-SAYED MS, WATERHOUSE J, REILLY T.** Activation and disturbance of blood haemostasis following strenuous physical exercise. *Int J Sports Med.* 1999; 20 (3): 149-53.
- LIPPI G, FRANCHINI M, SALVAGNO G, GUIDI G.** Biochemistry, physiology, and complications of blood doping: facts and speculation. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006; 43: 349–391.
- LIU J, YEO HC, DONIGER SJ, AMES BN.** Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to tiobarbituric acid. *Anal. Biochem.* 1997; 245: 161-6.

M

- MAGNUSSON B, HALLBERG L, ROSSANDER L, SWOLIN B.** Iron metabolism and “sports anemia”- a hematological comparison of elite runners and control subjects. *Acta Med Scand.* 1984; 216: 157-164.
- MARON BJ, POLIAC LC, ROBERTS WO.** Risk for sudden cardiac death associated with marathon running. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28 (2): 428-31.

- MASSON N, WILLAM C, MAXWELL PH, PUGH CW, RATCLIFFE PJ.** Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J.* 2001; 20: 5197–5206.
- MASTALOUDIS A, LEONARD SW, TRABER MG.** Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 911-22.
- MATAIX J, QUILES JL, HUERTAS JR, BATTINO M, MANAS M.** Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radical Biol Med.* 1998; 24(4): 511-21.
- MAYER-DAVIS EJ, D'AGOSTINO RJR, KARTER AJ.** Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the insulin resistance atherosclerosis study. *JAMA.* 1998; 279: 669-74.
- MAUGHAN R, GLEESON M, GREENHAFF PL.** Bioquímica do exercício e do treinamento. *S P Manole.* 2000.
- MCARDLE WD, KATCH FI, KATCH VL.** Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 4^a ed. R de J Guanabara Koogan. 1998.
- MCBRIDE JM, KRAEMER WJ.** Free radicals, exercise and antioxidants. *J Strength Cond Res.* 1999; 13: 175-83.
- MCCULLOUGH KD, BARTFAY WJ.** The dose-dependent effects of chronic iron overload on the production of oxygen free radicals and vitamin E concentrations in the liver of a murine model. *Biol Res Nurs.* 2007; 8: 300–304.
- MCDONALD R, KEEN CL.** Iron, zinc and magnesium nutrition and athletic performance. *Sports Med.* 1988; 5: 171-184.
- MEILHAC O, RAMACHANDRAN S, CHIANG K, SANTANAM N, PARTHASARATHY S.** Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21 (10): 1681-8.
- MILLS DCB, ROBB ZA, ROBERTS GCK.** The release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation. *J Lab Clin Med.* 1968; 195: 715-729.
- MIYAZAKI H, OH-ISHI S, OOKAWARA T, KIZAKI T, TOSHINAI K, HA S, HAGA S, JI LL, OHNO H.** Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2001; 84(1-2): 1-6.

MORIAN M, LAVENNE EP, SCHEIFF J, DEBEYS C. Blood platelets. *Holograme Ed.* 1990.

MOORE GE. The role of exercise prescription in chronic disease. *J Sports Med.* 2004; 38: 6-7.

MOOREN FC, BLOMING D, LECHTERMANN A, LERCH MM, VOLKER K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol.* 2002; 10: 1152-63.

MORGADINHO MT, MACEDO TRA, TEIXEIRA FJ, FONTES RIBEIRO CA. Condições de recolha, preparação e conservação das amostras de sangue para doseamento de catecolaminas e indolaminas por cromatografia líquida de alta resolução com detecção electroquímica. *Revista Portuguesa de Farmácia.* 1989; 39 (3): 85-89.

MORRIS JN, EVERITT MG, POLLAND R, CHAVE SPW, SEMMENCE AM. Vigorous exercise in leisure-time: protection against coronary heart disease. *Lancet.* 1980; 2: 1207-10.

