

**MILENA SAMORA DOS SANTOS**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ERITROPOIETINA E  
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA  
CARDIOVASCULAR EM RATOS WISTAR.**

**UBERABA**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**Milena Samora dos Santos**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ERITROPOIETINA E  
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA  
CARDIOVASCULAR EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, área de concentração “Biodinâmica” (Linha de pesquisa: Exercício Físico, ajustes e adaptações neuromusculares e cardiorrespiratórias), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Octávio Barbosa Neto.

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Rosângela Soares Chrigger.

UBERABA

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

S236e Santos, Milena Samora dos  
Efeito da administração crônica de eritropoietina e treinamento físico sobre a modulação autonômica cardiovascular em ratos Wistar / Milena Samora dos Santos. -- 2016.  
82 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016  
Orientador: Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto  
Coorientadora: Profa. Dra. Rosângela Soares Chrigner

1. Eritropoietina. 2. Eritropoese. 3. Atividade motora. 4. Frequência cardíaca. I. Barbosa Neto, Octávio. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 577.17

**Milena Samora dos Santos**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ERITROPOIETINA E  
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA  
CARDIOVASCULAR EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, área de concentração “Biodinâmica” (Linha de pesquisa: Exercício Físico, ajustes e adaptações neuromusculares e cardiorrespiratórias), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 29 de janeiro de 2015.

Banca Examinadora:

---

Dr. Octávio Barbosa Neto – orientador  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Dr. Carlo José Freire De Oliveira  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Dr. Guilherme de Moraes Puga  
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico esse trabalho aos meus pais, Sandra e Júnior, pela paciência, confiança e amor incondicional. Aos meus irmãos, Leandro e Juliana, pelo incentivo e compreensão nos momentos que não me fiz presente. Vocês são tudo em minha vida!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela minha família, por todas as oportunidades criadas ao longo desta trajetória, e por ter me concedido sabedoria para enfrentar os desafios deste mestrado.

Uma enorme gratidão pelas pessoas que mais amo na vida: meus pais, Sandra e Júnior. Obrigada por disporem de todas as condições para eu realizar este mestrado, pelo apoio, amor e carinho incondicional. Obrigada por acreditarem em mim, vocês são minha maior fonte de motivação e exemplo de vida, essa conquista é POR vocês e PARA vocês.

Aos meus irmãos, Juliana e Leandro, por entenderem meus momentos de ausência e serem capazes de me ajudar sempre que necessário. Obrigada por fazerem parte disso, meus melhores amigos, seremos um só coração para sempre, amo vocês.

Obrigada minha família, Samora e Santos, tios, tias e primos, por terem vivido intensamente tudo isso comigo. Aos meus avós ausentes, em especial minha avó Adélia. Neste dia de vitória a saudade é enorme, mas sei que torceram por mim e tenho certeza que estão orgulhosos.

Aos meus amigos Ileana, Lilianny, Lorena, Pedro Ivo e Leandro por nunca duvidarem do meu potencial e estarem “juntos” nessa caminhada mesmo com a distância.

Aos meus colegas de classe, principalmente Alessandro e Marina que fazem parte do nosso grupo de pesquisa. Em especial, gostaria de agradecer ao Wellington (Tuco) que esteve ao meu lado desde o início das coletas, me ensinando cada dia ser mais paciente e, sendo meu ponto forte quando surgiam imprevistos. Obrigada pelos ensinamentos, foi muito bom estarmos juntos nessa jornada.

Agradeço os mestres que fizeram parte da minha formação acadêmica: Célio, Guilherme Agostini, Silvio, Marcus, Heitor e João. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos, vocês despertaram em mim a vontade de ensinar, educar e seguir a carreira acadêmica, são meus exemplos de docentes.

Agradeço meu orientador, Octávio, primeiramente por ter me aceitado como orientanda, confiado em minha capacidade de desenvolver este trabalho e em minha dedicação. Obrigada pela paciência, sabedoria e todo conhecimento compartilhado

nesses dois anos. Você é minha referência como pesquisador e educador. Suas orientações aperfeiçoaram meu trabalho e agradeço a experiência adquirida.

Aos professores e colaboradores, Lenaldo, Valdo, Ricardo, Rosângela e Camila pela disponibilidade em contribuir para meu trabalho e todos os ensinamentos. Aos técnicos do laboratório da Fisiologia e da Patologia, Angélica, Lucas, Lívia, Dom, Vandair, por executarem suas funções com excelência, sempre com muito zelo e dedicação.

Agradeço à Universidade Federal do Triângulo Mineiro por dispor da estrutura física para realização dos experimentos, à instituição CAPES/CNPQ que financiou os gastos relacionados à pesquisa e aos animais, que foram sacrificados em prol da ciência, farei o máximo para aproveitar cada dado extraído, cada experiência profissional e pessoal do meu contato com eles.

**“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.”**

**Ayrton Senna**

## RESUMO

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoproteico produzido principalmente pelos rins quando há diminuição da taxa de oxigênio circulante e sua função primordial é de regular a eritropoiese. Seu análogo invadiu os bastidores do cenário esportivo de alto rendimento, apresentando função ergogênica, já que atua sobre o coração, circulação, resistência aeróbica, aumentando a oxigenação tecidual, além de neutralizar a sensação de fadiga. Além disso, sabe-se que a EPO possui ações em tecidos não hematopoiéticos com função antiapoptótica, anti-inflamatória, de proliferação e diferenciação celular. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração crônica de EPO aliado ao treinamento físico sobre a modulação autonômica cardiovascular em ratos *Wistar*. Para isso, os animais foram distribuídos em quatro grupos: grupo controle sedentário (GCS, n=10), grupo controle treinado (GCT, n=8), grupo EPO sedentário (GES, n=10) e grupo EPO treinado (GET, n=8). Foram administrados 50 UI/kg de EPO (subcutânea) e o treinamento físico foi de natação (incrementando volume e intensidade). Depois de oito semanas de protocolo, foram avaliados os níveis basais da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA), a sensibilidade barorreflexa, o tônus autonômico cardíaco, a variabilidade da FC (VFC), da PA sistólica (VPAS) e diastólica (VPAD), a hipertrofia cardíaca e a fibrose cardíaca e renal. Para todos os resultados utilizou-se nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Os animais do GES e GET apresentaram valores aumentados de hemácias, hemoglobinas e hematócritos, comparados com seus respectivos grupos controles. Os animais do GCT exibiram uma bradicardia de repouso comparada ao GCS e um aumento do componente espectral de alta frequência (HF) na VFC. Porém, a EPO desencadeou um aumento da PAS no grupo sedentário comparado com o GCS, o que não foi evidenciado na PAD e PA média (PAM). Também não se observaram diferenças na sensibilidade barorreflexa e VPAS entre os grupos analisados, apenas na VPAD, onde o GET apresentou menor valor do componente espectral de baixa frequência (LF) comparado ao GCT. Não houve diferença entre o efeito vagal e simpático entre os grupos, por outro lado, o GCT apresentou menor tônus simpático do que o GCS. Curiosamente, o GET teve maior tônus vagal comparado com o GCT, a frequência intrínseca de marcapasso cardíaco (FIMC) apresentou-se aumentada no GES comparado com o GCS e o índice simpato-vagal mostrou-se reduzido nos grupos que receberam EPO comparados com seus respectivos controles. O GCT apresentou hipertrofia cardíaca e o GES apresentou um aumento no diâmetro do núcleo dos cardiomiócitos em comparação com o GCS. Ambos os grupos que receberam EPO apresentaram fibrose cardíaca e renal, comparados com os grupos controles. Sumarizando, nossos resultados sugerem que a administração crônica de EPO pode proporcionar uma alteração autonômica cardiovascular em ratos *Wistar*, sendo que, o aumento da ação parassimpática observada sobre o coração desses animais, pode ter ocorrido na tentativa

de reverter o aumento da FIMC causada pela fibrose. Nossos dados indicam ainda que o protocolo de treinamento físico por natação utilizado em nosso estudo foi ineficiente em reverter os danos aqui observados pelo uso da EPO.

**Palavras-chave:** Eritropoietina. Treinamento físico. Modulação autonômica cardiovascular. Variabilidade da frequência cardíaca. Fibrose cardíaca.

## ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone produced primarily by the kidney when there is a decrease in circulating oxygen level and your main function is to regulate erythropoiesis. Analog of EPO invaded the backstage of sporting high performance scenario, especially in aerobic modalities, because it acts on the heart, circulation, aerobic endurance, leading to an increased tissue oxygenation, decreasing the feeling of fatigue and an ergogenic function. Furthermore, it is known that EPO has actions in non-hematopoietic tissues with anti-apoptotic function, anti-inflammatory, cell proliferation and differentiation. Thus, this study aimed to evaluate the effects of chronic administration of EPO combined with exercise training on cardiovascular autonomic modulation in rats. For this, the animals were divided into four groups: sedentary control group (SCG, n = 10), trained control group (TCG, n = 8), sedentary EPO group (SEG, n = 10) and trained EPO group (TEG, n = 8). 50 IU / kg EPO were administered (subcutaneously) and swimming training (increasing volume and intensity). After eight weeks of protocol we evaluated the baseline heart rate (HR) and blood pressure (BP), baroreflex sensitivity, cardiac autonomic tone, HR variability (HRV), systolic BP (SBPV) and diastolic (DBPV), cardiac hypertrophy and cardiac and renal fibrosis. For all the results we used a significance level of  $p \leq 0,05$ . The animals of the SEG and TEG showed increased levels of red blood cells, hemoglobin and hematocrit, compared with their respective control groups. The animals of the TCG exhibited rest bradycardia compared to SCG and an increased in value of the spectral high frequency (HF) in HRV. However, the EPO has triggered an increase in SBP in the sedentary group compared with the SCG, which was not observed in DBP and mean BP (MBP). Also there were no differences in baroreflex sensitivity and VPAS among the groups, only in VPAD where the TEG showed lower value of the spectral component of low frequency (LF) compared to TCG. There was no difference between vagal and sympathetic effect between groups, on the other hand, the TCG showed less sympathetic tone than the SCG. Interestingly, the TEG had higher vagal tone compared with the TCG; the intrinsic rate of heart pacemakers (IRHP) are increased in SEG compared to the SCG; and sympathovagal index was reduced in the group receiving EPO compared to their respective controls. The TCG showed cardiac hypertrophy and SEG presented an increase in diameter of cardiomyocytes as compared to the SCG. Both groups receiving EPO had fibrosis on heart and kidney, compared with control groups. So, our results suggest that the chronic administration of EPO can provide cardiovascular autonomic changes in Wistar rats, like the increase in parasympathetic activity, in an attempt to reverse the increase in IRHP caused by the fibrosis. Our data also indicate that exercise training by swimming was ineffective in reversing the damage observed when using EPO.

**Keywords:** Erythropoietin. Exercise training. Cardiovascular autonomic modulation. Heart rate variability. Heart fibrosis.

## LISTA DE FIGURAS

### Figura

1-Complexo EPO/EpoR.....	24
2-Controle neural dos reflexos cardiovasculares.....	30
3-Desenho experimental.....	40
4-Protocolo da sensibilidade barorreflexa cardíaca.....	42
5-Protocolo do tônus autonômico cardíaco.....	43
6-Diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos.....	56
7-Espessura da parede dos ventrículos esquerdos.....	57
8-Fibrose cardíaca e renal.....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

### Gráfico

1-Massa corporal.....	47
2-Frequência cardíaca basal.....	48
3-Pressão arterial sistólica, diastólica e média.....	49
4-Sensibilidade barorreflexa cardíaca.....	52
5- Efeito simpático e efeito vagal.....	53
6-Tônus autonômico cardíaco e frequência intrínseca de marcapasso cardíaco.....	54
7-Índice simpato-vagal.....	55

## LISTA DE QUADROS

### Quadro

1-Protocolo do treinamento de natação.....	39
--	----

## LISTA DE TABELAS

### **Tabela**

1-Eritrograma.....	47
2-Variabilidade da frequência cardíaca.....	50
3-Variabilidade da pressão arterial sistólica.....	51
4-Variabilidade da pressão arterial diastólica.....	51
5-Sensibilidade barorreflexa cardíaca.....	51
6-Estimativa da hipertrofia cardíaca.....	55
7-Estudo histológico do tecido cardíaco .....	56
8-Fibrose cardíaca e renal.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR: autorregressivo  
ATRO: sulfato de atropina  
BHK: rim de filhote de hamster  
BPM: batimentos por minuto  
CEFORES: centro de educação profissional  
CEUA: Comitê de Ética de Pesquisa do Uso de Animais  
CFC-e: células formadoras de colônias de eritrócitos  
CHO: células ovárias de hamster chineses  
COI: comitê olímpico internacional  
ECG: eletrocardiograma  
EPM: erro padrão da média  
EPO: eritropoietina  
EpoR: receptor de eritropoietina  
FC: frequência cardíaca  
FEN: fenilefrina  
FFT: transformada rápida de *Fourier*  
FIMC: frequência intrínseca de marcapasso cardíaco  
GCS: grupo controle sedentário  
GCT: grupo controle treinado  
GES: grupo sedentário com administração de eritropoietina  
GET: grupo treinado com administração de eritropoietina  
HCM: hemoglobina corpuscular média  
HF: high frequency  
HIF-1: fator induzível por hipóxia-1  
IP: intervalo de pulso  
ISV: índice simpátovagal  
JAK2: Janus Kinase 2  
LF: low frequency  
MAPK: proteína-*kinase* ativada por mitógenos  
MS: milissegundos  
NF-k  $\beta$ : fator nuclear *kappa*  $\beta$   
NPS: nitroprussiato de sódio

PA: pressão arterial  
PAD: pressão arterial diastólica  
PAM: pressão arterial média  
PAS: pressão arterial sistólica  
PI3K: fosfatidilinositol-3-kinase  
pNN50: porcentagem dos intervalos RR adjacentes  
PROP: cloridrato de propranolol  
rHuEPO: eritropoietina recombinante humana  
rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RRs normais adjacentes  
SD1: dispersão dos pontos perpendiculares à linha de identidade  
SD2: dispersão dos pontos ao longo da linha de identidade  
SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR normais  
SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR normais  
SDNNi: média do desvio padrão dos intervalos RRs normais  
SNA: sistema nervoso autônomo  
SNC: sistema nervoso central  
SNP: sistema nervoso parassimpático  
SNS: sistema nervoso simpático  
Spi2A: *Serpin-Lisossoma-Catepsin*  
STAT5: sinal de transdução e transcrição 5  
TS: tônus simpático  
TV: tônus vagal  
UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
ULF: ultra low frequency  
USADA: agência americana antidoping  
VCM: volume corpuscular médio  
VE: ventrículo esquerdo  
VFC: variabilidade da frequência cardíaca  
VLF: very low frequency  
VPAS: variabilidade da pressão arterial sistólica  
VPAD: variabilidade da pressão arterial diastólica  
VO<sub>2máx</sub>: consumo máximo de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>21</b>
3.1 ERITROPOETINA .....	21
3.1.1 FORMA MOLECULAR E RECEPTORES .....	22
3.1.2 MECANISMO DE AÇÃO .....	23
3.1.3 FUNÇÕES.....	25
3.1.4 ERITROPOETINA RECOMBINANTE HUMANA .....	25
3.2 CONTROLE NEURAL CARDIOVASCULAR .....	29
3.3 SISTEMA CARDIOVASCULAR E EXERCÍCIO.....	32
3.4 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	34
<b>4 HIPÓTESES</b> .....	<b>38</b>
<b>5 MÉTODO</b> .....	<b>38</b>
5.1 AMOSTRA.....	38
5.2 TREINAMENTO FÍSICO.....	38
5.3 ERITROPOIETINA .....	40
5.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS .....	40
5.5 NÍVEIS BASAIS DE FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL .....	41
5.6 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	41
5.7 SENSIBILIDADE BARORREFLEXA CARDÍACA .....	42
5.8 TÔNUS AUTÔNOMICO CARDÍACO .....	43
5.9 ERITROGRAMA.....	44
5.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA CARDÍACA E RENAL.....	44
5.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA CARDÍACA E RENAL .....	45
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A eritropoietina (EPO) é um hormônio endógeno de natureza glicoproteica, sintetizado principalmente em células epiteliais específicas que revestem os capilares peritubulares renais (ADAMSON, 1996). Esse hormônio é o principal regulador da eritropoiese no homem e também em outros animais. Os rins apresentam função preponderante em sua síntese, secretam cerca de 90% de toda a EPO circulante, enquanto que o fígado contribui com aproximadamente 10% (EKBLÖM, 2002).

A produção de EPO ocorre quando estruturas celulares sensitivas renais percebem redução na taxa de oxigênio circulante ou deficiência na produção eritrocitária (ALBERTS, et al., 1994; RASSIER; NATALI; DE ROSE, 1995). As moléculas de EPO são produzidas e carregadas pela corrente sanguínea até a medula óssea, onde encontram células progenitoras eritrocitárias.

Qualquer fator ou distúrbio que afete a concentração de EPO circulante, seja na síntese ou liberação, irá acarretar desregulação na homeostase do sistema hematopoiético. A hemodiluição, os vários tipos de hipóxia, as diferentes formas de anemia e pacientes com determinadas doenças renais são causas conhecidas para o aumento da produção e concentração de EPO. De forma antagônica, a concentração de EPO é reduzida na policitemia (EKBLÖM, 2002).

No cérebro e no sistema nervoso central (SNC) a EPO promove neurogênese, ação antiapoptótica e proteção contra danos causados por hipóxia. Ela ativa a produção de enzimas antioxidativas, metaboliza radicais livres e afeta a liberação de alguns neurotransmissores (LOHMEYER et al., 2008). Nas células endoteliais, sua principal função é a angiogênese, e nos demais órgãos (rim, músculos, sistema reprodutivo masculino) é responsável pela sobrevivência e proliferação celular (FELDMAN; SYTKOWSKI, 2003).

Graças às técnicas de engenharia genética, permitiu-se o desenvolvimento de uma substância recombinante correlata (Eritropoietina Recombinante Humana – rHuEPO) em quantidades comercialmente viáveis e com elevado grau de pureza (RECORMON<sup>®</sup>, 2014).

Seu uso inicial na clínica foi como medicamento substituto para pacientes que necessitavam de sucessivas transfusões de sangue ou que apresentavam quadros de anemia por insuficiência renal crônica (EKBLÖM, 2002; CHOI; KIM; PARK, 1996;

RIVER; SAUGY, 2003). Recentemente, a rHuEPO vem sendo usada no tratamento de vários tipos de anemia, como a gerada nos estágios iniciais de neoplasias (RECORMON®, 2014), em pacientes HIV positivos, entre outras (CHOI; KIM; PARK, 1996).

Rezaee et al. (2012) verificaram distúrbios cardíacos após a intoxicação de monóxido de carbono em ratos e avaliaram o efeito da administração de EPO nesse caso. Os ratos foram expostos à concentrações de monóxidos de carbono e em diferentes doses de EPO no final de cada exposição. Concluiu-se através de eletrocardiograma (ECG), da frequência cardíaca (FC) e da carboxi-hemoglobina, que a EPO pode inibir alterações isquêmicas após o envenenamento por monóxido de carbono.

Já o estudo de Piloto et al. (2009) avaliou os efeitos cardiovasculares da rHuEPO em ratos submetidos à exercício aeróbico crônico. Após dez semanas de treinamento físico, concluíram-se modificações graves cardiovasculares e tromboembólicas, incluindo o risco de mortalidade, apontando então consequências deletérias do uso da rHuEPO.

Meziri et al. (2011) estudaram os efeitos cardiovasculares induzidos pela administração crônica de rHuEPO em ratos treinados em exercício de esteira e tratados com um inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME), visto que existe a hipótese de que o óxido nítrico pode proteger contra os efeitos nocivos cardiovasculares induzidas pela administração crônica de rHuEPO. Os ratos foram tratados ou não com rHuEPO e/ou L-NAME durante seis semanas e submetidos a exercícios de esteira. Os ratos L-NAME tiveram um aumento da pressão arterial (PA) e, quando tratado com rHuEPO, mostraram uma severa hipertensão arterial. Vários ratos do grupo L-NAME/rHuEPO/exercício morreram durante o exercício ou na recuperação. O estudo concluiu que o uso crônico de rHuEPO associado com o exercício físico eleva o risco de distúrbios cardiovasculares, principalmente em indivíduos que já possuem alguma patologia.

Um elegante estudo de Furlani et al. (2008) analisou a remodelação benéfica e a proteção do miocárdio com a administração de EPO. Após indução de infarto em roedores, a EPO foi injetada diretamente no coração e após um período de seis semanas, foram avaliados o tamanho do infarto, a angiogênese e os efeitos patológicos. Os resultados indicaram um melhor estado cardíaco com a administração direta de EPO, maior capacidade de exercício detectada pelo teste de

natação forçada, redução radical do tamanho absoluto do infarto, dilatação ventricular e hipertrofia. Em conclusão, o estudo apontou que um infarto do miocárdio seguido de uma injeção intramiocárdica de EPO é capaz de reduzir a inflamação, reforçar a angiogênese, melhorando as funções do miocárdio sem formação de trombo intramural.

Os mecanismos envolvidos na cardioproteção induzida pela EPO estão relacionados com efeitos antiapoptóticos e anti-inflamatórios, além dos angiogênicos. Estudos prévios (LEBEL, et al., 1997; PILOTO et al., 2009), sobretudo, evidenciaram que a administração crônica da EPO induziu alterações cardiovasculares, tais como hipertensão arterial e taquicardia. Até onde sabemos não foram encontradas informações referentes a alterações diretas da administração crônica de EPO sobre a modulação autonômica cardiovascular na função autonômica cardíaca, bem como os efeitos do treinamento físico sobre essas possíveis alterações em modelos animais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar os efeitos da administração crônica de rHuEPO e sua interação com o treinamento físico sobre a função autonômica cardiovascular em ratos *Wistar*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar em ratos *Wistar* os efeitos da administração crônica de rHuEPO e do treinamento físico sobre:

- Massa corpórea;
- Eritrograma (hemácias, hematócitos, hemoglobina);
- Parâmetros hemodinâmicos basais da FC e PA;
- Modulação autonômica cardiovascular por métodos lineares;
- Sensibilidade barorreflexa cardíaca;
- Tônus autonômico cardíaco;
- Hipertrofia cardíaca;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ERITROPOETINA

A EPO tem a capacidade de estimular a produção de glóbulos vermelhos e, conseqüentemente, aumentar o aporte de oxigênio para os tecidos, quando há uma redução na taxa de oxigênio circulante ou deficiência na produção eritrocitária. (ALBERTS et al., 1994; RASSIER; NATALI; ROSE, 1995). As moléculas de EPO em circulação são conduzidas até a medula óssea, onde encontram células progenitoras eritrocitárias. Constata-se que o aumento da taxa de novos eritrócitos ocorra cerca de um ou dois dias após o aumento dos níveis de EPO no plasma (OLIVEIRA, 2000). Este hormônio estimula a diferenciação e a proliferação dos eritrócitos ao interagir com receptores específicos de EPO existentes em diferentes tipos celulares (KATZUNG, 2005; RANG, et al., 2007), sendo acentuado de acordo com a disponibilidade de ferro e outros nutrientes (OZAWA et al., 2002).

O principal mecanismo do aumento dos hematócritos, por muito tempo se pensou, que fosse por aumentos na massa de glóbulos vermelhos, mas já foi demonstrado que a EPO também diminui o volume plasmático (LUNDBY et al., 2007). Essa redução foi confirmada em outros estudos (LUNDBY et al., 2008; OLSEN et al., 2010), ressaltando que a mudança no volume plasmático é precedida do aumento do volume dos glóbulos vermelhos. Um estudo preliminar sugeriu que os eritrócitos recém-formados podem sofrer apoptose quando a estimulação pela EPO é interrompida, assim o aumento da massa de glóbulos vermelhos pela EPO não dura os 120 dias esperados (CHANG et al., 2009).

Até então, a ação da EPO era exclusivamente nessas células progenitoras eritrocitárias, por isso, esse hormônio era usado no tratamento da anemia em pacientes com câncer, com doença renal crônica ou anemias por deficiência na produção de EPO. Contudo, já se sabe que a expressão gênica do RNA<sub>m</sub> para EPO e para o receptor de EPO (EpoR) também acontece em outros tecidos além dos rins e fígado, como neurônios, astrócitos, células do sistema imunológico, células de câncer, células endoteliais, estroma da medula óssea, células do coração, sistema reprodutivo, trato gastrointestinal, pâncreas e músculo esquelético, provando assim evidências para ações pleiotrópicas (SANCHIS-GOMAR et al., 2013).

### 3.1.1 FORMA MOLECULAR E RECEPTORES

A EPO humana é uma glicoproteína com peso molecular de cerca de 34.000 *daltons* (MAIESE; CHONG; SHANG, 2008; GUYTON; HALL, 2011), sintetizada a partir de um gene situado no braço longo do cromossomo sete (ZANICHELLI et al., 1995; PARDOS, et al., 1998) e com atividade hormonal de 70.000 UI/mg (BENTO; DAMASCENO; NETO, 2003).

Inicialmente é produzida como um pré-hormônio possuidor de uma sequência total de 193 aminoácidos, sendo os 27 primeiros expressos apenas para proporcionar a secreção do hormônio, não apresentando relevância na atividade biológica (RIVER; SAUGY, 2003). Pouco antes de ser secretada, a EPO é clivada e os 27 aminoácidos iniciais são removidos. É formada em sua maioria (40%) por carboidratos, onde o ácido siálico se destaca seguido de hexoses, N-acetilglucosaminas e N-acetilneuraminico, cujo papel é importante na biossíntese, atividade molecular *in vivo* e manutenção da estrutura terciária da proteína. As estruturas quaternárias são feitas por quatro  $\alpha$ -hélices ligadas umas às outras por pontes dissulfeto (GARCIA et al., 2007; LOHMEYER et al., 2008).

Ao entrar na circulação sanguínea, há também a perda do aminoácido arginina na posição carboxiterminal, passando o hormônio então a possuir uma sequência definitiva de 165 aminoácidos alinhados em uma única cadeia polipeptídica, contendo duas ligações dissulfetointramoleculares e quatro cadeias polissacarídicas independentes, ligadas à resíduos de aminoácidos específicos. As cadeias polissacarídicas constituem cerca de 40% da massa molecular da EPO, com grande importância na função hormonal (BENTO et al., 2003). Estima-se que a meia-vida da EPO, após lançamento na circulação sanguínea, seja da ordem de seis a oito horas (ADAMSON, 1996).

Uma hipóxia do tecido renal leva ao aumento dos níveis teciduais do fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1), que serve como fator de transcrição para um grande número de genes induzíveis por hipóxia, dentre eles o gene da EPO. O HIF-1 induz a transcrição do RNA<sub>m</sub> e sua tradução na EPO (BAHLMANN; FLISER, 2009; GUYTON; HALL, 2011).

Os efeitos biológicos da EPO em células hematopoiéticas são mediados pela ligação da mesma em EpoR localizados na superfície dessas células (CHIA; LEONE, 1995). Os EpoR's fazem parte da família de receptores ligados à citocinas

tipo I, nesse grupo estão incluídos os receptores celulares transmembranares para fatores como: fator estimulador de colônias de granulócitos, interleucinas, prolactina e hormônio do crescimento (HARDEE et al., 2006). A expressão de EpoR e sinalização em tecidos hematopoiéticos é essencial para a eritropoiese durante o desenvolvimento do indivíduo.

Devido ao curto intervalo de tempo entre o aumento da concentração de novos eritrócitos e o pico da EPO, conclui-se que ela atua em células precursoras próximas dos eritrócitos maturados, e não em células mais primitivas na gênese eritrocitária. Essas células são chamadas de células formadoras de colônias de eritrócitos (CFC-e) e possuem a peculiaridade de só responderem à EPO. Tais células possuem receptores específicos, pertencentes a uma grande família de receptores para fatores de crescimento hematopoiéticos, conseguindo responder a baixíssimas concentrações desse hormônio, da ordem de  $10^{-12}$  mol/L (ALBERTS, 1994).

O EpoR é um receptor transmembranar com 508 aminoácidos (NOGUCHI et al., 1991) incluindo um domínio *XSXWS motif* extracelular, um simples domínio hidrofóbico e um domínio citoplasmático variável (YOUSSOUFIAN et al., 1993). A forma ativa do EpoR sobre a superfície de células progenitoras eritrocitárias é um homodímero (CONSTANTINESCU; GHAFARI; LODISH, 1999).

### 3.1.2 MECANISMO DE AÇÃO

A ligação da EPO com seu receptor induz uma alteração conformacional, resultando na ativação da *Janus Kinase2* (JAK2) e da *tirosina-kinase* (REMY; WILSON; MICHNICK, 1999; WITTHÜHN, et al., 1993). Posteriormente, vários resíduos de tirosina do EpoR são fosforilados (TAÜCHI, et al., 1995; BARBER et al., 2001). Assim, várias vias de sinalização de transdução são canalizadas, incluindo fosfatidilinositol-3-*kinase* (PI3K/AKT), ativação de JAK2, sinal de transdução e transcrição 5 (STAT5), *proteína-kinase* ativada por mitógenos (MAPK), fator nuclear *kappa*  $\beta$  (NF- $\kappa$   $\beta$ ), proteína G, canais de cálcio (TILBROOK; KLINKEN, 1999) e outras vias da *proteína Kinase C* (KLINGMULLER, 1997; YOSHIMURA; MISAWA, 1998; CONSTANTINESCU, et al., 2001), dependendo do receptor e tipo de célula alvo.

A via de sinalização JAK 2-STAT 5, além de ser responsável pelos efeitos da EPO na eritropoiese (diferenciação, proliferação e sobrevivência de células), também medeia a proteção contra a morte celular programada, ou seja, a apoptose (BAHLMANN; FLISER, 2009).

Além disso, uma nova via desencadeada pela EPO tem sido recentemente descrita envolvendo a cascata de reações *Serpin-Lisossoma-Catepsin* (Spi2A) (BROXMEYER, 2013). Isto inicia a ativação da JAK2 e STAT5, assim como a MAPK e a NF- $\kappa$   $\beta$  (BROXMEYER, 2011; NAIRZ et al., 2011). EPO também pode sinalizar através de receptores heterodiméricos composto por uma cadeia de monômero EpoR e CD131 (BRINES; CERAMI, 2006; ZHANG et al., 2009). Em contrapartida, a ativação dessa via de ativação requer maiores concentrações de EPO quando comparados com EpoR homodímeros (HAND; BRINES, 2011). É desconhecido se um único tipo de célula consegue expressar ambos EpoR's e se isso pode ter algum efeito sobre as ações celulares e intracelulares induzida pela EPO.

Finalmente, a ação da EPO é rescindida por células fosfatases hematopoiéticas (HCP ou SHP1), em que o complexo EPO/EpoR é internalizado e degradado como descrito na figura 1.

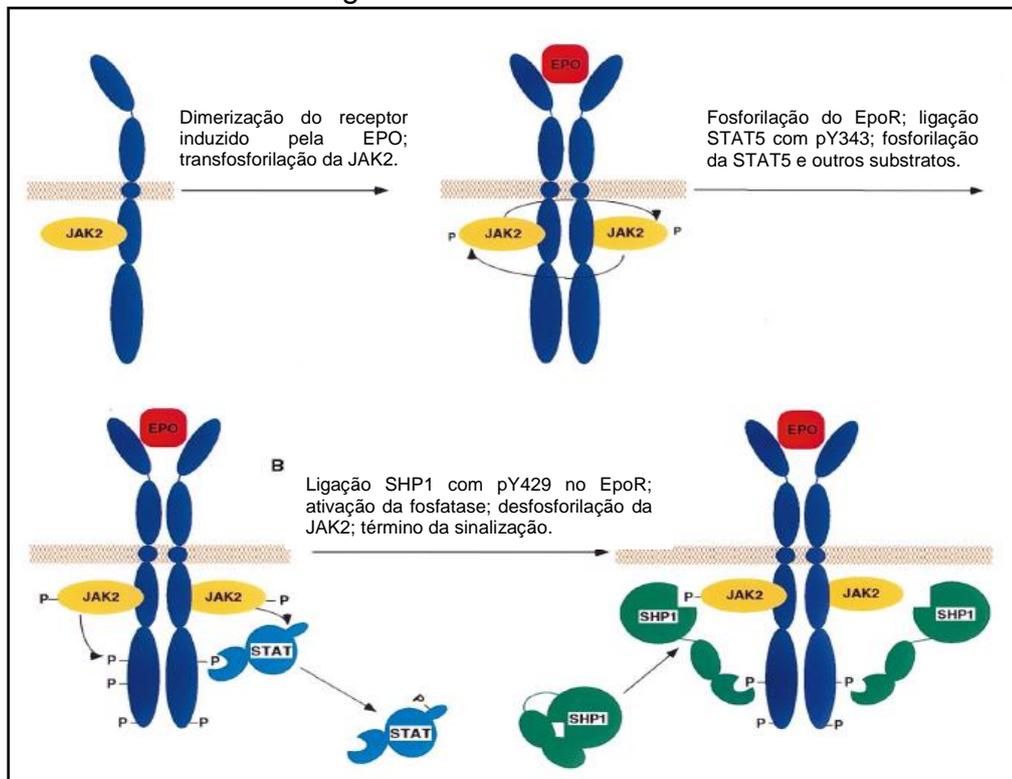


Figura 1 - Processo de internalização e degradação do complexo EPO/EpoR. (modificado de CONSTANTINESCU, 1999, modificado de KLINGMÜLLER, 1995).

### 3.1.3 FUNÇÕES

Esse hormônio glicoproteico atua sobre a eritropoiese de modo complexo, através da estimulação na proliferação de células indiferenciadas medulares, produzindo maior número de mitoses dessas células; da estimulação do amadurecimento das células indiferenciadas de onde surgem os primeiros eritroblastos, (denominados proeritroblastos e os eritroblastos basófilos); da estimulação na síntese de hemoglobina; e do aumento na taxa de reticulócitos no sangue (LORENZI, 2003).

O principal efeito da EPO é a redução da apoptose fisiológica associada com a transformação da célula em progenitores eritróides. Em conjunto com outros fatores de crescimento, a EPO estimula a proliferação, sobrevivência e diferenciação dessas células (WESTENBRINK et al., 2007; HARDEE et al., 2006; EHRENREICH et al., 2004; BAHLMANN; FLISER, 2009).

Segundo Albuquerque (2009), encontra-se EPO e seus receptores em diferentes regiões do SNC: córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, hipófise e medula espinhal, assim propõe-se uma ação neuroprotetora, decorrente da redução da toxicidade do glutamato, aumento da produção de fatores antiapoptóticos, redução das lesões causadas por NO, efeitos anti-inflamatórios e propriedades antioxidantes. Além disso, a EPO no tecido vascular e cardíaco tem sido apontada como um hormônio protetor, designadamente por ação antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica.

No sistema reprodutivo feminino, a expressão de EPO é dependente de estrógeno, estando envolvida na angiogênese e em mudanças cíclicas celulares (FELDMAN; SYTKOWSKI, 2003). O hormônio glicoproteico em questão também atua na formação indireta de megacariócitos, progenitores monocíticos e granulocíticos (RASSIER; NATALI; DE ROSE, 1995).

### 3.1.4 ERITROPOETINA RECOMBINANTE HUMANA

Segundo Romão Júnior et al. (1992), em 1977, a produção genética da EPO se deu pela preparação altamente purificada da proteína, alcançada através do isolamento do hormônio a partir de urina de pacientes com anemia aplástica. Pouco depois, foi reportado o isolamento do gene da EPO humana. Em 1985, o gene dessa

proteína foi clonado e a sequência de aminoácidos foi identificada (GARCIA, et al., 2007), tornando possível a elaboração da rHuEPO. A expressão de clones de DNA 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; PARK, 1996). A rHuEPO tornou-se o primeiro biomedicamento produzido a partir de células heterólogas de mamífero (RENDIC, 1997).

A rHuEPO possui a mesma sequência de aminoácidos, porém a glicosilação pode ocorrer em diferentes partes da molécula, formando cinco tipos diferentes de rHuEPO no mercado: epoetina-  $\alpha$ , epoetina-  $\beta$ , epoetina-  $\omega$ , epoetina-  $\delta$  e darbepoetina-  $\alpha$ . Essa classificação também é dependente do método de fabricação, por exemplo, as epoetinas  $\alpha$  e  $\beta$  são sintetizadas a partir de células CHO enquanto a  $\omega$  é produzida em células BHK. Dependendo das considerações farmacocinéticas e práticas do paciente, pode-se alterar as formas de administração de rHuEPO, mas na prática clínica, as formas mais comuns são as vias intravenosa, subcutânea e intraperitoneal.

A dosagem usual de rHuEPO no tratamento da anemia varia geralmente entre 20 a 240 U.I./kg, três vezes por semana, dependendo da resposta do paciente e da taxa ótima pretendida de concentração plasmática de hemoglobina e hematócrito (RIVER; SAUGY, 2003).

A darbepoetina-  $\alpha$  é a que apresenta maior tempo de meia-vida (mais de 49 horas) e potência, pois carrega dois sítios adicionais de glicosilação. O uso terapêutico desse análogo demonstrou proteção contra isquemia e aos danos causados pelos radicais livres. Além disso, protege os cardiomiócitos contra danos causados por agentes citotóxicos (JOYEUX-FAURE, 2007). Os efeitos colaterais apresentados foram trombose e hipertensão.

As epoetinas  $\alpha$  e  $\beta$  se diferem na quantidade de carboidratos, tendo uma meia-vida de oito horas. A epoetina- $\beta$  tem um atraso na absorção quando comparado com a epoetina- $\alpha$ , ambas administradas de forma subcutânea, porém 48 horas após, os valores de concentração de  $\beta$  superam os de  $\alpha$  (HELSTENSON, et al., 1991). Esses dois análogos são utilizados no tratamento da anemia em pacientes com câncer, porém o uso da epoetina-  $\beta$  é restrito para pacientes com tumores sólidos em tratamento com quimioterapia contendo *platinum* (ENGERT, 2005).

Inicialmente, o uso da rHuEPO se restringia à pacientes que fossem realizar transfusão de sangue sucessivas ou que apresentavam anemia por doença renal crônica. Ultimamente, ampliou-se o uso da rHuEPO à pacientes com outros tipos de anemias, em pacientes HIV positivos, tumores e outros (ALBUQUERQUE, 2009).

Segundo mesmo autor, além da ação nas células eritrocitárias do sangue, a rHuEPO age também no músculo estriado esquelético e cardíaco, além de estimular a angiogênese. No tratamento da distrofia muscular, a rHuEPO atua sobre as células satélites do músculo esquelético, mostrando uma potencialidade no tratamento dessa disfunção. O atleta de alto rendimento tem dois principais benefícios: melhoria nas condições hemodinâmicas locais da musculatura esquelética e uma recuperação histológica mais rápida após esforços repetidos, confirmando assim uma melhora do trabalho.

A rHuEPO pode influenciar a função de várias proteínas membranares, aumentando, por exemplo, o influxo de lactato nos eritrócitos de atletas que fazem uso da rHuEPO, diminuindo então o acúmulo desse metabólito. Esse efeito potencializa o trabalho, elevando o limiar de lactato desses atletas (ALBUQUERQUE, 2009).

Basicamente, o uso de rHuEPO em atletas de alto rendimento tem como finalidade aumentar a potência aeróbica máxima (KANSTRUP; EKBLUM, 1984; ROBERTSON, et al., 1984; THOMPSON et al., 1982) e o rendimento submáximo durante o exercício (WILLIAMS, et al., 1981), por aumentar a capacidade de transporte de oxigênio até a célula muscular, pois existe uma relação direta entre a quantidade total de hemoglobina e o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ).

No esporte, a rHuEPO passou a ser utilizada pelo efetivo ganho no desempenho, além da sua difícil detecção na matriz biológica através dos métodos analíticos convencionais, por ser uma macromolécula complexa, presente em concentrações baixas nos fluidos biológicos e com estrutura bastante semelhante à da sua forma endógena (PARDOS, et al., 1998; BENTO; DAMASCENO; NETO, 2003).

Vários atletas foram testados durante suas fases de treinamento e não tiveram resultado positivo para o uso da rHuEPO, porém durante as Olimpíadas de Inverno de 2002 em *Salt Lake City* (Utha) obtiveram-se resultados positivos para nandrolona, mentafetaminas e darbepoetina. Em 1998, ciclistas de várias equipes participantes do "*Tour de France*" foram desclassificados por utilização da EPO e

outros produtos inclusos no código antidopagem, sendo, portanto um marco em relação aos casos esportivos de dopagem por rHuEPO. Neste mesmo ano, vários atletas faleceram por uso deste produto, e inúmeros com sintomas de fortes dores de cabeça, náuseas, vômitos e fotofobia, os quais admitiram a utilização do hormônio (CRUZ, 2006).

Segundo o mesmo autor, essa modalidade ergogênica só ficou em evidência nos Jogos Olímpicos de 1968, devido aos vários recordes que foram “quebrados”, principalmente no atletismo, já que os jogos aconteceram na Cidade do México, que tem uma altitude de 2.300 metros. Em 1988, também evidenciou o uso da rHuEPO nos Jogos Olímpicos de Inverno de *Calgary* e Jogos Olímpicos de Seul.

Apesar de tudo, o uso de rHuEPO ainda era defendido por alguns grupos, sob o argumento da impossibilidade da detecção do uso. Entretanto, em 1990, o Comitê Olímpico Internacional (COI) incluiu esse análogo do hormônio na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

O caso mais conhecido de *doping* por rHuEPO é do ex-ciclista Lance Armstrong, o qual se tornou ídolo mundial após ter se recuperado de um câncer e vencido o *Tour de France*, principal competição do ciclismo, por sete vezes consecutivas (1999 até 2005), quando se aposentou. Voltou a competir em 2009, mas novamente sofreu acusações de *doping*. Em 2012, foi banido do esporte pela Agência Americana Antidoping (USADA), que comprovou uso de substâncias ilícitas pelo atleta enquanto competia, perdendo todos os troféus do *Tour de France* e todos os títulos conquistados ao longo da carreira (ROAN, 2015).

Quanto aos riscos associados ao uso da rHuEPO, a maioria está relacionada com um aumento da viscosidade sanguínea, consequente à elevação do hematócrito, podendo reduzir o débito cardíaco, velocidade do fluxo sanguíneo e o suprimento periférico de oxigênio. Dessa forma, há uma redução da capacidade aeróbica e do desempenho de *endurance* (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2011). Além disso, pode gerar uma hipertensão arterial, trombose da fístula arteriovenosa, hiperpotassemia e uma síndrome pseudogripal (PARDOS, et al., 1998; PAIXÃO; SCHOR, 1997).

### 3.2 CONTROLE NEURAL CARDIOVASCULAR

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase em condições normais e patológicas (KENNEY; MUNCE, 2003). O tônus simpático (TS), particularmente para o sistema cardiovascular, é gerado por descargas simpáticas que se originam em áreas específicas do tronco cerebral. Alguns grupos de neurônios localizados nesta região do SNC, chamado neurônios simpáticos pré-motores, enviam projeções diretas para os neurônios simpáticos pré-ganglionares da parte intermédio-lateral da coluna vertebral. Os centros medulares responsáveis pela manutenção e controle desse tônus cardiovascular, geralmente funcionam através de mecanismos cardiovasculares reflexos, como barorreflexo, quimiorreflexo, e reflexo cardiopulmonar (DAMPNEY, 1994).