N

NEGRÃO CE, RONDON MUPB, KUNYOSH FHS, LIMA EG. Aspectos do treino físico na prevenção da hipertensão arterial. *Rev Hipertensão* 2001; 4.

NEWHOUSE IJ, CLEMENT DB. Iron status in athletes. *Sports Med.* 1988; 5: 337-352.

NISS AM, DICKHUTH HH, NORTHOFF H, FEHRENBACH E. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exerc Immunol Rev.* 1999; 5: 22-56.

O

OLIVEIRA MAB. Doping e coração. *Rev SOCERJ.* 2000;13: 53-60.

ORTEGA MA, BARRIGA C. Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators. *J Physiol.* 1997; 498: 729-734.

OSTROWSKI K, ROHDE T, ASP S, SCHJERLING P, PEDERSEN BK. Pro and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 1999; 15: 287-91.

P

PAFFENBARGER RS, HALE WE, HYDE RT. Work activity and coronary heart mortality. *N Engl J Med.* 1975; 292: 545-51.

PALMER BM, THAYER AM, SNYDER SM, MOORE RL. Shortening and [Ca²⁺] dynamics of left ventricular myocytes isolated from exercise-trained rats. *J Appl Physiol.* 1998; 85 (6): 2159-68.

PARISOTTO R, WU M, ASHENDEN MJ, EMSLIE KR, GORE CJ, HOWE C. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica.* 2001; 86: 128–137.

PÁSSARO LC, GODOY M. Reabilitação cardiovascular na hipertensão arterial. *Rev Socesp.* 1996; 6: 45-58.

PEARSON TA, BLAIR SN, DANIELS SR, ECKEL RH, FAIR JM, FORTMANN SP. Guidelines for primary prevention of cardiovascular disease and stroke: 2002 update. Consensus panel guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic vascular diseases. *Circulation* 2002; 106: 388-91.

PEIJIE C, HONGWU L, FENPENG X, JIE R, JIE Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. *Life Sciences.* 2003; 2: 20-4.

PERKKIO MV, JANSSON LT, BROOKS GA. Work performance in iron deficiency of increasing severity. *J Appl Physiol.* 1985; 58: 1477.

PLETSCHER A. Platelets as models: use and limitations. *Experientia.* 1988; 44 (2): 152-5.

POWERS SK, JI LL, LEEUWENBURGH C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 1999; 31: 987-97.

PUNTARULO S. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med.* 2005; 26: 299–312.

R

RAURAMAA R, SALONEN JT, SEPPANEN K, SALONEN R, VENALAINEN JM, IHANAINEN M, RISSANEN V. Inhibition of platelet aggregability by moderate-intensity physical exercise: a randomized clinical trial in overweight men. *Circulation.* 1986; 74 (5): 939-44.

- REIS F, TAVARES P, RITO LC, TEIXEIRA HM, SANTOS DIAS JD, FERRER-ANTUNES C, MESQUITA JF, TEIXEIRA F.** Platelet activation in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *J.Cardiovasc. Pharmacol.* 2000; 36 (1): 56-64.
- RENDIC S.** Human recombinant erythropoietin (rhuEPO) – physiology and biochemistry. *Sport und Buch Strauß.* 1997; 191-208.
- RIVER L, SAUGY M.** Peptides hormones abuse in sport: state of the art in the detection of growth hormone and erythropoietin. *J Toxicol-Toxin Reviews.* 2003.
- ROCK G, TITTLE P, PIPE A.** Coagulation factor changes following endurance exercise. *Clin J Sport Med.* 1997; 7 (2): 94-9.
- RONDON MUPB, BRUM PC.** Exercício físico como tratamento não farmacológico da hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2003; 10: 134-7.
- ROSSI L, TIRAPEGUI J.** Aminoácidos: bases actuais para sua suplementação na actividade física. *Ver Br Ciências Farm.* 2000; 36: 37-51.
- ROSSI L, TIRAPEGUI J.** Serotonergic system and its implications on physical exercise. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48 (2): 227-233.