As terminações das fibras aferentes dos reflexos cardiovasculares estão localizadas no núcleo do trato solitário (DAMPNEY, 1994). Neurônios gabaérgicos do bulbo parte caudal são inibidos e conseqüentemente inibem os neurônios na parte rostral que determinam o TS, contribuindo assim para a manutenção da PA e FC no repouso (GUERTZENSTEIN, 1972, GUERTZENSTEIN; SILVER, 1974) além de mediar às alterações em situações de aumento da PA (GRANATA, et al., 1983).

Em outras duas áreas medulares, o núcleo ambíguo e o núcleo motor dorsal do nervo vago, estão localizados os neurônios parassimpáticos pré-ganglionares (MCALLEN; SPYER, 1976), que mediam o componente parassimpático dos reflexos cardíacos (TAYLOR; JORDAN; COOTE, 1999). Esse mecanismo central de controle reflexo do coração e circulação está descrito na figura 2.

Os mecanorreceptores, por exemplo, os barorreceptores, são constituídos por terminações nervosas livres na adventícia de grandes vasos (aorta e carótida) e que são estimulados por deformações nesses vasos, normalmente ondas de pressão pelas características mecano-elásticas das paredes dos vasos (KRIEGER, 2001).

Quando há um aumento da PA, há uma deformação nas paredes desses vasos e uma ativação desses mecanorreceptores, que aumentam a frequência de disparo de potenciais de ação até o SNC na área específica do controle parassimpático que, por vias eferentes vagais aumentam a atividade vagal no coração, diminuindo a FC. Concomitantemente, há uma diminuição do TS para o

coração e vasos, reduzindo a contratilidade do miocárdio e a resistência vascular periférica, levando a uma redução da PA.

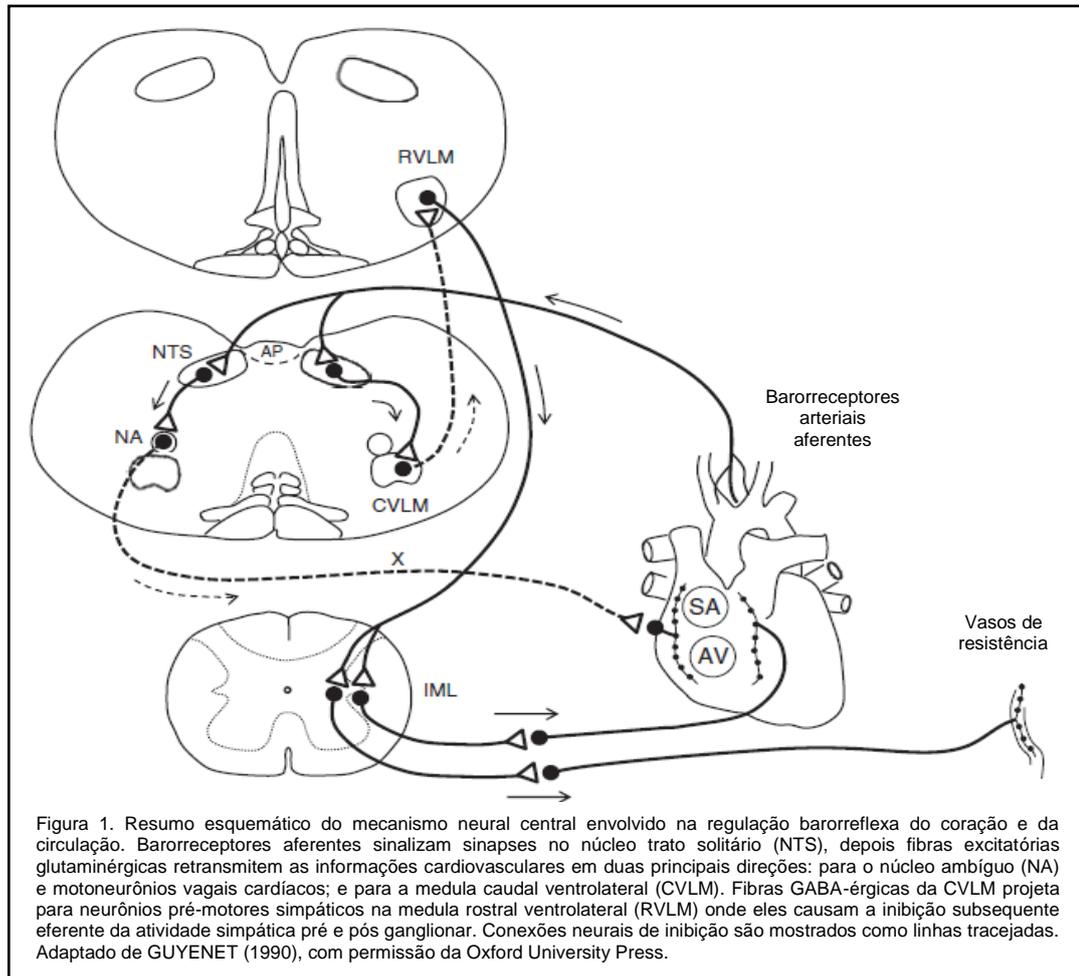


Figura 2 - Desenho esquemático do controle neural dos reflexos cardiovasculares. (modificado de CHARKOUDIAN, N., WALLIN, B.G., 2014).

Uma característica importante dos mecanorreceptores é a adaptação, na qual as alterações sustentadas para mais ou para menos na PA alteram a faixa de funcionamento dos barorreceptores. Essas disfunções da atividade reflexa têm sido demonstradas em várias doenças cardiovasculares e na hipertensão clínica e experimental (MANCIA, GRASSI, FERRARI, 1997). Nesse sentido, é provável que uma menor sensibilidade do barorreflexo em pacientes hipertensos seja determinante na variação da PA que eles apresentam de forma indireta, associada a consequentes lesões em órgãos-alvo. Além disso, essa adaptação dos barorreceptores pode ser responsável pelo aumento da atividade simpática e perpetuação da hipertensão. (IRIGOYEN, KRIEGER, 1998; FLORAS, et al., 1988 e SHEPERD, 1990).

Em contrapartida, o treinamento físico aeróbico e resistido já mostrou ser eficiente no aumento da sensibilidade em animais diabéticos (SILVA, et al., 2012), melhorando TS e tônus vagal (TV), assim como a variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Brum et al. (2000) também verificaram aumentos na função da sensibilidade dos barorreceptores aórticos em ratos normotensos e hipertensos com o treinamento físico dinâmico. Essas alterações do sistema barorreflexo induzidas pelo treinamento físico podem ser associadas às mudanças nos barorreceptores do SNC e em fibras eferentes (MOSTARDA, et al., 2014), além de uma possível explicação pelo aumento da conformidade aórtica, no qual a mesma pressão de pulso pode resultar num aumento na ativação de barorreceptores (BRUM, et al., 2000).

Para promover as respostas cardiovasculares adequadas de acordo com a demanda e necessidade do organismo, o coração é suprido tanto por nervos simpáticos quanto parassimpáticos, estes se distribuem, principalmente, no nodo sinoatrial e atrioventricular e pequena parte inervando músculos atriais e ventriculares.

Quando há uma estimulação parassimpática, ou vagal, há liberação de acetilcolina, causando uma hiperpolarização, o que diminui o potencial das membranas de “repouso” das fibras do nodo sinoatrial e aumentando o tempo do limiar de excitação, evidentemente, isso torna bem mais lenta a frequência da ritmicidade dessas fibras, logo, diminui-se a FC. Além disso, há uma diminuição na excitabilidade das fibras juncionais atrioventriculares retardando assim o impulso cardíaco para os ventrículos, sendo, portanto um efeito supressor sobre a contratilidade cardíaca (GUYTON; HALL, 2002).

Já na estimulação simpática do coração libera-se epinefrina e norepinefrina o que, no nodo sinoatrial, deixa o potencial de membrana mais positivo e atinge-se o limiar de autoexcitação mais rapidamente e no nodo atrioventricular torna-se mais fácil o potencial excitar a fibra subsequente, diminuindo assim a condução do sinal para os ventrículos. Ou seja, uma estimulação simpática no coração faz com que aumente a frequência de disparos do nodo sinoatrial, a velocidade de condução e o nível de excitabilidade em todas as partes do coração. Além disso, aumenta a permeabilidade das membranas das fibras ao sódio e cálcio, o que explica o aumento da força de contração de toda a musculatura cardíaca (GUYTON; HALL, 2002).

### 3.3 SISTEMA CARDIOVASCULAR E EXERCÍCIO

O sistema cardiovascular integra o corpo como uma unidade, e proporciona aos músculos ativos uma corrente contínua de nutrientes e oxigênio, a fim de manter um alto nível de transferência de energia. A circulação remove também os coprodutos do metabolismo local (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

Esse referido sistema consiste em uma conexão ininterrupta de uma bomba, um circuito de distribuição de alta pressão, canais de permuta e um circuito de coleta e de retorno de baixa pressão, que seriam seus principais componentes, respectivamente, o coração, o sistema arterial, os capilares e o sistema venoso (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

A ação da bomba cardíaca é influenciada por basicamente quatro determinantes principais: a pré-carga, o estado inotrópico ou contratilidade, a pós-carga e a FC (GUYTON; HALL, 2002; AIRES, 1999; BERNE; LEVY, 2002; DI DIO, 2002).

A pré-carga é o grau de tensão quando o miocárdio começa a contrair-se, e a pressão diastólica final quando o ventrículo já está cheio (GUYTON; HALL, 2002), o qual serve como um índice do grau de estiramento inicial da fibra miocárdica. Esse estiramento depende de fatores que aumentam ou diminuem o volume de retorno venoso e a pressão de enchimento diastólico, de um lado, e, de outro, da capacidade de distensão da parede ventricular em aceitar esse volume (GOMES, 2005).

Inotropismo refere-se à força de contração do músculo cardíaco. Pode-se apresentar como positivo ou negativo, dependendo se a força de contração miocárdica irá aumentar ou diminuir, respectivamente (GOMES, 2005).

A pós-carga é a resistência contra a qual os músculos ventriculares direito e esquerdo exercem força contrátil. Para o ventrículo esquerdo (VE) os principais fatores são a impedância aórtica, a resistência vascular periférica, a massa e viscosidade do sangue. Já para o ventrículo direito os fatores correspondentes são a impedância pulmonar e a resistência vascular pulmonar (NASSER; RUDHMER; SAUNDERS, 1970).

Por fim, a bomba cardíaca é influenciada pela FC que é o número de batimentos cardíacos por unidade de tempo, geralmente expresso em batimentos por minutos (bpm).

Durante exercício dinâmico, envolvendo contrações rítmicas de grandes grupos musculares (tais como corrida, natação ou ciclismo), a resposta cardiovascular ao exercício é iniciada por centros de comando mais elevados do cérebro, chamados de comando central. Com a continuidade do exercício, tanto os sinais mecânicos como os metabólicos do músculo esquelético ativo fornecem *feedbacks* centros cardiovasculares do cérebro para uma combinação precisa entre a liberação de oxigênio sistêmico e a demanda metabólica. A resistência vascular diminui para facilitar aumentos da perfusão muscular e o débito cardíaco aumenta proporcionalmente à captação de oxigênio, o que permite a manutenção e até mesmo o aumento da PA média (PAM) (THOMPSON, 2004).

Basicamente, o comando central inicia a resposta vasoconstritora do exercício, que é mantida e aumentada a partir de barorreceptores cardiorrespiratórios e arteriais, bem como por estimulação de receptores músculo esqueléticos mecânica e metabolicamente sensíveis. Depois da integração no cérebro, a resposta eferente via sistema nervoso parassimpático (SNP) (vagal) e simpático (SNS) resultam em aumento da FC, vasoconstrição do músculo esquelético inativo e vasodilatação dos leitos musculares ativos mediados pela liberação de substâncias vasodilatadoras locais (THOMPSON, 2004). Existe a necessidade de um aumento do débito cardíaco que envolve também as propriedades intrínsecas do coração, como o mecanismo de *Frank Starling* (o aumento do volume diastólico final acarreta um alongamento das fibras cardíacas, aumentando a força de contração e a quantidade de sangue bombeado por batimento). Os efeitos exatos da atividade do SNA durante o exercício dependerá do tipo de exercício e ainda de outros fatores (PINGE, 2011).

Segundo o mesmo autor, as respostas cardiovasculares ao exercício dinâmico são muito diferentes do exercício estático (contrações musculares prolongadas de alta intensidade que limitam o fluxo sanguíneo, como o levantamento de peso ou exercícios isométricos) é associado a aumentos menores na captação de oxigênio, no débito cardíaco e no volume-contracção do que o exercício dinâmico, tendo um maior aumento na PA.

Em níveis baixos de exercício, a FC aumenta quase que exclusivamente pela abstinência vagal, com poucos sinais de aumentos sistemáticos na atividade do SNS, enquanto a intensidade do exercício não alcance ou ultrapasse o estado de equilíbrio máximo (RAY, et al., 1993; SAITO, et al., 1993). Em contraste com a

atividade do SNS na regulação da resistência vascular sistêmica, que é adaptada de acordo com o *feedback* de metaborreceptores musculares (ROWEL, 1996), mostrando o papel essencial do comando central no aumento da FC durante o exercício.

O exercício físico realizado regularmente provoca importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas que influenciam o sistema cardiovascular (RONDON; BRUM, 2003), com o objetivo de manter a homeostasia celular em resposta ao incremento das necessidades metabólicas. Como exemplo dessas adaptações temos a bradicardia relativa de repouso, a hipertrofia muscular, a hipertrofia ventricular esquerda excêntrica e o aumento do  $VO_{2máx}$  (ARAÚJO, 2001). O exercício também é capaz de promover a angiogênese, aumentando o fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos e para o músculo cardíaco (SILVERTHORN, 2003; IRIGOYEN, et al., 2003).

#### 3.4 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para manutenção da homeostase, o SNA promove ajustes e, como consequência, o coração humano varia a sua frequência de funcionamento batimento-a-batimento. Apesar de este órgão ter sua autonomia, sua inervação intrínseca, ser capaz de controlar o seu próprio ritmo, promover condução intracardíaca dos estímulos e ter contratilidade, tem também todas essas funções amplamente moduladas pelo SNA. Assim, o coração participa ativamente do processo de homeostase orgânica sob tutela do SNA, adequando as funções desse sistema às necessidades metabólicas e teciduais (ROQUE, 2009).

A excitação cardíaca inicia-se com um impulso gerado no nodo sinoatrial, o qual é distribuído pelos átrios, resultando na despolarização atrial, que é representada no ECG pela onda P. Este impulso é conduzido aos ventrículos por meio do nodo atrioventricular e distribuído pelas fibras de *Purkinje*, resultando na despolarização dos ventrículos, a qual no ECG é representada pelas ondas Q, R e S, formando o complexo QRS. A repolarização ventricular é representada pela onda T (JAMES; CHOISY; HANCOX, 2007).

Segundo Donald Moss e Fred Shaffer (2009), VFC representa as mudanças no intervalo ou distância entre um batimento do coração e o batimento subsequente. O intervalo entre batimentos é o tempo entre uma onda R e a próxima onda R do

ECG, em milissegundos (ms). Além disso, afirma ser altamente variável esse intervalo entre ondas dentro de um determinado período de tempo, de forma normal e esperada, indicando a habilidade do coração em responder a múltiplos estímulos fisiológicos e ambientais (respiração, exercício físico, estresse, alterações metabólicas, sono, ortatismo, bem como compensar desordens patológicas) (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003; RAJENDRA, et al., 2006; SANTOS, et al., 2003; CATAI, et al., 2002; CARUANA-MONTALDO; GLEESON; ZWILLICH, 2000).

Os sinais da VFC são obtidos a partir dos intervalos RR registrados no ECG, ou intervalos de pulso obtidos pela pressão pulsátil com os quais são construídos os sinais de tacograma. Considerando-se que as variações da FC são mediadas pelo SNA, a quantificação destas variações reflete o efeito da modulação autonômica sobre a atividade cronotrópica do coração (KLEIGER et al., 1995; MALIK; BIGGER; CAMM, 1996). Esses sinais podem ser captados por instrumentos como eletrocardiógrafos, conversores analógicos digitais e os cardiofrequencímetros, a partir de sensores externos colocados em pontos específicos do corpo (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003; RAJENDRA, et al., 2006).

Mudanças nos padrões da VFC fornecem um indicador sensível e antecipado de comprometimentos na saúde. Alta VFC é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável com mecanismos autonômicos eficientes. Inversamente, baixa VFC é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, o que pode indicar a presença de mau funcionamento fisiológico no indivíduo, necessitando de investigações adicionais de modo a encontrar um diagnóstico específico (PUMPRLA et al., 2002).

O desequilíbrio do SNA, caracterizado pela redução da atividade vagal e predominante ativação simpática tem sido associado ao aumento da mortalidade cardiovascular, incluindo morte súbita cardíaca (TASK FORCE, 1996).

Para análise da VFC utilizam-se métodos lineares (domínio do tempo e da frequência) e métodos não lineares (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003). Métodos lineares no domínio do tempo são obtidos por índices estatísticos e geométricos efetuados na medida de cada batimento cardíaco (intervalo RR) normal (exclui-se os artefatos), durante um determinado tempo (expresso em ms). Assim, calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (TASK FORCE, 1996; RASSI JUNIOR, 2000). Esses índices são: SDNN (desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um determinado tempo, expresso em ms);

SDANN (desvio padrão das médias dos intervalos RR normais, a cada 5 minutos, em um intervalo de tempo, expresso em ms); SDNNi (média do desvio padrão dos intervalos RRs normais a cada 5 minutos expresso em ms); rMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RRs normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms); pNN50 (porcentagem dos intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50ms) (TASK FORCE, 1996).

Representativamente, os índices SDNN, SDANN e SDNNi estão ligados às atividades simpáticas e parassimpáticas, porém não permite distingui-las. Já os índices rMSSD e pNN50 representam atividade parassimpática, pois são encontradas a partir de análises de intervalos RR adjacentes (VANDERLEI, 2009).

Já o método linear no domínio da frequência está relacionado com análise da densidade espectral, que estuda como a variância se distribui em função da frequência, ou seja, a análise espectral decompõe a variabilidade total da FC nos seus componentes causadores, apresentando-se segundo a frequência com que altera a FC (REIS et al., 1998). Para esse cálculo, geralmente utilizam-se métodos paramétricos e não paramétricos que permitem a leitura dos mesmos resultados, mas apresentam vantagens próprias. Essa leitura gera um sinal de tacograma, ou seja, um gráfico que expressa a variação dos intervalos RR em função do tempo e é um sinal processado por algoritmos matemáticos, como a transformada rápida de *Fourier* ou modelos autorregressivos (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003).

Independente dos métodos supracitados delimitam-se três faixas de frequências distintas, chamadas de componentes espectrais: baixa frequência (LF – *low frequency*– variação de 0,04 e 0,15 Hz, decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância simpática); alta frequência (HF – *high frequency* – variação de 0,15 a 0,4 Hz, corresponde à modulação respiratória e é um indicador da ação vagal sobre o coração); muita baixa frequência (VLF – *very low frequency*) e ultrabaixa frequência (ULF – *ultra lowfrequency*) índices menos utilizados pela explicação fisiológica não estar bem estabelecida e parece estar relacionada ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, à termorregulação e ao tônus vasomotor periférico. A relação LF/HF reflete as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpatovagal sobre o coração. (GODOY; TAKAKURA; CORREA, 2005; NOVAIS, et al., 2004; ROBERTS, 2009).

A VFC no domínio do tempo também pode ser mensurada pela plotagem de *Poincaré*, o qual é um método não linear de análise da VFC baseado no registro das durações de uma série de batimentos cardíacos sucessivos, medidos pelos intervalos R-R (CAMBRI et al., 2008). Cada intervalo RR é correlacionado com o intervalo que antecede, definindo um ponto no plot. A análise pode ser feita de forma qualitativa (visual) por meio da figura formada ou quantitativa de ajuste da elipse da figura formada, tendo três índices: SD1 (dispersão dos pontos perpendiculares à linha de identidade e parece ser um índice de registro instantâneo da variabilidade batimento-a-batimento); SD2 (dispersão dos pontos ao longo da linha de identidade e representa a VFC em registros de longa duração); e SD1/SD2 (razão entre as variações curta e longa dos intervalos RR) (RAJENDRA, 2006; GAMELIN; BERTHOIN; BOSQUET, 2006).

A teoria do Caos é outro método não linear que descreve elementos manifestando comportamentos que são extremamente sensíveis às condições iniciais, dificilmente se repetem, mas apesar de tudo são determinísticos. Tem sido progressivamente aplicadas para interpretar, explicar e prever o comportamento os fenômenos biológicos. Esses parâmetros têm se mostrado bons preditores de morbimortalidade no âmbito clínico, apesar da necessidade de aprofundamento científico, com amostras expressivas e acompanhamento prolongado (GODOY; TAKAKURA; CORREA, 2005).

Além desses, podemos citar outros métodos não lineares utilizados para análise da VFC: análise de flutuações depuradas de tendências, função de correlação, expoente de *Hurst*, dimensão fractal e o expoente de *Lyapunov* (RAJENDRA, et al., 2006; GODOY; TAKAKURA; CORREA, 2005; LOGIER; JONCKHEERE; DASSONNEVILLE, 2004).

Apesar de a VFC ter o uso limitado por ser influenciada por fatores como idade, sexo, respiração, capacidade funcional, posição corporal e algumas patologias cardiovasculares, além de batimentos ectópicos e artefatos, como presença de transplante, arritmias e marcapassos (THURASINGHAM, 2006), esse método tem sido utilizado para compressão de diversas condições patológicas e um forte indicador de riscos relacionados a eventos adversos, refletindo o papel do SNA na manutenção da saúde (PUMPRLA et al., 2002).

## 4 HIPÓTESES

A administração crônica da rHuEPO em modelos animais desencadeia uma disfunção autonômica cardiovascular e o treinamento físico de natação consegue reestabelecer essas alterações.

## 5 MÉTODO

### 5.1 AMOSTRA

Foram utilizados 36 ratos da linhagem *Wistar*, adultos (12 semanas), provenientes do laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Os animais foram pareados pela idade e peso e foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos de acordo com o tratamento recebido: controle sedentário (GCS, n=10), controle treinado (GCT, n=08), sedentário com administração de EPO (GES n=10) e grupo treinado e com administração de EPO (GET, n=08). Foi realizada a pesagem dos animais no início, durante e após todos os procedimentos experimentais.

As condições ambientais do biotério foram mantidas durante todo o processo experimental, seguindo padronização do Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da UFTM. No que se refere à temperatura (18-22°C), controle de ventilação (10-15 trocas/hora), nível de ruído (0,1 a 65 dB), umidade relativa (45-55%) e luminosidade, reproduzindo-se o ciclo claro e escuro a cada 12 horas (CARPENTER, 2010; PAIVA et al., 2005). Os animais foram alimentados com ração e água “*ad libitum*”. O projeto foi aprovado pela CEUA/UFTM, sob protocolo 335 em 2015.

### 5.2 TREINAMENTO FÍSICO

Previamente ao protocolo de treinamento físico foi realizado um processo de adaptação ao meio líquido que consistiu em colocar os animais dos grupos treinados na água por um período de duas semanas, cinco dias por semana, por 30 minutos, com a finalidade de reduzir o possível estresse dos animais à realização do exercício físico nesse meio (GOBATTO et al., 2001).

O protocolo de natação foi realizado em um tanque com medidas de 100cmx50cmx60cm com a água aquecida em  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a uma profundidade de 40 cm, evitando assim que os animais encostem a cauda no fundo do mesmo. O treinamento físico iniciava-se às 13h00 e esse horário permaneceu durante todo o protocolo.

Os animais dos GCT e GET realizaram o treinamento de natação numa frequência de cinco vezes na semana com duração de oito semanas consecutivas. A duração e a intensidade da sessão de treino foram gradualmente aumentadas até os animais atingirem 60 minutos e com uma intensidade relativa de 5% da massa corporal, respectivamente. Posteriormente, essas variáveis foram mantidas constantes (adaptado de MEDEIROS et al., 2004), como mostra o quadro 1. Para o ajuste da intensidade relativa, os animais foram pesados no primeiro dia de cada semana.

Quadro 1 - Protocolo do treinamento de natação.

	Semanas							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Segunda-feira</b>	10 min	60 min 1%	60 min 2%	60 min 3%	60 min 4%	60 min 5%	60 min 5%	60 min 5%
<b>Terça-feira</b>	20 min	60 min 1%	60 min 2%	60 min 3%	60 min 4%	60 min 5%	60 min 5%	60 min 5%
<b>Quarta-feira</b>	30 min	60 min 1%	60 min 2%	60 min 3%	60 min 4%	60 min 5%	60 min 5%	60 min 5%
<b>Quinta-feira</b>	40 min	60 min 1%	60 min 2%	60 min 3%	60 min 4%	60 min 5%	60 min 5%	60 min 5%
<b>Sexta-feira</b>	50 min	60 min 1%	60 min 2%	60 min 3%	60 min 4%	60 min 5%	60 min 5%	60 min 5%

Fonte: adaptado de MEDEIROS et al. (2004). Nota: min: minutos; %: percentual de sobrecarga relativo à massa corporal.

Os animais dos GCS e GES foram colocados no tanque com água por 10 minutos em dois dias da semana durante as oito semanas para minimizar o estresse aquático associado ao protocolo de natação que os animais do GCT e GET sofreram. O protocolo de natação utilizado em nosso estudo está previamente caracterizado como um treinamento de moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo em aumentar a capacidade oxidativa muscular (LANCHA JÚNIOR, 1991).

### 5.3 ERITROPOIETINA

A EPO exógena utilizada foi a Alfaepoetina (rHuEPO 4.000U.I./ml *Blau*®) diluída na proporção de 1/79 ml de água destilada. Os animais dos GES e GET receberam 50 U.I./Kg administrados de forma subcutânea por três vezes na semana. Segundo Albuquerque (2009), essa dosagem apresenta-se mais fidedigna em expor/refletir os efeitos da administração de rHuEPO enquanto *doping*. Além disso, Jelkmann (2002) afirma que doses relativamente baixas de rHuEPO (3x15 U.I./kg de peso corporal) já são suficientes para aumentar significativamente os valores de hematócritos.

Os animais dos GCS e GCT receberam uma solução de soro fisiológico (0,9%) administrada também de forma subcutânea, por três vezes na semana para que fossem submetidos ao estresse da injeção, sem causar efeitos fisiológicos. A figura 3 mostra uma representação esquemática do desenho experimental.

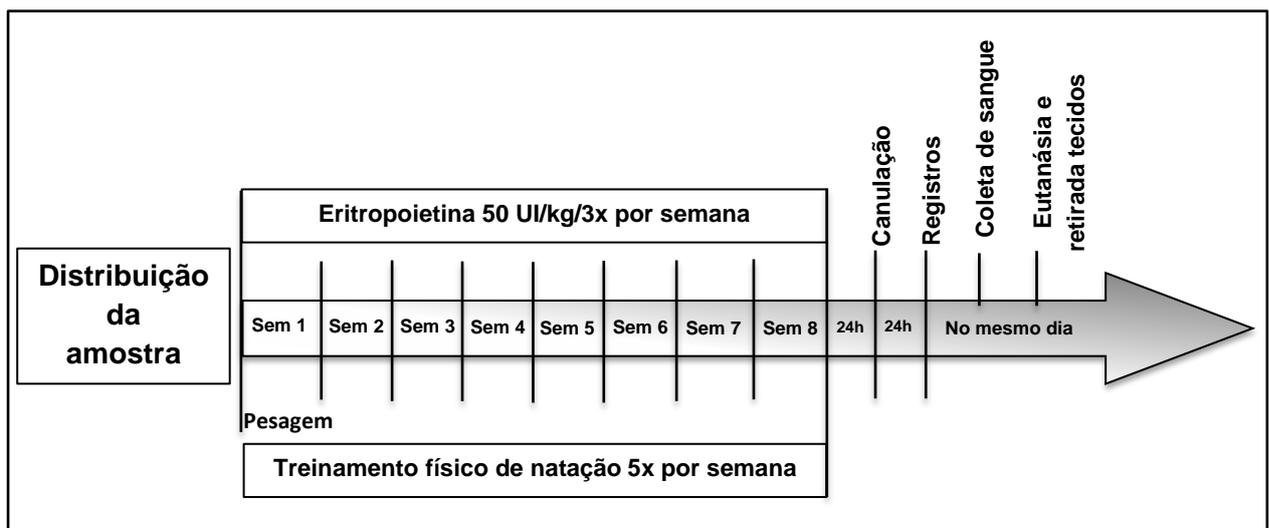


Figura 3 - Representação esquemática do desenho experimental. Fonte: autor (2015). Sem: semana; h: horas; UI/kg: unidades internacionais por quilo de massa corporal.

### 5.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Vinte quatro horas após o último dia de treinamento físico, os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (250mg/kg i.p.) e em seguida, cateteres de polietileno (PE-10 fundido a uma extensão de PE-50; *Clay Adams*™ *Brand*, *Polyethylene Tubing*, *Becton Dickinson*, *Sparks*) foram introduzidos na artéria femoral esquerda para registro direto da PA e outra na veia femoral para administração de drogas. Posteriormente, os cateteres foram exteriorizados para a região dorsal dos

animais e os mesmos permaneceram por 24 horas em caixas individuais para recuperação pós-operatória.

## 5.5 NÍVEIS BASAIS DE FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL

Após a recuperação cirúrgica, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de PA e a um amplificador de sinais (*Model 8805A, Hewlett-Packard, USA*) sendo convertido por uma placa análogo-digital (com frequência de amostragem -1000Hz) e transferido a um sistema computadorizado de aquisição de dados (*Aqdados, Lynx Tec. Eletron. SA, São Paulo, Brasil*).

Os animais permaneceram em uma sala com ambiente tranquilo a uma temperatura de 27°C por um período de adaptação de 15 minutos e em seguida foram realizados registros contínuos da PA pulsátil por 30 minutos para obtenção dos valores basais da PA e FC, e que foram também utilizados para as análises da VFC.

## 5.6 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

O sinal de PA, continuamente registrado no período inicial de 30 minutos foi processado pelo *software* PRE 24, de modo a gerar séries temporais batimento-a-batimento de intervalo de pulso (IP). A variância dos valores de IP dentro do período basal foi tomada como um índice de variabilidade no domínio do tempo.

A variabilidade do IP também foi avaliada no domínio da frequência, empregando-se o método de análise espectral autoregressivo (MALLIANI, 1991; TASK FORCE, 1996). Séries temporais do IP foram divididas em segmentos seriados de 300 batimentos, sendo que todo segmento sucessivo sobrepôs em 50% (150 batimentos) no segmento anterior (método de *Welch*). Usando segmentos estacionários das séries temporais, parâmetros autoregressivos foram estimados através do método de *Levinson-Durbin* e a ordem do modelo foi escolhida de acordo com o critério de *Akaike*.

Em seguida, sobre cada segmento estacionário individual de 300 batimentos, foi realizada a decomposição espectral. Este procedimento permite automaticamente quantificar a frequência central e a potência de cada componente espectral relevante em unidades absolutas, bem como em unidades normalizadas.

O procedimento de normalização foi realizado pela divisão da potência do componente de LF (0,20-0,80 Hz) ou HF (0,80 –3,00 Hz) pela potência espectral total, da qual se subtraiu a potência da banda VLF, multiplicando-se o resultado por 100 (MALLIANI, 1991; TASK FORCE,1996). Os parâmetros espectrais obtidos para cada segmento estacionário individual de 300 batimentos foram medidos e valores médios resultantes para os 30 minutos basais foram coletados para cada animal.

## 5.7 SENSIBILIDADE BARORREFLEXA CARDÍACA

O teste da sensibilidade barorreflexa cardíaca foi realizado imediatamente após a análise basal da FC e PA, por meio da avaliação das respostas bradicárdicas e taquicárdicas reflexas. Para isso, foram administradas doses de fenilefrina (FEN) e nitroprussiato de sódio (NPS) em concentrações diferentes pelo cateter da veia femoral exteriorizado no dorso dos animais, ambos no volume de 1µL/kg peso corporal. A ordem das drogas e suas concentrações foram: FEN 2 µg/ Kg, FEN 4 µg/ Kg, NPS 8 µg/ Kg e NPS 16 µg/ Kg. O intervalo entre cada dose foi de 5 minutos para se registrar as elevações e reduções de PA induzidas pelas drogas e para que os valores retornem aos basais (Figura 4).

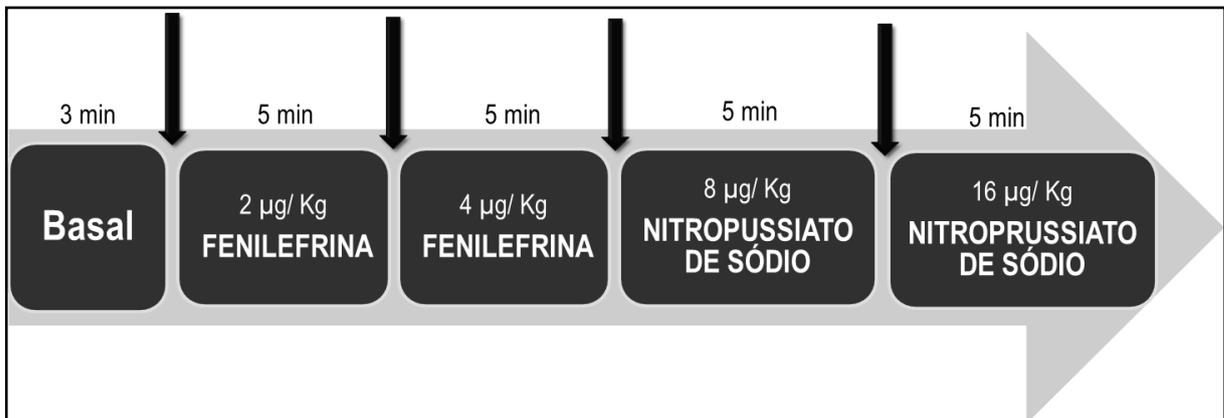


Figura 4 - Representação esquemática do protocolo de teste de sensibilidade barorreflexa cardíaca. Fonte: autor (2015). Min: minutos e µg/Kg: microgramas por quilo de massa corporal.

A FEN é um agonista de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico, causando uma vasoconstrição arterial periférica e, conseqüentemente, um aumento da PA. Essa situação ativa barorreceptores e o nervo vago, levando à um decréscimo da FC reflexamente. Já o NPS é um vasodilatador não dependente do endotélio que causa uma queda da PA e um aumento da FC de maneira reflexa (ANTUNES; BONAGAMBA; MACHADO, 2005)

As magnitudes da bradicardias e taquicardias reflexas induzidas, respectivamente pelas respostas pressóricas da FEN ou depressora do NPS, foram calculadas por meio da quantificação das variações da PAM com as respostas da FC reflexamente induzidas.

## 5.8 TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO

Em seqüência dos registros basais e da sensibilidade barorreflexa cardíaca, doses de sulfato de atropina (antagonista do receptor muscarínico, que impede a ação da acetilcolina, portanto, bloqueia a atividade parassimpática no coração) na concentração de 20 µg/ml. Quinze minutos depois, administração de cloridrato de propranolol (antagonista não seletivo β-adrenérgico, que inibe a ação das catecolaminas, bloqueando então a atividade simpática no coração) na concentração de 25 µg/ml, e um registro de mais 15 minutos foi executado (ANTUNES; BONAGAMBA; MACHADO, 2005). Ambas as drogas no volume de 200 µL/kg de massa corporal e foram administradas no cateter femoral exteriorizado no dorso do animal (Figura 5).

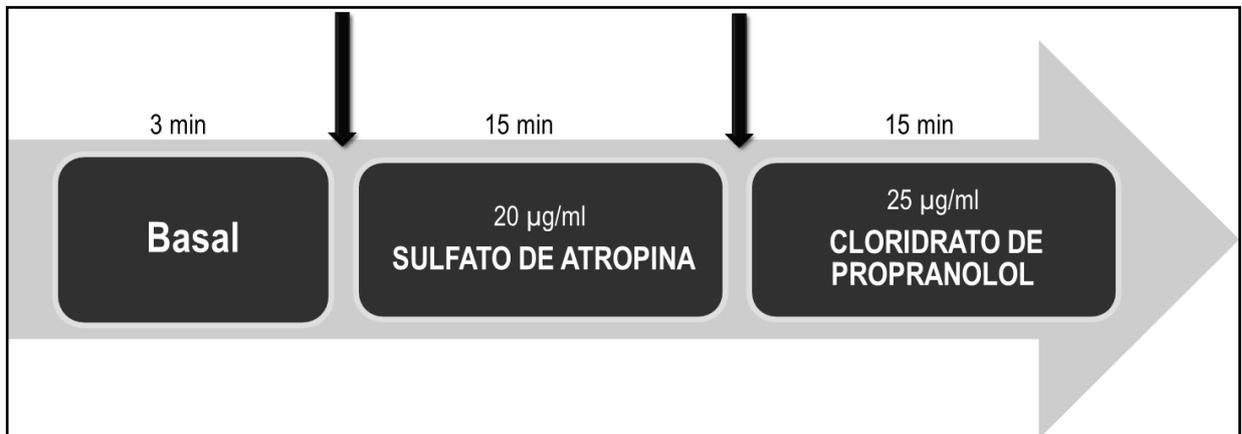


Figura 5 - Representação esquemática do protocolo de teste de tônus autonômico cardíaco. Fonte: autor (2015). Min: minutos e µg/ml: microgramas por milímetros.

A ordem de bloqueio autonômico foi alternada entre os animais, permitindo a quantificação do TS e TV cardíacos, bem como a frequência intrínseca de marcapasso cardíaco (FIMC) e o índice simpatovagal (ISV).

## 5.9 ERITROGRAMA

Após a realização dos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados com Tiopental Sódico em uma concentração de 100mg/Kg por via de administração intraperitoneal. Imediatamente após a eutanásia, foi coletado 2 ml de sangue da veia cava inferior, homogeneizado e armazenado em tubo coletor à vácuo com anticoagulante EDTA (*Vacutainer*®), preenchendo  $\frac{3}{4}$  do volume do tubo capilar e vedado à extremidade. O tubo foi colocado na micro centrífuga e centrifugado a 10.000 RPM por cinco minutos. A leitura do valor do hematócrito em porcentagem foi feita em tabela apropriada.

A dosagem da hemoglobina foi feita pelo método da cianometahemoglobina e para a contagem das hemácias foi utilizado o método do Hemocitômetro em Câmara de *Neubauer*. Todas as análises hematológicas foram realizadas no laboratório de análises clínicas do Centro de Educação Profissional (CEFORES) da UFTM.

## 5.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA CARDÍACA E RENAL

O coração e o rim direito foram excisados e lavados em soro fisiológico (0,9%). Os corações foram pesados para o cálculo da razão massa do coração absoluto/massa corporal, estimando assim a hipertrofia cardíaca. Após a pesagem, o coração e rim direito foram mantidos em tubos *Falcons* de 50 ml com solução de formol a 10%.

Após serem cortados no eixo transversal e frontal, o coração e o rim, respectivamente, foram colocados nos cassetes devidamente identificados para o processamento. Para a fixação do tecido, o material ficou 48 horas em solução de formol à 10%. Em seguida, aconteceu o processo de desidratação, no qual o material foi mergulhado em frascos contendo álcool em concentrações crescentes (de 70% até álcool absoluto) por 30 minutos em cada. Para o processo de diafanização ou clareamento, os cassetes foram imersos três vezes em frascos de xilol, também por 30 minutos cada, fazendo com que os tecidos embebidos nessa substância tornassem translúcidos.

Para a impregnação na parafina, o material foi incluído em recipientes contendo parafina líquida a 60°C e colocados em estufa, num total de dois banhos, com duração de 30 minutos e 15 minutos. Em seguida, fez-se a inclusão

propriamente dita em que a parafina foi derramada em formas de alumínio com o material e formaram-se blocos quando esfriaram.

Os blocos de parafina foram cortados em um micrótomo com espessura de cinco micrômetros. Os cortes foram colocados em banho-maria de água aquecida para evitar dobras e inseridos na lâmina. Foram feitas cinco lâminas: três de reservas para futuros processos de coloração, uma corada com hematoxilina eosina para análise morfológica de forma geral e outra corada com picrossirius para verificar a existência de tecido conjuntivo em excesso.

As análises morfológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Geral da UFTM. Para quantificar a hipertrofia cardíaca, as lâminas coradas com hematoxilina eosina foram analisadas através do microscópio *Leica DPC 300 FX*<sup>®</sup> utilizando uma lente com aumento de 40x. As imagens foram capturadas pelo *software Adobe Photoshop*<sup>®</sup> 6.0. Depois de todas as imagens capturadas, o *software ImageJ 1.50b*<sup>®</sup> foi utilizado para quantificar o diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos, bem como a espessura da parede do VE.

#### 5.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA CARDÍACA E RENAL

Também conduzidas no Laboratório de Patologia Geral da UFTM, as lâminas coradas com picrossirius foram analisadas no microscópio *Zeiss – LSM T-PMT*<sup>®</sup> utilizando uma lente com aumento de 20x e para capturar as imagens foi utilizado o *software AxioVision*<sup>®</sup> 4.9.1.0. Em seguida, uma série de análises é feita automaticamente pelo *software ImageJ 1.50b*<sup>®</sup> para detectar cores específicas que representam fibrose do tecido cardíaco e renal e assim, quantificar a porcentagem dessa área no total da área da imagem.

#### 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi feito o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para determinar a normalidade das amostras. Os parâmetros analisados foram comparados entre os grupos utilizando-se o teste *ANOVA “two way”* seguido pelo teste *post-hoc de Tukey* quando as variáveis apresentassem distribuição normal. Foi definido como etiologia o uso ou não da rHuEPO; como intervenção a execução ou não de treinamento físico; e como interação a análise das duas variáveis juntas. Caso os parâmetros

analisados apresentassem distribuição não normal, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*.

Os resultados referentes ao peso corporal antes e após o período de treinamento físico foram comparados através do teste ANOVA “two way” para medidas repetidas, seguidos do teste *post-hoc de Tukey* de acordo com presença de normalidade e ANOVA “Two Way on Ranks” seguido pelo *post-hoc de Dunn's* para medidas repetidas em caso da distribuição de amostra não normal.

Todos os parâmetros avaliados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\pm$ epm) e foi adotado um nível de significância de  $p \leq 0,05$ . As análises foram conduzidas utilizando-se o software *SigmaStat® 2.03 (Jandel Scientific Software; SPSS, Chicago, IL)*.

## 6 RESULTADOS

A massa corporal dos animais foi avaliada no início de cada semana, como descrito anteriormente e o gráfico 1 mostra os resultados dos valores médios entre os grupos durante as oito semanas de protocolos. Os animais apresentaram ganho gradual da massa corporal entre as semanas, sendo estatisticamente significativo comparado com os valores basais (GCS:  $340,50 \pm 10,04$ ;  $408,50 \pm 4,38$ ;  $400,40 \pm 6,62$ ;  $418,30 \pm 9,49$ ;  $436,00 \pm 6,86$  - GCT:  $330,0 \pm 15,66$ ;  $396,43 \pm 20,81$ ;  $371,14 \pm 17,85$ ;  $372,86 \pm 16,90$ ;  $417,43 \pm 15,54$  - GES:  $337,78 \pm 5,72$ ;  $366,67 \pm 8,08$ ;  $408,11 \pm 11,11$ ;  $406,00 \pm 9,02$ ;  $424,44 \pm 10,15$  - GET:  $318,75 \pm 6,86$ ;  $355,88 \pm 11,52$ ;  $380,00 \pm 11,41$ ;  $402,25 \pm 12,49$ ;  $414,38 \pm 17,10$ , respectivamente nas semanas 0,2,4,6 e 8).