S

- SANCHEZ-QUESADA JL, ORTEGA H, PAYÉS-ROMERO A.** LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis.* 1997; 132: 207-13.
- SCHNEIDER CD.** Avaliação do stress oxidativo em indivíduos submetidos a diferentes intensidades de exercício em esteira rolante (dissertação obtenção do título de mestre em ciências do movimento humano) *Esc Ed Fís Univ Rio Grande do Sul.* 2002.
- SCHUBERT A.** Hemoglobin-based oxygen carriers, blood substitutes, and their relevance to high-volume blood loss. *Semin Anesth.* 2001; 20: 78–84.
- SCOTT J, PHILLIPS GC.** Erythropoietin in sports: a new look an old problem. *Curr Sport Med Resp.* 2005; 4: 224-246.
- SEGURA R, VENTURA JL.** Effect of L-tryptophan supplementation on exercise performance. *Int J Sports Med.* 1988; 9: 301-5.
- SELAMOGLU S, TURGAY F, KAYATEKIN BM, GUNENC S, YSLEGEN C.** Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiol Hung.* 2000; 87: 267-73.

- SERMAN AR, KRAMER B.** Iron nutrition and exercise. *Nut Exerc and Sports*. 1990; 291-300.
- SILVERTHORN DU.** Fisiologia integrada. Fisiologia humana. Uma abordagem integrada. 2ª ed. B Manole. 2003.
- SINGH MP.** Role of host's antitumor immunity in exercise-dependent regression of murine T-cell lymphoma. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2005; 28: 231-48.
- SISCOVICK DS, WEISS NS, FLETCHER RH.** Habitual vigorous exercise and primary cardiac arrest: effect of other risk factors on the relationship. *J Chronic Dis*. 1984; 37: 625-31.
- SNEDDON JM.** Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. *Prog Neurobiol*. 1973; 1 (2): 151-98.
- STAHL SM.** Platelets as pharmacologic models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons. *The platelets: Physiology and pharmacology*. 1985, 307-340.
- STEFANICK ML, MACKAY S, SHEEHAN M, ELLSWORTH N, HASKELL WL, WOOD PD.** Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. *N Engl J Med*. 1998; 339: 12-20.
- STEVENS A, WILSON I.** The haematoxylin and eosin. Theory and practice of histological techniques. 4ª Ed. *Bancroft & Stevens*. 1996; 99-112.
- STEWART KJ.** Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA*. 2002; 288: 1622-31.
- STORRING PL, TIPLADY RJ, GAINES DAS RE, STENNING BE, LAMIKANRA A, RAFFERTY B.** Epoietin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol*. 1998; 100: 79-89.
- STRAY-GUNDERSEN J, VIDEMAN T, PENTTILA I, LEREIM I.** Abnormal hematologic profiles in elite cross-country skiers: blood doping or? *Clin J Sport Med*. 2003; 13: 132-137.
- SUASSUNA JHR.** Via de administração da eritropoietina. *J Bras Nefrol*. 2000; 22: 29-31.
- SUBUDHI AW, DAVIS SL, KIPP RW, ASKEW EW.** Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. *Int J Sport Nutr. Exerc. Metab*. 2001; 11: 32-41.

T

TANASESCU M, LEITZMANN, RIMM EB. Physical activity in relation to cardiovascular disease and total mortality among men with type 2 diabetes. *Circulation*. 2003; 107: 2435-9.

TAYLOR RP, CICCOLO JT, STARNES JW. Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide. *Cardiovasc Res*. 2003; 58 (3): 575-81.

TESSIER F, MARGARITIS I, RICHARD M-J, MOYNET C, MARCONNET P. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med Sci Sports Exerc*. 1995; 27: 390-6.

THAULOW E, ERIKSEN J, SANDVIK L, STORMORKEN H, COHN PF. Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation*. 1991; 84 (2): 613-7.