Na segunda semana, o GCS teve um comportamento diferente, apresentando maior média de massa corporal comparado com os demais grupos (GCS:  $408,50 \pm 4,38$ g; GCT:  $396,43 \pm 20,81$ ; GES:  $366,67 \pm 8,08$ g; GET:  $355,88 \pm 11,52$ g).

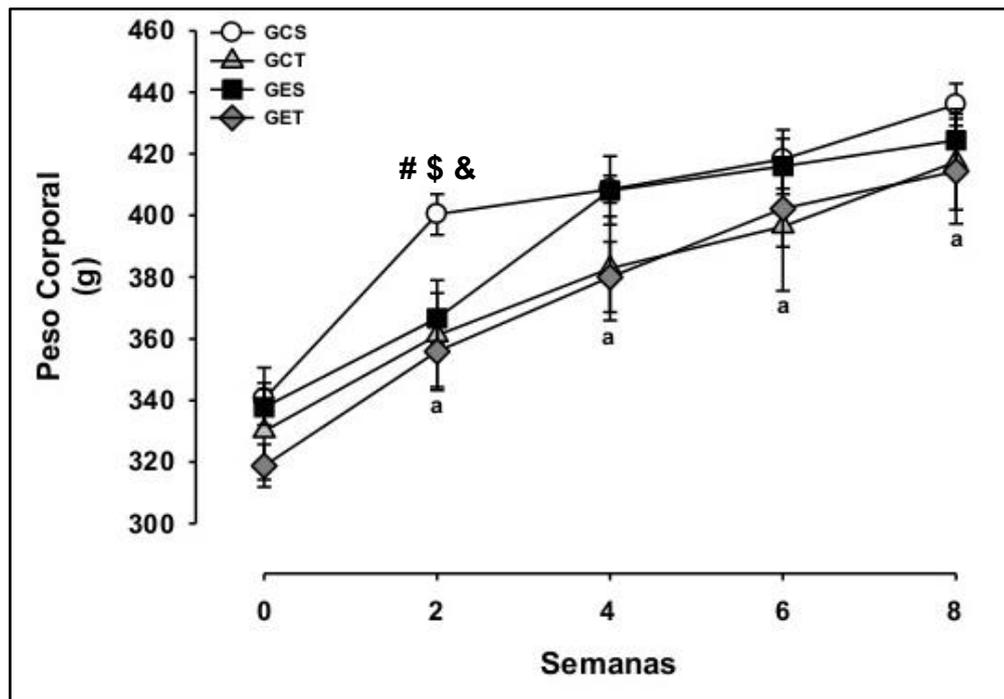


Gráfico 1 - Massa corporal das 8 semanas. Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão. # $p < 0,05$  vs GCT; \$ $p < 0,05$  vs GET; & $p < 0,05$  vs GES; a  $p < 0,05$  vs Semana 0 (basal).

A administração de eritropoietina alterou os dados hematológicos dos animais dos GES e GET, exceto para os valores médios de VCM (volume corpuscular médio) e HCM (hemoglobina corpuscular média) (Tabela 1).

Tabela 1 - Eritrograma.

	GCS (n=10)	GCT (n=08)	GES (n=10)	GET (n=08)
Hemácias (mm <sup>3</sup> )	6,85E+06 $\pm$ 6,04E+05	6,28E+06 $\pm$ 4,4E+05	8,9E+06 $\pm$ 6,11E+05 <sup>*#</sup>	1,14E+07 $\pm$ 6,4E+05 <sup>*#</sup>
Hematócritos (%)	40,10 $\pm$ 1,70	36,71 $\pm$ 2,46	51,79 $\pm$ 2,23 <sup>*#</sup>	53,35 $\pm$ 2,19 <sup>#</sup>
Hemoglobina (g/dl)	13,37 $\pm$ 0,57	11,73 $\pm$ 0,70	17,26 $\pm$ 0,74 <sup>*#</sup>	17,78 $\pm$ 0,73 <sup>#</sup>
VCM (fl)	64,08 $\pm$ 7,57	58,86 $\pm$ 1,42	60,09 $\pm$ 3,77	47,71 $\pm$ 3,14
HCM (pg)	21,36 $\pm$ 2,52	18,85 $\pm$ 0,35	20,03 $\pm$ 1,26	15,90 $\pm$ 1,05

Fonte: autor (2015). E: expoente; GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \*  $p < 0,05$  vs GCS. #  $p < 0,05$  vs GCT.

Houve uma diminuição da FC basal nos grupos que realizaram o treinamento físico (Gráfico 2), verificado depois do teste ANOVA TWO WAY ( $p = 0,004$  para

intervenção) porém, executando o teste de acompanhamento *Post Hoc de Tukey*, essa diferença foi significativa somente no GCT ( $309,28 \pm 9,95$  bpm) comparado com seu respectivo grupo sedentário (GCS:  $348,80 \pm 12,56$  bpm). Para o GET percebe-se uma tendência ( $p=0,061$ ) de queda da FC basal ( $310,07 \pm 10,30$  bpm) quando comparado com o GES ( $339,60 \pm 8,29$  bpm).

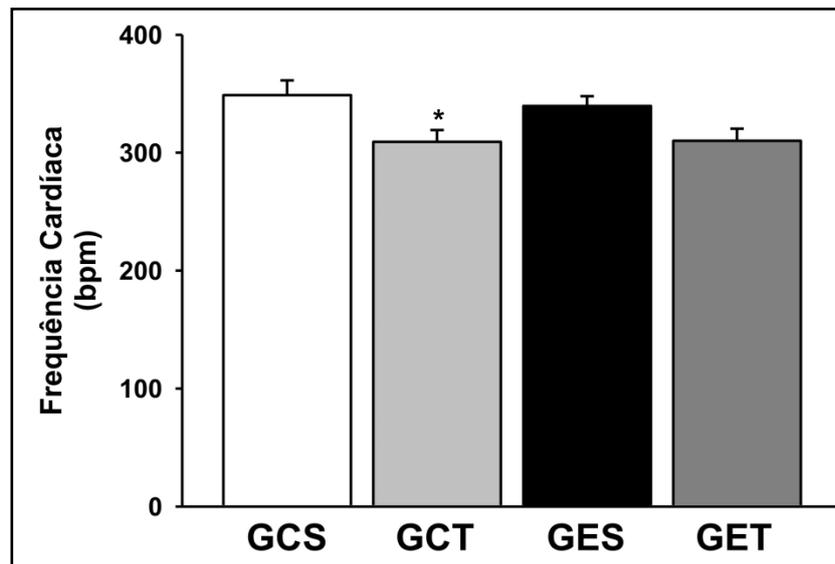


Gráfico 2 - Frequência cardíaca basal. Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \* $p < 0,05$  vs GCS.

O gráfico 3 mostra os valores da pressão arterial sistólica (PAS) (Gráfico 3A), pressão arterial diastólica (PAD) (Gráfico 3B) e PAM (Gráfico 3C) em repouso. A eritropoietina foi capaz de aumentar a PAS de maneira significativa comprovado pelo teste *ANOVA TWO WAY* ( $p=0,008$  para etiologia), mas quando se executa o teste de acompanhamento *Post Hoc de Tukey*, esse aumento é significativo apenas no grupo sedentário (GES:  $126,69 \pm 4,31$  mmHg vs GCS:  $113 \pm 3,76$  mmHg). No GET observou-se uma tendência ( $p=0,088$ ) de aumento da PAS basal comparado com o seu respectivo grupo controle (GET:  $119,57 \pm 4,14$  mmHg vs GCT:  $107,84 \pm 5,71$  mmHg).

Em contrapartida, não houve diferença entre os grupos nos valores médios da PAD (GCS:  $71,21 \pm 3,09$  mmHg; GCT:  $73,23 \pm 5,53$  mmHg; GES:  $74,82 \pm 5,97$  mmHg e GET:  $81,85 \pm 4,20$  mmHg) tampouco da PAM (GCS:  $85,14 \pm 1,86$  mmHg; GCT:  $84,77 \pm 3,42$  mmHg; GES:  $92,11 \pm 4,78$  mmHg e GET:  $94,42 \pm 3,67$  mmHg).

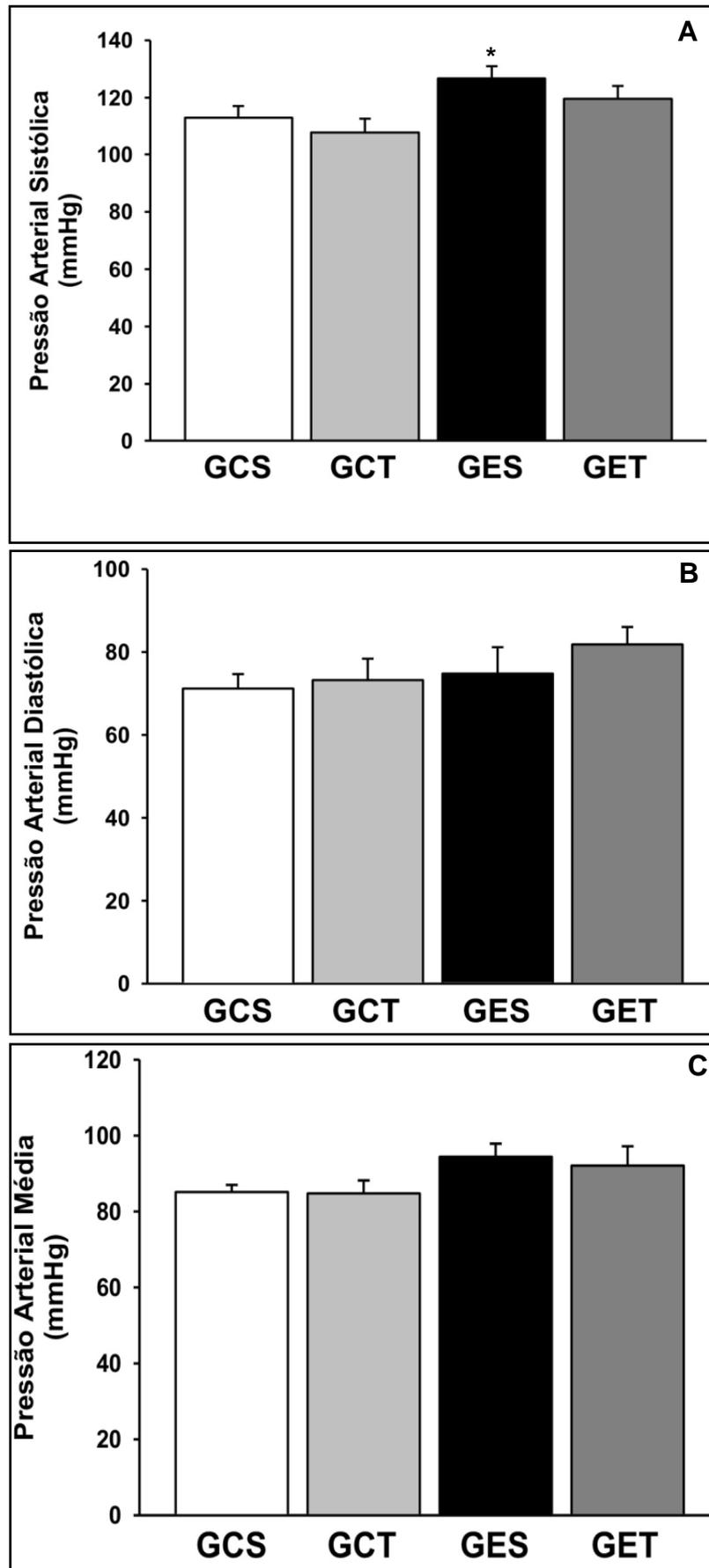


Gráfico 3 - Pressão arterial sistólica (A), pressão arterial diastólica (B) e pressão arterial média (C). Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média ± erro-padrão. \*p<0,05 vs GCS.

A tabela 2 apresenta os aspectos da VFC no domínio do tempo e da frequência. O GCT teve maior valor médio do IP entre os grupos e foi significativo comparado com o GCS, e apresentou maior valor de HF comparado com o seu respectivo grupo sedentário, dados estes que corroboram com o valor mais baixo encontrado na FC basal apresentado anteriormente.

Tabela 2 - Variabilidade da frequência cardíaca.

	<b>GCS</b> <b>(n=10)</b>	<b>GCT</b> <b>(n=08)</b>	<b>GES</b> <b>(n=10)</b>	<b>GET</b> <b>(n=08)</b>
<b>IP (ms)</b>	174,17 ± 6,69	195,22 ± 6,34*	177,51 ± 4,25	194,84 ± 5,76
<b>Variância (ms<sup>2</sup>)</b>	13,24 ± 2,77	20,07 ± 4,17	15,23 ± 1,48	21,66 ± 4,34
<b>VLF</b>	8,33 ± 1,96	9,12 ± 2,78	9,83 ± 0,85	12,45 ± 2,51
<b>LF (ms<sup>2</sup>)</b>	0,68 ± 0,22	1,14 ± 0,27	0,68 ± 0,12	2,94 ± 1,87
<b>LF, nu (%)</b>	9,19 ± 2,32	9,80 ± 1,86	11,03 ± 1,22	12,36 ± 1,95
<b>HF (ms<sup>2</sup>)</b>	4,05 ± 0,69	9,79 ± 2,63*	4,61 ± 0,61	6,25 ± 0,75
<b>HF, nu (%)</b>	85,70 ± 2,22	89,82 ± 2,10	87,58 ± 1,56	86,82 ± 1,61
<b>Relação LF/HF</b>	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,53 ± 0,37

Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO; IP, intervalo de pulso; VLF, potência de muita baixa frequência; LF, potência de banda de baixa frequência; LF,nu, potência de banda de baixa frequência em unidades normalizadas; HF, potência de banda de alta frequência; HF,nu, potência de banda de alta frequência em unidades normalizadas. Dados expressos como média ± erro-padrão. \* p<0,05 vs GCS.

As tabelas 3 e 4 apresentam os resultados da VPAS e VPAD, respectivamente. Não houve diferença significativa para a VPAS entre os grupos. Já para a VPAD, o GET apresentou menor valor médio de LF comparado com o GCT. Para o LF (nu) o teste ANOVA *Two Way* mostrou uma diferença significativa para a etiologia (p=0,045). Depois de aplicar o teste de acompanhamento *Post Hoc de Tukey* não observamos diferenças entre as médias individuais de cada grupo.

Tabela 3 - Variabilidade da pressão arterial sistólica.

	<b>GCS</b> <b>(n=10)</b>	<b>GCT</b> <b>(n=08)</b>	<b>GES</b> <b>(n=10)</b>	<b>GET</b> <b>(n=08)</b>
<b>Variância (mmHg<sup>2</sup>)</b>	26,14 ± 3,45	36,75 ± 14,89	31,66 ± 4,00	26,33 ± 4,10
<b>VLF (mmHg<sup>2</sup>)</b>	13,82 ± 2,07	19,68 ± 7,61	15,81 ± 1,90	16,57 ± 2,51
<b>LF (mmHg<sup>2</sup>)</b>	9,38 ± 1,24	13,97 ± 6,43	12,06 ± 2,91	6,51 ± 0,73
<b>LF, nu (%)</b>	71,25 ± 2,54	70,64 ± 7,79	67,05 ± 4,47	68 ± 6,47

Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO; VLF, potência de muita baixa frequência; LF, potência de banda de baixa frequência; LF,nu, potência de banda de baixa frequência em unidades normalizadas. Dados expressos como média ± erro-padrão.

Tabela 4 - Variabilidade da pressão arterial diastólica.

	<b>GCS</b> <b>(n=10)</b>	<b>GCT</b> <b>(n=08)</b>	<b>GES</b> <b>(n=10)</b>	<b>GET</b> <b>(n=08)</b>
<b>Variância (mmHg<sup>2</sup>)</b>	22,24 ± 2,15	28,20 ± 5,61	23,50 ± 5,97	20,16 ± 1,53
<b>VLF (mmHg<sup>2</sup>)</b>	11,97 ± 1,14	16,01 ± 4,14	9,84 ± 0,81	12,45 ± 0,70
<b>LF (mmHg<sup>2</sup>)</b>	7,77 ± 1,03	9,12 ± 1,18	9,14 ± 3,17	4,48 ± 0,53 <sup>#</sup>
<b>LF, nu (%)</b>	73,22 ± 3,18	73,45 ± 6,56	64,84 ± 2,76	61,74 ± 6,68 <sup>*#</sup>

Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO; IP, intervalo de pulso; VLF, potência de muita baixa frequência; LF, potência de banda de baixa frequência; LF,nu, potência de banda de baixa frequência em unidades normalizadas. Dados expressos como média ± erro-padrão. \* p<0,05 vs GCS; # p<0,05 vs GCT.

Os resultados da sensibilidade barorreflexa cardíaca em relação as diferentes doses administradas de FEN e NPS estão representados na tabela 5.

Tabela 5 - Sensibilidade barorreflexa cardíaca nas diferentes doses de FEN e NPS.

	<b>Doses drogas</b>	<b>GCS</b> <b>(n=10)</b>	<b>GCT</b> <b>(n=08)</b>	<b>GES</b> <b>(n=10)</b>	<b>GET</b> <b>(n=08)</b>
<b>Bradycardia reflexa</b>	FEN 2 µg/ Kg	-0,37 ± 0,16	-0,55 ± 0,06	-0,70 ± 0,23	-0,54 ± 0,12
	FEN 4 µg/ Kg	-0,49 ± 0,11	-0,66 ± 0,18	-1,08 ± 1,17	-0,65 ± 0,40
<b>Taquicardia reflexa</b>	NPS 8 µg/ Kg	-1,53 ± 0,23	-1,73 ± 0,27	-1,58 ± 0,33	-1,86 ± 0,27
	NPS 16 µg/ Kg	-1,39 ± 0,18	-1,45 ± 0,2	-2,50 ± 0,68	-1,61 ± 0,24

Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média ± erro-padrão.

Já os valores médios de taquicardia e bradicardia reflexa podem ser evidenciados no gráfico 4. Podemos observar que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos, independente da dosagem das drogas ou do valor médio.

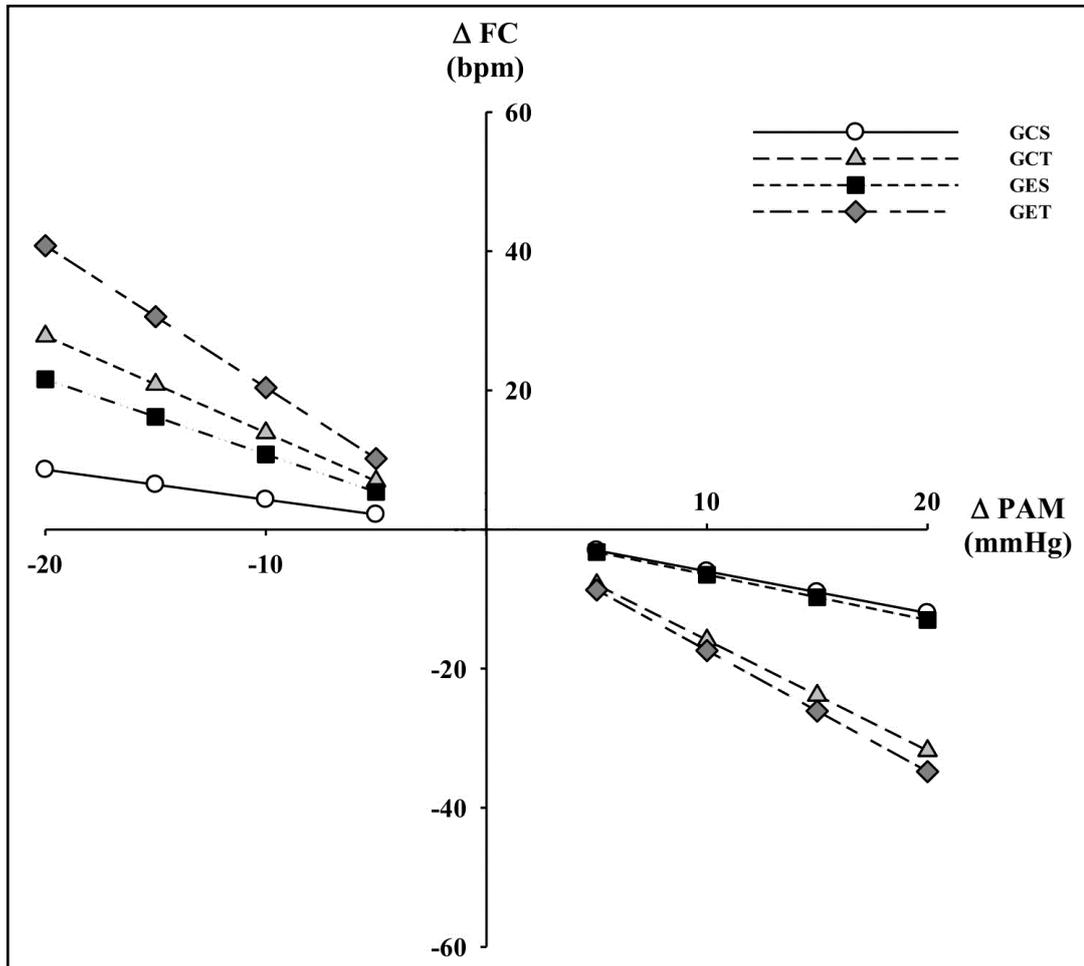


Gráfico 4 - Sensibilidade barorreflexa cardiovascular. Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão.

O gráfico 5 apresenta os resultados do efeito direto do bloqueio simples de cada sistema do controle autonômico cardíaco. O gráfico 5A mostra o bloqueio simples do SNS depois da administração de PROP e, com a FC antes e depois da droga, avalia-se o efeito desse sistema sobre o coração. Não houve diferença significativa entre os grupos nessa variável.

Enquanto que o gráfico 5B mostra o bloqueio simples do SNP depois da administração de ATRO e, da mesma forma, com a FC antes e depois do bloqueio, avalia-se o efeito desse sistema sobre o coração. Para o efeito vagal, o teste

ANOVA TWO WAY mostrou um aumento para os grupos que receberam EPO ( $p=0,027$  para etiologia) e, com o teste de acompanhamento *Post Hoc de Tukey*, não houve diferença entre as médias individuais de cada grupo.

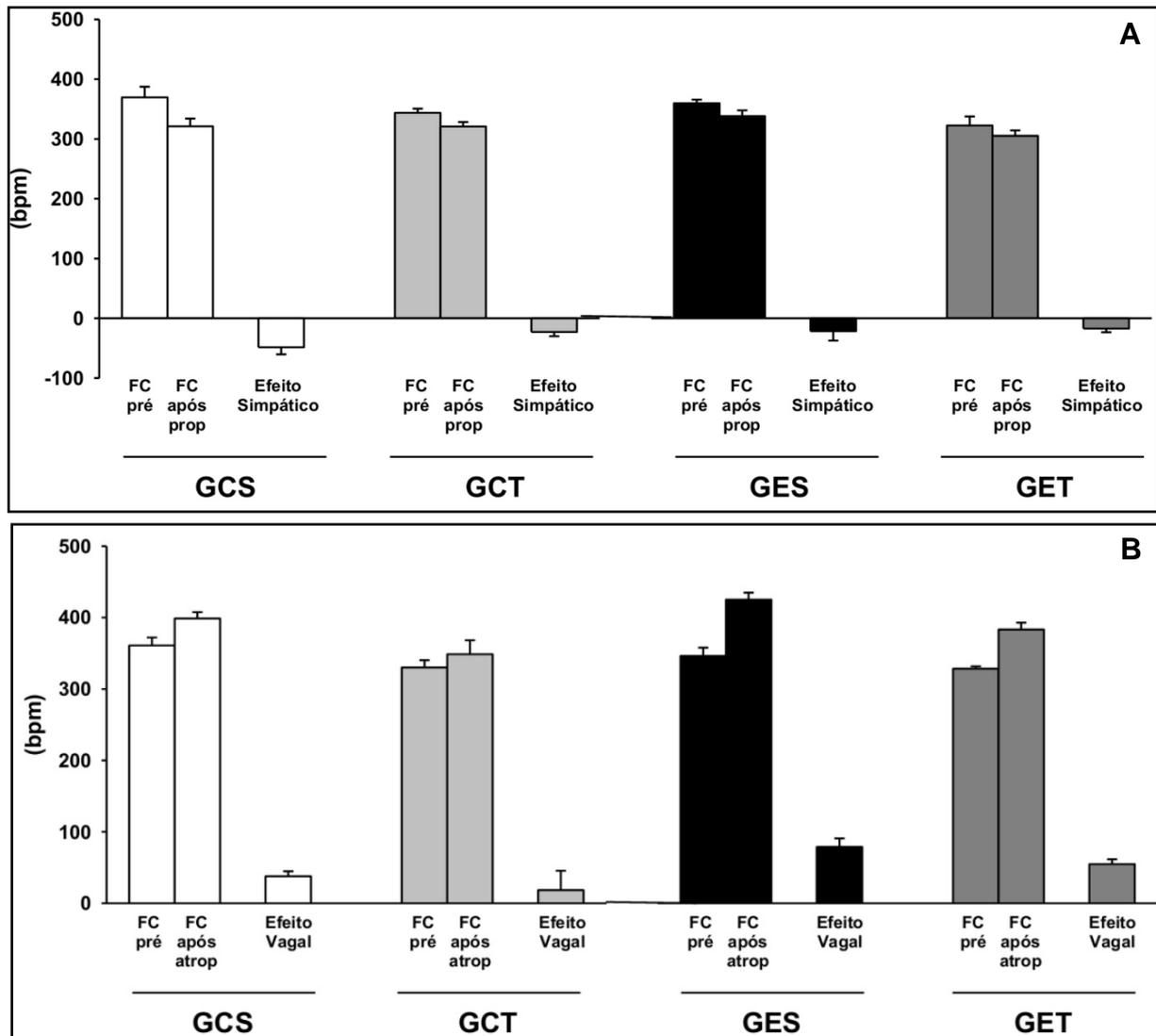


Gráfico 5 - Efeito simpático (A) e efeito vagal (B). Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão.

A FIMC está representada no gráfico 6, juntamente com o TS e TV. A FIMC no GES foi maior ( $393,13 \pm 9,79$  bpm) comparado com o GCS ( $360,63 \pm 9,29$  bpm). Para o TS, o GCT apresentou um menor valor comparado com o GCS ( $2,88 \pm 9,24$  bpm e  $33,58 \pm 8,27$  bpm, respectivamente). O grupo GET também apresentou menor valor médio ( $15,95 \pm 10,68$  bpm) comparado com seu respectivo grupo sedentário (GES:  $44,31 \pm 7,55$  bpm). Para o TV, o GET apresentou maior valor ( $68,73 \pm 12,93$  bpm) comparado com o GCT ( $18,81 \pm 16,70$  bpm), mostrando um

aumento da ação parassimpática sobre o coração no grupo que recebeu EPO e realizou o treinamento físico.

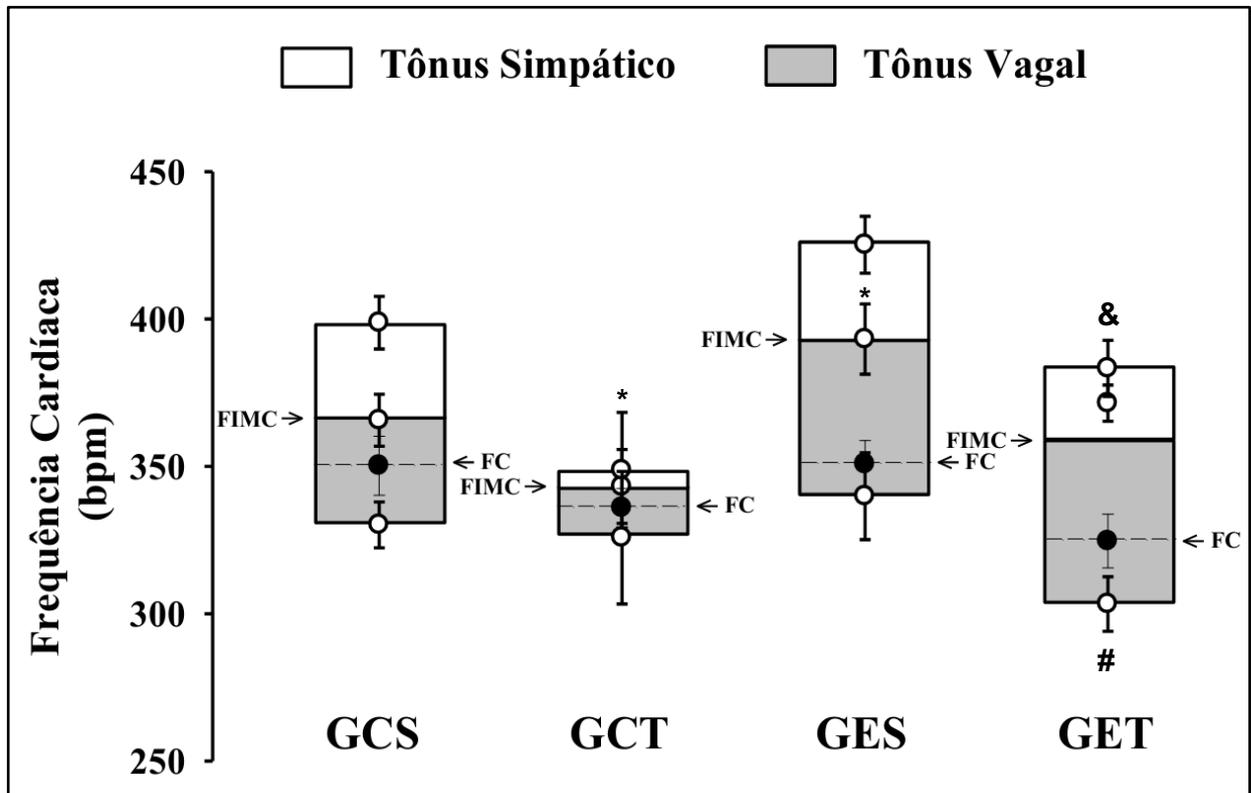


Gráfico 6 - Tonus autonômico cardíaco e frequência intrínseca de marcapasso cardíaco. Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \*  $p < 0,05$  vs GCS; #  $p < 0,05$  vs GCT; &  $p < 0,05$  vs GES.

O GES apresentou uma diminuição da hiperatividade simpática sobre o coração ( $0,90 \pm 0,03\%$ ) quando comparado com seu respectivo grupo controle (GCS:  $1,01 \pm 0,03\%$ ), como mostra o gráfico 7. Da mesma forma, o GET também apresentou uma diminuição do ISV ( $0,87 \pm 0,03\%$ ) quando comparado com o seu respectivo grupo controle (GCT:  $0,98 \pm 0,04\%$ ).

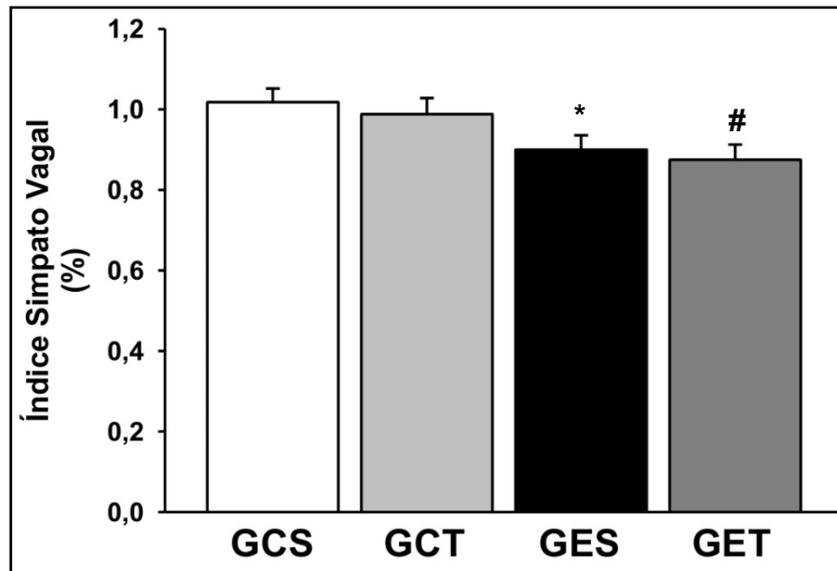


Gráfico 7 - Índice simpato-vagal. Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \* $p < 0,05$  vs GCS; # $p < 0,05$  vs GCT;

As estimativas da hipertrofia cardíaca estão apresentadas na tabela 6, onde se observa os dados referentes a massa cardíaca absoluta e relativa. O GCT obteve uma maior massa cardíaca relativa em comparação com o GCS, por outro lado, ambos os grupos que receberam rHuEPO tiveram menores valores comparados ao GCT.

Tabela 6 - Estimativa da hipertrofia cardíaca.

	<b>GCS</b> (n=10)	<b>GCT</b> (n=08)	<b>GES</b> (n=10)	<b>GET</b> (n=08)
<b>Massa cardíaca absoluta (g)</b>	1,60 $\pm$ 0,06	1,74 $\pm$ 0,11	1,50 $\pm$ 0,06	1,53 $\pm$ 0,07
<b>Massa cardíaca relativa (g)</b>	0,0037 $\pm$ 0,0001	0,0042 $\pm$ 0,0003*	0,0035 $\pm$ 0,0001#	0,0036 $\pm$ 0,0001#

Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão.\*  $p < 0,05$  vs GCS. #  $p < 0,05$  vs GCT.

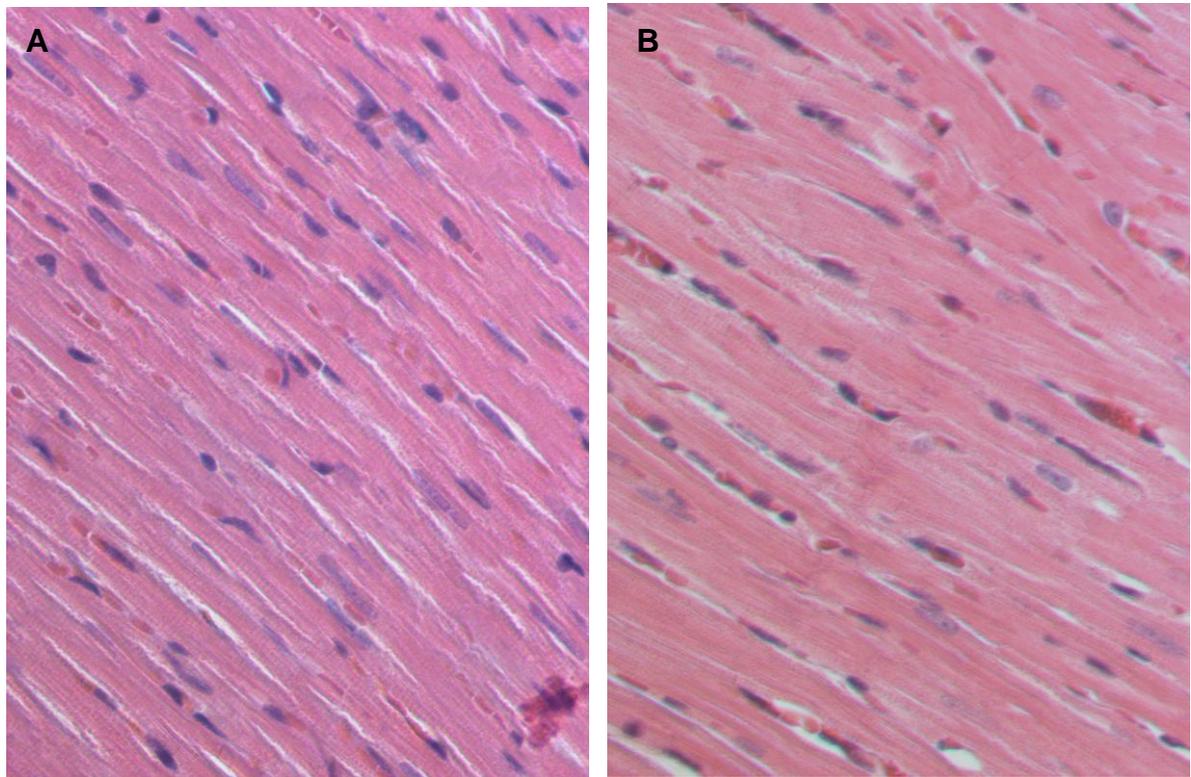
Com intuito de comprovar a hipertrofia cardíaca, um estudo histológico foi feito. Para isso, têm-se os resultados do diâmetro do núcleo dos cardiomiócitos e espessura da parede do VE, conforme tabela 7. Corroborando com os dados da estimativa cardíaca apresentados anteriormente, o GCT mostrou maior valor de diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos quando comparados com o GCS. Além disso, o GES também apresentou maior valor nessa variável comparado com o GCS. Para a espessura da parede do VE, não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 7 - Estudo histológico do tecido cardíaco.

	<b>GCS</b> <b>(n=10)</b>	<b>GCT</b> <b>(n=08)</b>	<b>GES</b> <b>(n=10)</b>	<b>GET</b> <b>(n=08)</b>
<b>Diâmetro nuclear de cardiomiócitos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4,16 $\pm$ 0,04	4,87 $\pm$ 0,09*	4,98 $\pm$ 0,04*	4,80 $\pm$ 0,05
<b>Espessura da parede do VE (cm)</b>	0,160 $\pm$ 0,004	0,190 $\pm$ 0,006	0,188 $\pm$ 0,008	0,182 $\pm$ 0,006

Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO; VE, ventrículo esquerdo. Dados expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \*  $p < 0,05$  vs GCS.

A figura 6 mostra as imagens representativas da histologia do tecido cardíaco.



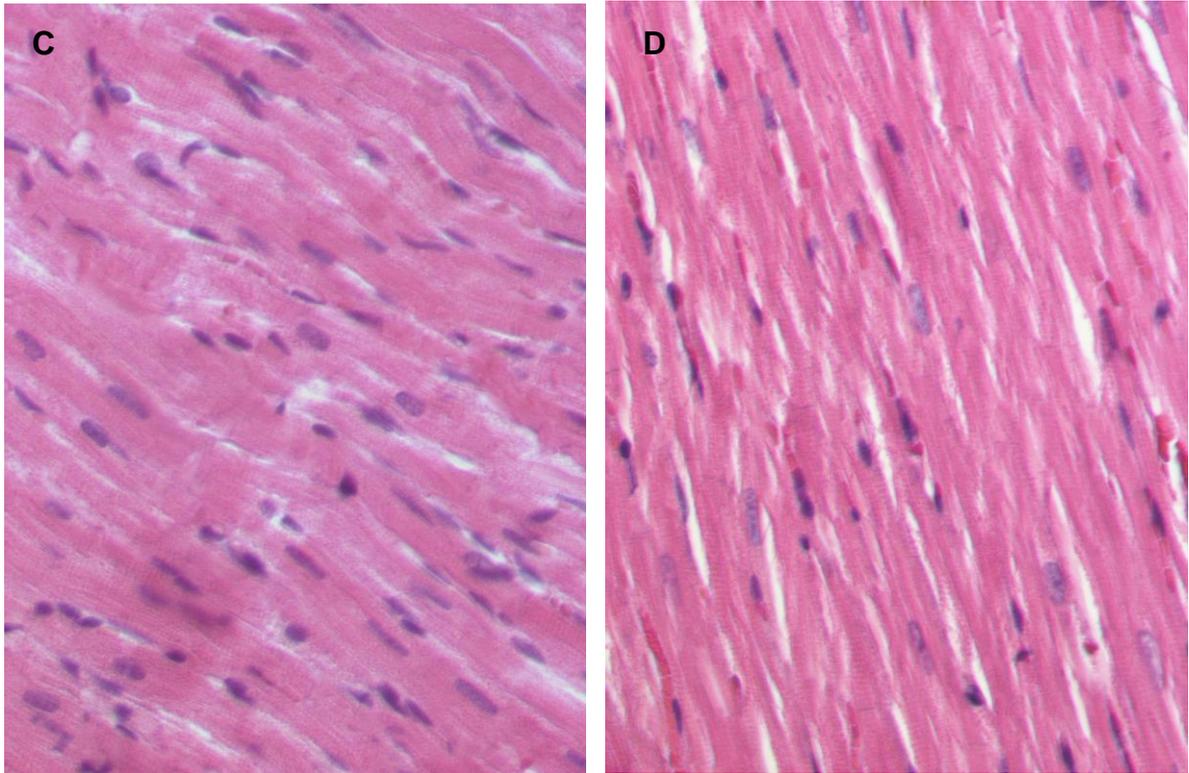


Figura 6 - Imagens representativas do estudo histológico cardíaco para análise do diâmetro do núcleo dos cardiomiócitos. Fonte: autor (2015). A: GCS, grupo controle sedentário; B: GCT, grupo controle treinado; C: GES, grupo sedentário com EPO; D: GET, grupo treinado com EPO.

Já a figura 7 apresenta as imagens representativas das lâminas dos corações coradas com hematoxilina-eosina, que possibilitou a medida da espessura da parede do VE.

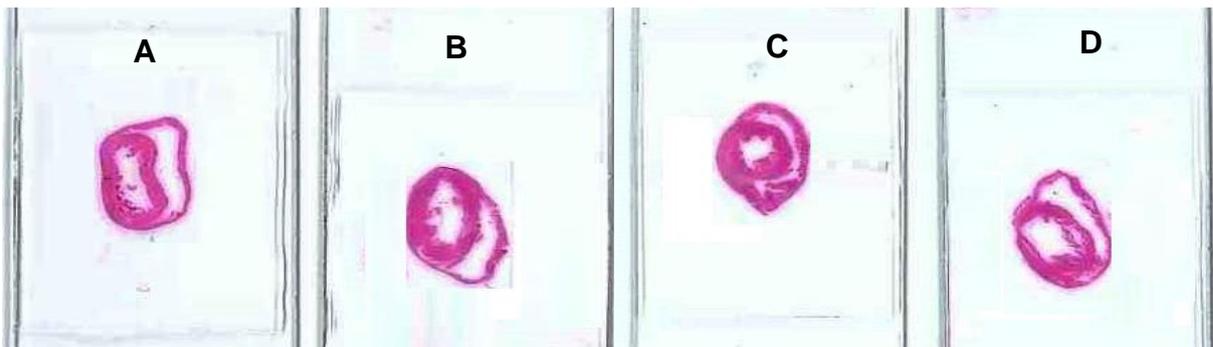


Figura 7 - Imagens ilustrativas do estudo histológico cardíaco para análise da espessura da parede do ventrículo esquerdo. Fonte: autor (2015). A: GCS, grupo controle sedentário; B: GCT, grupo controle treinado; C: GES, grupo sedentário com EPO; D: GET, grupo treinado com EPO.