TURGUT G, DEMIR S, GENÇ O, KARABULUT I, AKALIN N. The effect of swimming exercise on lipid peroxidation in the rat brain, liver and heart. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 2003; 27 (2-3): 43-5.

U

URSO ML, CLARKSON PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003; 189 (1-2): 41-54.

V

VANCINI RL, BARBOSA DE LIRA CA, ABOULAFIA J. Radical livre, stresse oxidativo e exercício físico. *Unifesp*. 2005; 1-10.

VAN DER MEER P, VOORS AA, LIPSIC E. Erythropoietin in cardiovascular diseases. *Eur. Heart J*. 2004; 25 (4): 285-91.

VANHOUTTE PM. Platelet-derived serotonin, the endothelium, and cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991; 17 Suppl. 5: S6-12.

VARLET-MARIE E. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of recombinant human erythropoietins in doping control. *Sports Med*. 2003; 33: 301-315.

VARLET-MARIE E. Pharmacokinetics/pharmacodynamics: modeling of recombinant human erythropoietins in athletes. *Int J Sport Med*. 2003; 24: 252-257.

VIDER J, LEHTMAA J, KULLISAAR T, VIHALEMM T, ZILMER K, KAIRANE C, LANDOR A, KARU T, ZILMER M. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology*. 2001; 7 (4): 263-270.

VIITALA PE, NEWHOUSE IJ, LAVOIE N, GOTTARDO C. The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipids Health Dis*. 2004; 3: 14.

W

WANG J, JEN CJ, CHEN H. Effects of exercise training and deconditioning on platelet function in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 1668 - 1674.

WANG JS, JEN CJ, KUNG HC, LIN LJ, HSIUE TR, CHEN HI. Different effects of strenuous exercise and moderate exercise on platelet function in men. *Circulation*. 1994; 90 (6): 2877-85.

WEAVER CM, RAJARAM S. Exercise and iron status. *J Nutr*. 1992; 122: 782.

WEISS C, SEITEL G, BARTSCH P. Coagulation and fibrinolysis after moderate and very heavy exercise in healthy male subjects. *Med Sci Sports Exerc*. 1998; 30 (2): 246-51.

WHITE JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur J Clin Invest*. 1994; 24 (1): 25-9.

WHITMIRE D. Vitamins and minerals: a perspective in physical performance. *Sports Nut*. 1991; 133-144.

WILBER RL. Detection of DNA-recombinant human epoetinalfa as a pharmacological ergogenic aid. *Sports Med*. 2002; 32: 125–142.

WILMORE JH, COSTILL DL. Controlo cardiovascular durante o exercício. *Fisiologia do desporto e do exercício*. 2ª ed S P Manole. 2003.

WOODS JA, LU Q, CEDDIA MA, LOWDER T. Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol Kinetics*. 2000; 78: 545-553.

Y

YAMAMOTO J, LIZUMI H, HIROTA R, SHIMONAKA K, NAGAMATSU Y, HORIE N, MORITA S. Effect of physical training on thrombotic tendency in rats: decrease in thrombotic tendency measured by the He-Ne laser-induced thrombus formation method. *Haemostasis*. 1989; 19: 260-5.

YU JN, CUNNINGHAM JA, THOUIN SR, GURVICH T, LIU D. Hyperlipidemia. *Primary Care.* 2000; 27: 541-87.

Z

ZIOGAS GG, THOMAS TR, HARRIS WS. Exercise training, postprandial hypertriglyceridemia, and LDL subfraction distribution. *Med Sci Sports Exerc.* 1997; 29: 986-91.

ZORPETTE G. All doped up – and going for the gold. *Sci Am.* 2000; 282: 20-2.

I Consenso Nacional de Reabilitação Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 1997; 69 (4).

II Consenso brasileiro sobre dislipidémias: detecção, avaliação e tratamento. *Arq Bras Cardiol.* 1996; 67: 109-28.