Utilizando a coloração de picrossirus é possível visualizar áreas com fibrose excessiva, nesse sentido, a tabela 8 mostra uma quantificação em porcentagem dessa área no tecido cardíaco e renal. Os GES e GET apresentaram maiores áreas de fibrose cardíaca comparados com os GCS e GCT. Enquanto que no rim, o GES

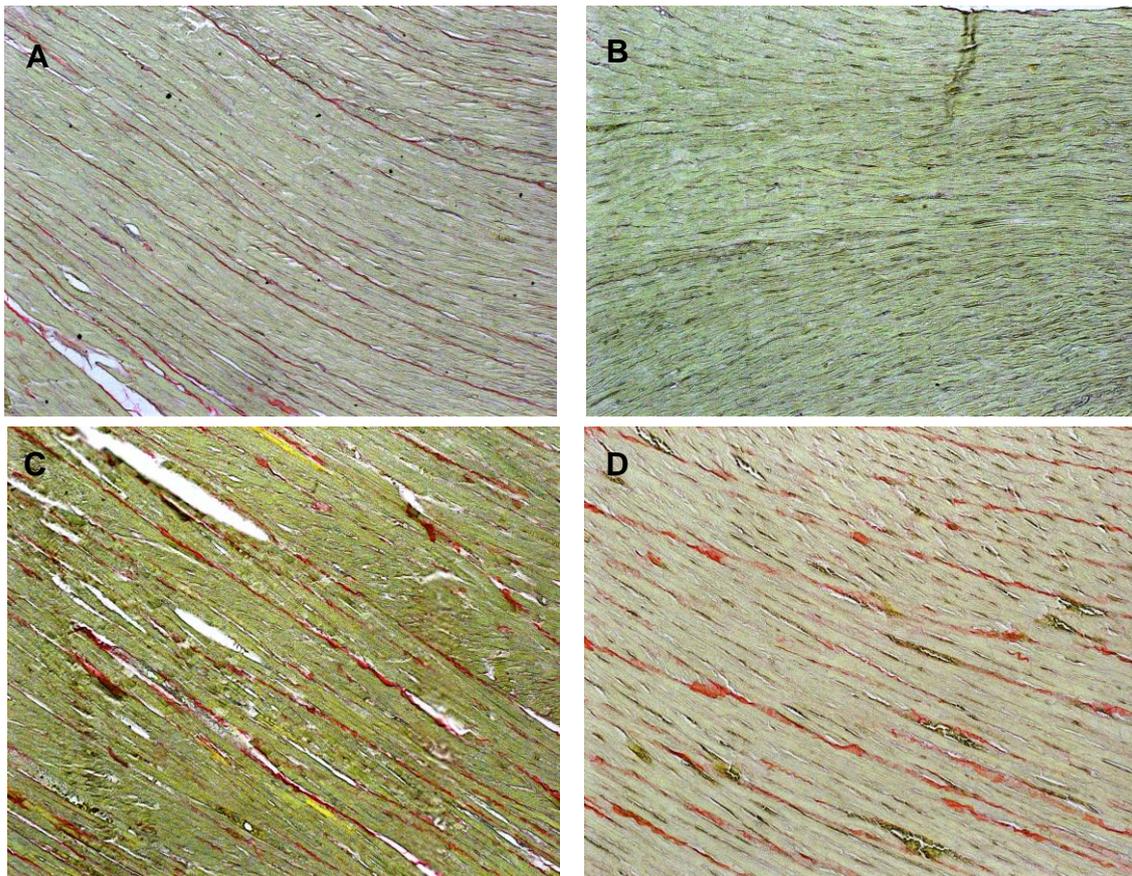
apresentou maior área de fibrose comparada com o GCS e o GET apresentou maior valor dentre todos os grupos.

Tabela 8 - Fibrose cardíaca e renal.

	<b>GCS (n=10)</b>	<b>GCT (n=08)</b>	<b>GES (n=10)</b>	<b>GET (n=08)</b>
<b>Fibrose cardíaca (%)</b>	18,63 ± 0,70	18,08 ± 0,64	30,15 ± 0,71 <sup>*#</sup>	39,74 ± 1,03 <sup>*#</sup>
<b>Fibrose renal (%)</b>	5,75 ± 0,70	9,61 ± 0,59	15,83 ± 0,58 <sup>*</sup>	30,64 ± 0,46 <sup>*#&amp;</sup>

Fonte: autor (2015). GCS, grupo controle sedentário; GCT, grupo controle treinado; GES, grupo sedentário com EPO; GET, grupo treinado com EPO. Dados expressos como média ± erro-padrão. \* p<0,05; #p<0,05 vs GCT; &p<0,05 vs GES.

Podemos evidenciar a seguir as imagens ilustrativas da fibrose cardíaca (Figura 8A, 8B, 8C e 8D) e fibrose renal (Figura 8E, 8F, 8G e 8H).



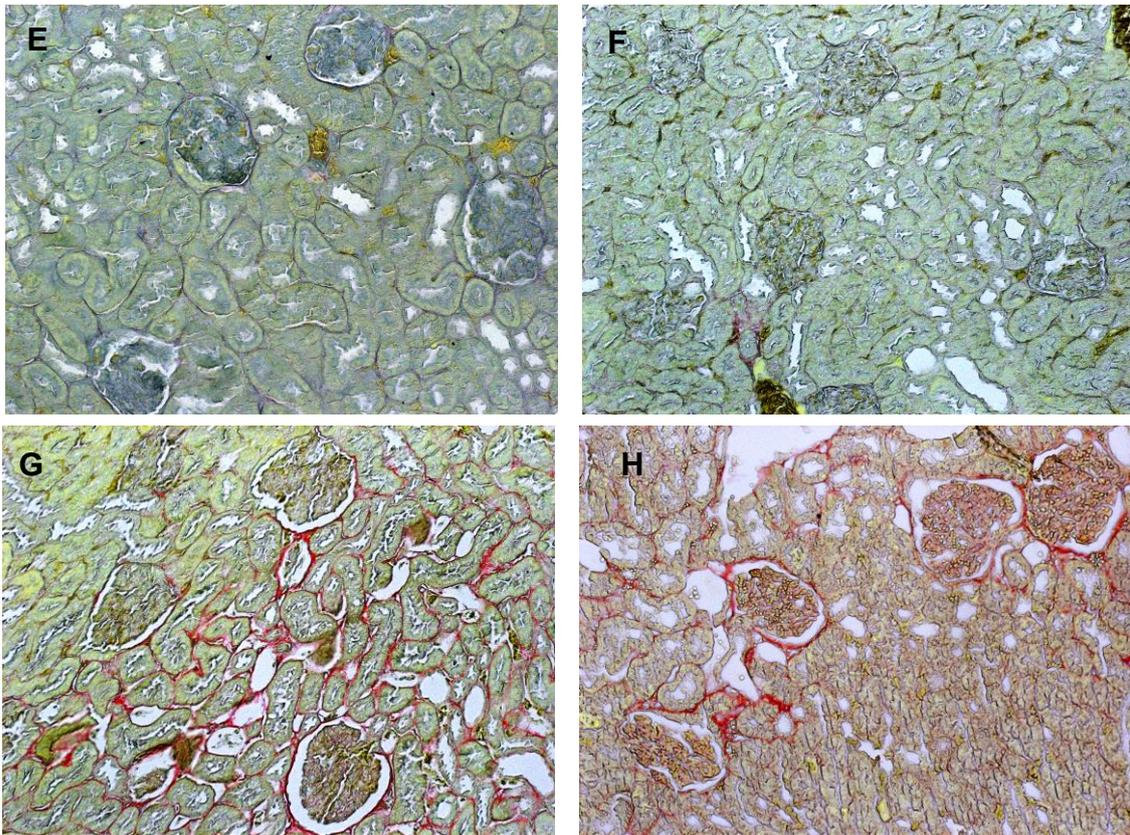


Figura 8 - Imagens representativas da fibrose cardíaca e renal. Fonte: autor (2015). Imagens do tecido cardíaco: A: GCS, grupo controle sedentário; B: GCT, grupo controle treinado; C: GES, grupo sedentário com EPO; D: GET, grupo treinado com EPO; Imagens do tecido renal: E: GCS, grupo controle sedentário; F: GCT, grupo controle treinado; G: GES, grupo sedentário com EPO; H: GET, grupo treinado com EPO.

## 7 DISCUSSÃO

Os animais tiveram um crescente ganho de massa corporal ao longo das oito semanas de protocolos, que foram estatisticamente diferentes comparados com a semana basal. Esse comportamento é esperável visto que o protocolo foi iniciado na idade adulta dos animais (seis semanas de vida) e eles continuaram evoluindo quanto à massa corporal, seguindo uma curva de crescimento somático ao longo das semanas (BOLAÑOS, ARRUDA, 2009).

Apesar do GCT e GET se mostrarem com valores abaixo dos GCS e GES, não foi significativo, e isso pode ter acontecido por uma mudança na composição corporal dos animais, já que não houve uma distinção entre massa gorda e massa muscular magra, além de que também não se avaliou o consumo alimentar.

É importante controlar a massa corporal dos animais a cada semana para, primeiro, comprovar que a amostra é homogênea e que não houve nenhuma discrepância que poderia interferir nas variáveis analisadas do controle do sistema

cardiovascular; e segundo, para confirmar que a intensidade de treinamento foi alterada a cada semana, já que era relativa à massa corporal dos animais.

Como os valores hematológicos e bioquímicos podem variar entre linhagens, espécies e métodos de coleta de sangue, temos como valores de referência o estudo de Melo et al. (2012) dos animais do biotério central da Universidade de Sergipe e de Branco et al. (2011) dos animais do biotério da Universidade Federal da Paraíba. Nossos resultados foram maiores nas variáveis de hemoglobina, hemácias e hematócitos com a administração de EPO exógena. Assim, comprovamos que a dose de 50 UI/kg por massa corporal foi significativo para gerar esses aumentos, o que era de se esperar pela sua função de estimular a eritropoiese.

Valores de VCM e HCM não tiveram diferença com a administração da rHuEPO mostrando que o análogo deste hormônio não interfere, respectivamente, no tamanho das hemácias (utilizado principalmente para diagnóstico de anemia), tampouco no peso da hemoglobina na hemácia.

O GCT apresentou uma bradicardia de repouso mais pronunciada comparado com o GCS, confirmando dessa forma, como sendo um importante marcador de adaptação ao treinamento físico no sistema cardiovascular, mostrando assim, a efetividade do protocolo de treinamento físico utilizado em nosso estudo (De ANGELIS et al., 2004; EVANGELISTA; BRUM; KRIEGER, 2003). O GET mostrou uma tendência de queda na FC basal comparado com o GES, mas não foi significativo. Esses dados são apoiados pelo aumento do IP mostrados na tabela 2 da VFC, também significativo apenas na comparação GCT com GCS. Além disso, a bradicardia pode ser explicada pelo aumento do índice HF, que é o componente espectral modulado pelo SNP, ou seja, se ele está aumentado, significa uma maior modulação vagal, o que poderia explicar a queda da FC basal (CERUTTI, et al., 1991). Percebe-se uma diminuição do TS do GCT em comparação com o GCS, mostrando menor atividade simpática no controle autonômico cardíaco (ABREU, et al., 2009).

Ainda sobre a adaptação ao treinamento físico, o GCT mostrou uma maior hipertrofia cardíaca comparado com o GCS, comprovada pela massa cardíaca relativa. Estudos já demonstraram que o treinamento de natação aumenta essa razão (massa cardíaca/massa corporal) em até 31% em roedores (SCHAIBLE; SCHEUER, 1981). Essa hipertrofia ocorre devido à sobrecarga de volume cardíaco,

ou seja, aumento da pré-carga advinda do aumento do retorno venoso durante as sessões crônicas de exercício físico, induzindo assim o crescimento dos miócitos.

No protocolo utilizado de natação, a hipertrofia está relacionada com a adição em séries de sarcômeros e conseqüente aumento em seu comprimento, caracterizando-a de forma excêntrica (MEDEIROS, et al., 2004 e MAGALHÃES, et al., 2008), o que foi comprovado pelo aumento observado no diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos no GCT em relação ao GCS.

Não observamos diferenças na PAD nos grupos que receberam rHuEPO comparado com os grupos controles, explicado pelo menor valor de LF da variabilidade da PAD encontrado no GET comparado com o GCT, ou seja, uma menor modulação simpática, já que esse componente espectral coincide com as ondas lentas da PA e tem sido postulado como marcador indireto da atividade simpática vasomotora periférica modulada pela alça barorreflexa arterial (SILVA; JANUÁRIO, 2005), podendo assim ter diminuído a resistência vascular periférica. A PAM não apresentou diferenças significativas, pois essa variável é de valor e aplicação clínica, além de estar bem relacionada com a PAD.

Em contrapartida, o GES apresentou maiores valores na PAS comparado com o GCS, o que pode ser explicado pelo aumento da viscosidade sanguínea observada em nosso estudo e a perda de vasodilatação induzida pela hipóxia causada pelo uso da rHuEPO, sendo, portanto, um dos principais fatores deletérios do uso desse análogo. Esse resultado corrobora com o que já está bem estabelecido na literatura (NONNAST-DANIEL, et al., 1988; SCHAEFER, et al., 1988), inclusive de ser um fator limitante de tratamento crônico com rHuEPO (VAZIRI, 1999).

Além disso, em micro vasos pode ocorrer a estagnação do sangue por essa viscosidade aumentada, o que aumenta o risco de infarto do miocárdio, convulsões, eventos tromboembólicos periféricos e embolia pulmonar (PETERS; SCHULZ; MICHNA, 2002). Os valores de PAS no GET não foram significativamente menores do que no GES, mostrando que a magnitude de redução da PA promovida pelo treinamento físico depende do grau da hipertensão, o que está de acordo com resultados obtidos em humanos (BERMUDES, et al., 2004 e FORJAZ, et al., 2000) e em modelos animais (GOESSLER, et al., 2015).

A massa relativa cardíaca foi menor no GET comparado com o GCT, ou seja, o treinamento físico não conseguiu desenvolver uma hipertrofia excêntrica, causada

por sobrecarga de volume, possivelmente pelo aumento da viscosidade do sangue, conseqüentemente, aumento da resistência vascular periférica, reduzindo o retorno venoso para o coração. Em contrapartida, o GES mostrou um aumento do diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos comparados com o GCS, demonstrando uma hipertrofia ventricular, o que também pode ser explicado pela hiperviscosidade, em uma tentativa de garantir uma adequada circulação periférica (PILOTO, et al., 2009).

Apesar da rHuEPO ter causado um aumento da PAS no GES, os dados da sensibilidade barorreflexa cardíaca, independente da dosagem das drogas FEN e NPS, não foram alterados. Ou seja, a EPO exógena parece não interferir no controle reflexo da PA e, o aumento da PAS pelo aumento da viscosidade sanguínea não foi suficiente para provocar alterações nesses mecanismos.

Os resultados mais interessantes do trabalho são: o aumento do efeito vagal para os grupos que receberam rHuEPO comparado com os grupos controles; o TV aumentado no GET comparado com o GCT; e a diminuição do ISV nos GES e GET comparados com seus respectivos grupos controles. O ISV é dado pela razão entre a FC basal e a FIMC que permite avaliar o balanço do TS e TV cardíaco, como proposto por Goldberger (1999). Nesse sentido, os valores maiores que 1 no ISV refletem predomínio simpático, enquanto que valores menores que 1, predomínio vagal. Nossos dados mostraram uma diminuição da hiperatividade simpática sobre o coração nos grupos que receberam rHuEPO e, além disso, um aumento da ação parassimpática sobre o coração.

Uma possível especulação para explicar esses fenômenos pode ser o excesso de fibrose encontrado no coração desses animais. Ambos os grupos GES e GET apresentaram maiores porcentagens de áreas com fibroses comparadas com os grupos controles. O miocárdio está disposto em feixes e camadas de estrutura complexa com íntima relação com o tecido conectivo e com grande número de capilares. Esse tecido conectivo é rico em fibroblastos e, juntamente com os cardiomiócitos, formam extensas redes no coração (EYNARD; VALENTICH; ROVASIO, 2011). Os cardiomiócitos possuem EpoR's (VAN DER MEER, et al., 2005) e, quando ativados, exercem função antiapoptótica, anti-inflamatória, pró-regenerativa, pró-angiogênese e de diferenciação celular (JOHNSON, et al., 2006). A expressão de EpoR's é maior nos fibroblastos cardíacos do que nos miócitos, sugerindo maior participação na modulação desse tecido aos efeitos da EPO (PARSA, et al., 2004), assim, o aumento da fibrose nos grupos que receberam

rHuEPO pode ser explicado por uma estimulação dos EpoR's dos fibroblastos presentes no coração, levando à remodelação desse tecido (GOBE, et al., 2013). A EPO funcionou como estímulo, (assim como lesão do miocárdio, estresse oxidativo, alongamento mecânico e inflamação) para proliferação, migração e diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, que produzem fatores de crescimento, citocinas, proteases e matrix extracelular, desempenhando um papel fundamental no processo de fibrose (YUE; XIE; NATTEL, 2011).

Acrescido a essa explicação, é visto que os fibroblastos são capazes de se acoplarem eletricamente com os cardiomiócitos (CAMELLITI, et al., 2004) produzindo uma variedade de mudanças em suas propriedades de potencial de ação (KOHL; NOBLE, 1996; FAHRENBACH; MEJIA-ALVAREZ; BANACH, 2007). Fibroblastos modulam a atividade elétrica dos cardiomiócitos por despolarização ou hiperpolarização dependendo dos valores relativos e de potencial de membrana dessas células (YUE; XIE; NATTEL, 2011). A modulação da atividade elétrica dos cardiomiócitos pelos fibroblastos ainda é desconhecida em modelos *in vivo*, embora o grande número de fibroblastos presentes no nó sinoatrial sugere-se que sejam importantes na regulação da atividade do marcapasso cardíaco (SHIRAISHI, et al., 1992; CAMELLITI, et al., 2004).

Esses resultados explicam o aumento da FIMC encontrado no GES comparado com o GCS, ou seja, a rHuEPO causou uma fibrose tecidual que possivelmente afetou a atividade elétrica do coração. Estudos já demonstraram que a fibrose prejudica a propagação dos impulsos elétricos cardíacos por uma redução do acoplamento de célula-a-célula e exercem um papel importante no desenvolvimento de arritmias cardíacas como fibrilação e taquicardia ventricular (YUE; XIE; NATTEL, 2011).

No GET era esperado o aumento do TV comparado com os grupos sedentários, apesar de não ser significativo, mostrando uma adaptação do treinamento físico no aumento da ação parassimpática sobre o coração (MEDEIROS, et al., 2004), porém, esse aumento por ter sido significativamente maior no GET comparado com o GCT pode ser explicado por uma ação protetora, na qual o organismo aumenta a ação parassimpática sobre o coração tentando compensar essa disfunção na FIMC causada pela fibrose.

Por fim, também são encontrados EpoR's em epitélio tubulares proximais dos rins (JOHNSON, et al., 2006) e a rHuEPO pode promover proliferação dessas

células, melhorando danos agudos nessa região, porém depois de 28 dias pós-isquemia-reperfusão com EPO constatou-se significativo aumento na fibrose intersticial, assim, a EPO pode causar a citoproteção do epitélio tubular, mas também pode contribuir para estimular a fibrose intersticial (GOBE, et al., 2008). Dados que foram corroborados com nosso estudo, no qual a fibrose renal foi aumentada no GES e exacerbada no GET comparados com os grupos controles.

## 8 CONCLUSÃO

A rHuEPO causou um aumento na PAS devido à hiperviscosidade sanguínea e o treinamento físico não foi capaz de atenuar esse aumento. Não houve hiperatividade simpática nem alteração na sensibilidade dos barorreceptores periféricos. Pelo contrário, uma diminuição no componente LF da VPAD, comprova uma menor modulação simpática vasomotora, na tentativa de diminuir a resistência vascular periférica. Esta que, por sua vez, impediu o GET de desenvolver hipertrofia fisiológica e causou, em contrapartida, hipertrofia cardíaca no GES na tentativa de manter o fluxo para a periferia.

Além disso, a rHuEPO teve ação em receptores dos fibroblastos cardíacos e renais, estimulando a proliferação e migração dessas células que são responsáveis pelo processo de fibrose. No coração, essa situação possivelmente causou um aumento da FIMC por afetar a atividade elétrica dos cardiomiócitos e na propagação desses impulsos elétricos, assim, na tentativa de proteger e reverter esse quadro teve-se o aumento da ação parassimpática sobre o coração.

Por conseguinte, nós concluímos que a rHuEPO gerou uma alteração autonômica cardíaca, teoricamente, cardioprotetora, porém, acrescida de uma situação de fibrose não benéfica, logo, o uso do análogo da EPO deve-se levar em consideração a soma de vários fatores que estão envolvidos em sua ação, mesmo porque, agravando a situação, o treinamento físico não foi capaz de reverter nenhuma alteração causada pela EPO.

Nesse sentido, mesmo a EPO tendo um potencial efeito ergogênico de aumentar o aporte de oxigênio ao tecido muscular, (inclusive ser proibida pelo COI por ser considerada *doping*, uma vez que melhora o desempenho em alguns esportes), seu uso gera alguns efeitos adversos, estando eles relacionados com o aumento da viscosidade sanguínea, consequente elevação dos hematócritos,

podendo desenvolver uma hipertensão arterial, complicações tromboembólicas, hipertrofia ventricular, modificações deletérias cardiovasculares, aumentando consideravelmente o risco de morte súbita no esporte.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, S. B. de; LENHARD, A.; MEHANNA, A.; SOUZA, H. C. de; CORREA, F. M.; HASSER, E. M.; et al. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. **Auton Neurosci**; 148: 28-35. 2009.
- ADAMSON, J. W. Regulation of red blood cell production. **Am. J. Med**; 101: S4-6, 1996.
- AIRES, M. M.; **Fisiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 3 ed. New York: Garland Publishing, 1994.
- ALBUQUERQUE, N. M. T. P. de. **A utilização da rHuEPO no doping**: Estudo dos efeitos cardiovasculares e metabólicos em ratos submetidos a exercício físico. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra. 2009. 253 f.
- ANGELIS, K. de; WICHI, R.B.; JESUS, W.R.; MOREIRA, E.D.; MORRIS, M.; KRIEGER, E.M. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **Journal of Applied Physiology**, 96: 2174-2178. 2004.
- ANTUNES, V. R.; BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B. H.; Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats. **Brain Research**. p. 85-93, 2005.
- ARAÚJO, C. G. S. Fisiologia do exercício físico e hipertensão arterial: Uma breve introdução. **Rev Hipert.**; 4, 2001.
- AUBERT, A. E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart rate variability in athletes. **Sports Med.**; 33(12):889-919, 2003.
- BAHLMANN, F. H.; FLISER, D. Erythropoietin and renoprotection. **Hypertension**, n. 18, p. 15-20, 2009.
- BARBER, D. L.; BEATTIE, B. K.; MASON, J. M.; et al. A common epitope is shared by activated signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) and the phosphorylated erythropoietin receptor: implications for the docking model of STAT activation. **Blood**; 97:2230-7, 2001.
- BEMBEN, M. G.; LAMONT, H. S. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. **Sports Med.**; 35(2): 107-25, 2005.
- BENTO, R. M. A. de; DAMASCENO, L. M. P; NETO, F. R. A. de. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. **Rev. Bras. Med. Esporte**; V. 9, nº 3; Mai/Jun, 2003.
- BERMUDES, A.M.; VASSALLO, D.V.; VASQUEZ, E.C.; LIMA, E.G. Ambulatory blood pressure monitoring in normotensive individuals undergoing two single

exercise sessions: resistive exercise training and aerobic exercise training. **Arq Bras Cardiol.**;82:65-71; 57-64. 2004.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BOLAÑOS, M. A. C.; ARRUDA, M. de. Velocidade de crescimento a partir do peso corporal de ratos machos wistar. **Rev. Bras. de Obes., Nutrição e Emag**; V.3, nº 18, 478-484, 2009.

BRANCO, A.C.S.C.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N.de; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, K.M.de; RAMALHO, J.A.; DANTAS, J.G. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Rev. Bras. De Ciência da Saúde**; V. 15, nº 2; 209-214, 2011.

BRINES, M.; CERAMI, A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. **Kidney Int.**; 70:246–50, 2006

BROXMEYER, H. E. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. **J. Exp. Med.**; 210:205–8, 2013.

BROXMEYER, H. E. Erythropoietin surprises: an immune saga. **Immunity**; 34:6–7, 2011.

BRUM, P.C.; SILVA, G.J.J.da; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Exercise Training Increases Baroreceptor Gain Sensitivity in Normal and Hypertensive Rats. **Hypertension**; 36: 1018-1022, 2000.

CAMBRI, L. T.; FRONCHETTI, L.; OLIVEIRA, F. R. de; GEVAERD, M. S. da. Variabilidade da frequência cardíaca e controle metabólico. **Arq. Sanny Pesq. Saúde**. 1(1):72-82, 2008.

CAMELLITI, P.; GREEN, C. R.; LEGRICE, I.; KOHL, P. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. **Circ Res.**; 94:828–835. 2004.

CARUANA-MONTALDO, B.; GLEESON, K.; ZWILLICH, C. W. The control of breathing in clinical practice. **Chest.**;117(1):205-25, 2000.

CARPENTER, J. W. Formulário de Animais Exóticos, 3ª Ed., São Paulo: MedVet, 2010, 578p.

CATAI, A. M.; CHACHON-MIKAHIL, M. P.; MARTINELLI, F. S.; FORTI, V. A.; SILVA, E.; GOLFETTI, R.; et al. Effects of aerobic exercise training on heart rate variability during wakefulness and sleep an cardiorespiratory responses of young an middle-aged healthy men. **Braz. J. Med. Biol. Res.**; 35(6):741-52, 2002.

CERUTTI, C.; GUSTIN, M. P.; PAULTRE, C, Z.; LO, M.; JULIEN, C.; VINCENT, M.; et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. **Am J Physiol**; 261: H1292-H1299. 1991

CHANG, C.; CHEN, Y.; MODI, K.; AWAR, O.; ALFREY, C.; RICE, L. Changes of red blood cell surface markers in a blood doping model of neocytolysis. **J. Investig. Med.**; 57, 650–654, 2009.

CHARKOUDIAN, N.; WALLIN, B.G. Sympathetic Neural Activity to the Cardiovascular System: Integrator of Systemic Physiology and Interindividual Characteristics. **Comprehensive Physiology**; v. 4, p. 827-850, 2014.

CHIA, C. Y.; LEONE, C. R. Eritropoetina Recombinante Humana na Anemia da Prematuridade. **Pediatria**; v. 17, n. 4, p. 174-190, 1995.

CHOI, D.; KIM, M.; PARK, J. Erythropoietin: physico and biochemical analysis. **J. Chromatogr. B.**; 687:189-99, 1996.

COLEMAN, T.; BRINES, M. Science review: recombinant human erythropoietin in critical illness: a role beyond anemia? **Crit Care.**; 8(5):337-41. 2004.

CONSTANTINESCU, S. N.; GHAFARI, S.; LODISH, H. F.; The erythropoietin receptor: structure activation and intracellular signal transduction. **Trends. Endocrinol. Metab.**; 10: 18-23, 1999.

CONSTANTINESCU, S. N.; HUANG, L. J.; NAM, H.; LODISH, H. F.; The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. **Mol. Cell.**; 7:377–85, 2001.

CRUZ, A. M. da. Resistência Aeróbica e Eritropoetina. **Estudos**, Goiânia, v.33, n.7/8 p.553-572, jul/ago, 2006.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**; (74):323-364, 1994.

DI DIO, L. J. A. **Tratado de Anatomia Sistêmica Aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2002. V.2.

EHRENREICH, H. et al. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. **Metab. Brain Dis.**, n. 3/4, v.19, dec, 2004.

EKBLOM, B. T. Erythropoietin. Em: Bahrke, M. S.; Yesalis, C. E.; Performance-enhancing substances in sport and exercise. USA: **Hum. Kin.**; 101-7, 2002.

ENGERT, A. Recombinant human erythropoietin in oncology: current status and further developments. **Annals of Oncol.**; n. 16, p. 1584-1595, 2005.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36: 1751-1759. 2003.

EYNARD, A.R.; VALENTICH, M.A.; ROVASIO, R.A. Histologia e embriologia humanas: bases celulares e moleculares. 4ª ed. São Paulo: ArtMed Editora S.A, 2011.

FAHRENBACH, J. P.; MEJIA-ALVAREZ, R.; BANACH, K. The relevance of non-excitabile cells for cardiac pacemaker function. **J Physiol.**; 585:565–578. 2007.

FELDMAN, L.; SYTKOWSKI, A. Pleiotrophic actions of erythropoietin. **Environm. Health and Prev. Med.**; v. 7, p. 239-245, 2003.

FLORAS, J.S.; HASSAN, M.O.; JONES, J.V., et al. Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. **J Hypertens** 6: 525-35, 1988.

FORJAZ, C. L.; TINUCCI, T.; ORTEGA, K. C.; SANTAELLA, D. F.; MION, D.; Jr., NEGRAO, C. E. Factors affecting post-exercise hypotension in normotensive and hypertensive humans. **Blood Press Monit.**;5:255-62. 2000.

FURLANI, D.; KLOPSCH, C.; GABEL, R.; UGURLUCAN, M.; PITTERMANN, E.; KLEE, D.; WAGNER, K.; LI, W.; WANG, W.; ONG, L.L.; NIZZE, H.; TITZE, U.; LUTZOW, K.; LENDLEIN, A.; STEINHOFF, G.; MA, N. Intracardiac Erythropoietin Injection Reveals Antiinflammatory Potential and Improved Cardiac Functions Detected by Forced Swim Test. **Transp. Proc.**; 40, 962-966, 2008.

GAMELIN, F. X.; BERTHOIN, S.; BOSQUET, L. Validity of the polar S810 heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. **Med. Sci. Sports. Exerc.**; 38(5):887-93, 2006.

GARCIA, J. M. J.; SÁNCHEZ, E. T.; HIDALGO, D. O.; CONEJO, E. A. Erythropoietin pharmacology. **Clin. and Trans. Oncol.**; v. 9, p. 715-722, 2007.

GOBATTO, C. A.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; LUCIANO, E; KOLUBUN, E.; MELLO, M. A. R. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos Wistar. **Motriz**; n. 7, v. 1, p. S57-S62, 2001.

GOBE, G.C.; VESEY, D.A.; BENNETT, N.; JOHNSON, D.W. Recombinant human erythropoietin reduces ischemic acute kidney injury but does not stop progression to chronic kidney disease. **Nephrology (Carlton)**;13 (3):A135 (Abstr). 2008.

GOBE, G.C.; MORAIS, C.; VESEY, D.A.; JOHNSON, D.W. Use of high-dose erythropoietin for repair after injury: A comparison of outcomes in heart and kidney. **J Nephropathology**; 2(3):154-165, 2013.

GODOY, M. F.; TAKAKURA, I. T.; CORREA, P. R. Relevância da análise do comportamento dinâmico não-linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. **Arq. Ciênc. Saúde**; 12(4):167-71, 2005.

GOESSLER, K. F.; MARTINS-PINGE, M. C.; CUNHA, N. V. da; KARLEN-AMARANTE, M.; POLITO, M. D. Efeitos do treinamento físico sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e morfologia cardíaca de ratos hipertensos. **Med. (Rib. Preto)**; 48 (1): 87-98, 2015.

GOLDBERGER, J.J.; Sympathovagal balance: how should we measure it? *Am. J. Physiol.* 1999. 276, H1273-1280

GOMES, O. M. **Fisiologia cardiovascular aplicada**. 1ª ed. Belo Horizonte: Edicor, 2005.

GRANATA, A. R.; RUGGIERO, D. A.; PARK, D. H.; JOH, T. H.; REIS, D. J. Lesions of epinephrine neurons in the rostral ventrolateral central nervous system and aerobic exercise training medulla abolish the vasodepressor components baroreflex and cardiopulmonary reflex. **Hypertension**; (5):V80-V84, 1983.

GUERTZENSTEIN, P. G. Vasodepressor and pressor responses to drugs topically applied to the ventral surface of the brain stem. **J. Physiol.**; (224): 84-85, 1972.

GUERTZENSTEIN, P. G.; SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **J. Physiol.**; (242): 489-503, 1974.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

HAND, C. C.; BRINES, M. Promises and pitfalls in erythropoietin-mediated tissue protection: are nonerythropoietic derivatives a way forward? **J. Investig. Med.**; 59:1073–82, 2011.

HARDEE, M. E. et al. Erythropoietin biology in cancer. **Clinic. Cancer Res.**; n. 12, v. 2, 2006.

HELSTENSON, C. E.; MACRES, M.; KATZ, A. S.; SCHNIEDERS, J. R.; WATANABE, M.; SOBOTA, J. T.; et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. **Clin. Pharmacol. Ther.**; 50:702-12, 1991.

IRIGOYEN M. C.; ANGELIS K. D.; SCHAAN B. D. A.; FIORINO P.; MICHELINI L. C.; Exercício físico na diabetes mellitus associado à hipertensão arterial sistêmica. **Rev. Bras. Hipertens.**; 10: 109-17,2003.

IRIGOYEN M. C.; CONSOLIN-COLOMBO, F.M.; KRIEGER, E.M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev. Bras. Hipertens.**; v. 8: 55-62, 2001.

IRIGOYEN, M.C.C.; KRIEGER, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz J Med Biol Res** 31: 1213-20, 1998.

JAMES, A. F.; CHOISY, S. C.; HANCOX, J. C. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**; 94(3):265-319, 2007.

JELKMANN, W.; PETERS, C.; SCHULZ, T.; MICHNA, H. Biomedical side effects of doping. Project European Union. 2002; 6: 35-42.

JOHNSON, D.W.; PAT. B.; VESEY. D. A.; GUAN. Z.; ENDRE, Z.; GOBE. G.C.; Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure. **Kidney Int.**; 69(10):1806-13. 2006.

JOYEUX-FAURE, M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? **Perspec. in Pharm.**; n. 3, v. 323, p. 759-762, 2007.

KAGAYA, Y.; ASAUMI, Y.; WANG, W. et. al. Current perspectives on protective roles of erythropoietin in cardiovascular system: erythropoietin receptor as a novel therapeutic target. **Tohoku J. Exp. Med.**; 227:83–91, 2012.

KANSTRUP, Y.; EKBLUM, B. Blood volume and hemoglobin concentration as determinants of maximal aerobic power. **Med. Sci. Sports Exerc.**; 16:256-62, 1984

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica & Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KENNEY, W. L.; MUNCE, T. A. Invites review: aging and human temperature regulation. **J. Appl. Physiol.**; (95): 2598-2603, 2003.

KLEIGER, R. E.; STEIN, P. K.; BOSNER, M. S.; ROTTMAN, J. N. Time-Domain Measurements of Heart Rate Variability, Em: Heart Rate Variability, Malik, M.; Camm, A. J., New York: **Futura**, pp. 33-45, 1995.

KLINGMÜLLER, K.; LORENS, U.; CANTLEY, L. C.; NEEL, B. G.; LODISH, H. F. Specific recruitment of the hematopoietic protein tyrosine phosphatase SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. **Cell**, 80, 729–738, 1995.

KLINGMÜLLER, U. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells—signals emanating from the erythropoietin receptor. **Eur. J. Biochem.**; 249:637–41, 1997.

KRIEGER, E. M.; SILVA, G. J. J.; NEGRÃO, C. E. Effects of exercise training on baroreflex control of the cardiovascular system. **Ann NYork Acad Sci**, v. 940, p. 338–347, 2001.

KOHL, P.; NOBLE, D. Mechanosensitive connective tissue: potential influence on heart rhythm. **Cardiovasc Res.**; 32:62–68. 1996.

LACOMBE, C.; MAYEX, P. Biology of erythropoietin. **Haematologica**; 83:724-732, 1998.

LAMON S.; RUSSEL, A. P. The role and the regulation of erythropoietin (EPO) and its receptor in skeletal muscle: how much do we really know?. **Front. in Physiol.**; V. 4, article 176, 2013.

LANCHA JÚNIOR, A. H. **Resistência ao esforço físico**: efeito da suplementação nutricional de carnitina, aspartato e asparagina. 1991. F. 80. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LEBEL, M.; KINGMA, I.; GROSE, J. H.; LANGLOIS, S. Hemodynamic and Hormonal Changes During Erythropoietin Therapy in Hemodialysis Patients. **J. of the Am. Soc. of Neph.**; 1046-6673/0901-0097, 1997.

LOGIER, R.; JONCKHEERE, J.; DASSONNEVILLE, A. An efficient algorithm for R-R intervals series filtering. **Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.**;6:3937-40, 2004.

LOHMEYER, J. A.; et al. Use of Erythropoietin as adjuvant therapy in nerve reconstruction. **Lang. Arch. of Surg.**; n. 393, p.317-323, 2008.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia**: Propedêutica e Clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.

LUNDBY, C.; THOMSEN, J. J.; BOUSHEL, R.; KOSKOLOU, M.; WARBERG, J.; CALBET, J. A. L.; ROBACH, P. Erythropoietin treatment elevates haemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume. **J. Physiol.**; 578, 309–314, 2007.

LUNDBY, C.; ACHMAN-ANDERSEN, N. J.; THOMSEN, J. J.; NORGAARD, A. M.; ROBACH, P. Testing for recombinant human erythropoietin in urine: problems associated with current anti-doping testing. **J. Appl. Physiol.**; 105, 417–419, 2008.

LUNDBY, C.; OLSEN, N. V. Effect of recombinant human erythropoietin in normal humans. **J. of Physiol.**; 589.6: 1265-1271, 2011.

MAIESE, K.; CHONG, Z. Z.; SHANG, Y. C. Raves and risks for erythropoietin. **Cytok. Growth Factor Rev.**; v. 19, p. 145-155, 2008.

MAGALHÃES, F. C. de; BARRETTI, D.; HASHIMOTO, N.; MELO, S. F. S.; ROQUE, F. R.; OLIVEIRA, E. M. de. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. **Rev. Mackenzie de Ed. Fís. e Esp.**; 7 (1): 189-193, 2008.

MALIK, M.; BIGGER, J. T.; CAMM, A. J.; et al. Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use. **Europ. Heart J.**; 17:354-381, 1996.

MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; CERUTTI, S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**; 84(2):482-92, 1991.

MANCIA, G.; GRASSI, G.; FERRARI, A.U.; Reflex control of circulation in experimental and human hypertension. In: Zanchetti A, Mancia G (eds.). Handbook of Hypertension, 17: **Pathophysiology of Hypertension**. Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science Publishers B.V., 568-601,1997.

MARTELLI, A. Eritropoetina: síntese e liberação fisiológica e o uso de sua forma recombinante no esporte. **Persp. Online: Biol. & Saúde**; 10 (3), 24-34, 2013.

MCALLEN, R. M.; SPYER, K. M. The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. **J. Physiol.**; 258: 187-204, 1976.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho Humano**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **J. of Med. and Biol. Res.**; 37: 1909-1917, 2004.

MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**; V. 8; Nº 4. 2012.

MEZIRI, F.; BLINDA, D.; TOUATI, S.; PELLEGRIN, M.; BERTHELOT, A.; TOURYZ, R.M.; LAURANT, P. Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. **Eur. J. Appl. Physiol.**; Aug; 111 (8): 1929-38, 2011.

MOSS, D.; SHAFFER, F. Heart Rate Variability Training. **Biofeedback Foundation of Europe**. Holanda, 2009. Disponível em: <<http://www.bfe.org/articles/hrv.pdf>>. Acesso em: 10 de set. de 2015.

MOSTARDA, C.T.; RODRIGUES, B.; MORAES, O. A. de; MORAES-SILVA, I.C.; ARRUDA, P.B.O.; CARDOSO, R.; SCAPINI, K.B.; SANTOS, F. dos; ANGELIS, K. de; IRIGOYEN, M.C. Low intensity resistance training improves systolic function and cardiovascular autonomic control in diabetic rats. **J. of Diabetes and its complications**; (28): 273-278, 2014.

NAIRZ, M.; SCHROLL, A.; MOSCHEN, A. R.; et al. Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways. **Immunity**; 34:61–74, 2011.

NAJJAR, S. S.; RAO, S. V.; MELLONI, C.; et al. Intravenous erythropoietin in patients with STsegment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. **JAMA**; 305:1863–72, 2011.

NASSER, M. G.; RUSHMER, R. F.; SAUNDERS, W. B. Regulation of coronary flow-in. **Cardiovasc. Dynam.** 3 ed. Philadelphia, 1970.

NONNAST-DANIEL, B.; CREUTZIG, A.; KUHN, K.; BAHLMANN, J.; REIMERS, E.; BRUNKHORST, R.; CASPARY, L.; KOCH, K. M. Effect of treatment with

recombinant human erythropoietin on peripheral hemodynamics and oxygenation. **Contrib. Nephrol.** 66, 185-194. 1988.

NOVAIS, L. D.; SAKABE, D. I.; TAKAHASHI, A. C. M.; GONGORA, H.; TACIRO, C.; MARTINS, L. E. B.; et al. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis sedentários e de hipertensos e coronariopatas em treinamento físico. **Rev. Bras. Fisioter.**; 8(3):207-13, 2004.

OLIVEIRA, M. A. B. Doping e coração. **Rev. SOCERJ.**; 13:53-60, 2000.

OLSEN, N. V.; AACHMANN-ANDERSEN, N. J.; OTURAI, P.; ANDERSEN, T. M.; RASMUSSEN, A. B.; HULSTON, C.; HOLSTEIN-RATHLOU, N. H.; ROBACH, P.; LUNDBY, C. Recombinant human erythropoietin in humans down-regulates proximal renal tubular reabsorption and causes a fall in glomerular filtration rate. **J. Physiol.**; 589, 1273–1281, 2010.

OZAWA, C. M.; SAKABE, D.; BERTOLLI, E.; MANTOVANI, L. F. A. L.; CHADE, M. C.; GOZZANO, J. O. A. Tratamento da anemia com eritropoetina recombinante humana em pacientes hemodialisados. *Rev. da Facul. de Ciênc. Méd. de Sorocaba*; v. 4, n. 1-2, p. 31-37, 2002.

PAIVA, F. P. de; MAFFILI, V. P.; SANTOS, A. C. S. Curso de Manipulação de animais de Laboratório, Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, 2005, 28p.

PAIXÃO, A. D. O.; SCHOR, N. Efeitos da eritropoetina na hemodinâmica renal. **J. Bras. Nefrol.**; v. 19, n. 2, p. 162-168, 1997.

PARDOS, C. L.; GALLEGO, V. P.; MAYOR, M. J. R. de; MARTÍN, A. V. Doping sanguíneo e eritropoetina. **Arch. de Med. del Dep.**; 64:145-8, 1998.

PARSA, C. J.; KIM, J.; RIEL, R. U.; PASCAL, L. S.; THOMPSON, R. B.; PETROFSKU, J. A.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J. S.; KOCH, W. J. Cardioprotective Effects of Erythropoietin in the Reperfused Ischemic Heart: a potential role for cardiac fibroblasts. **The J. of Biolog. Chem.**; V.279, Nº 20, p. 20655-20662, 2004.

PETERS, C.; SCHULZ, T.; MICHNA, H. Biomedical Side Effects of Doping. Project of the European Union. **Verlag Sport und BUCH Strauß**, Köln. 2002.

PILOTO, N.; TEIXEIRA, H. M.; LEMOS, E. T. et. al. Erythropoietin Promotes Deleterious Cardiovascular Effects and Mortality Risk in a Rat Model of Chronic Sports Doping. **Cardiovasc. Toxicol.**; 9:201-210, 2009.

PINGE, M. C. M. Cardiovascular and autonomic modulation by the central nervous system after aerobic exercise training. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.*; (44): 848-854, 2011.

PUMPRLA, J.; HOWORKA, K.; GROVES, D.; CHESTER, M.; NOLAN, J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **Int. J. Cardiol.**; 84(1):1-14, 2002.

RAJENDRA, A. U.; PAUL, J. K.; KANNATHAL, N.; LIM, C. M.; SURI, J. S. Heart rate variability: a review. **Med. Bio. Eng. Comput.**; 44(12):1031-51, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RASSI JUNIOR, A. Compreendendo melhor as medidas de análise da variabilidade da frequência cardíaca. **J. Diag. Cardiol.**; 8 ed., 2000.

RASSIER, D. E.; NATALI, A. J.; DE ROSE, E. H. Eritrocitemia induzida e dosagem sanguínea. **Rev. Bras. Med. Esp.**; 1:11-5, 1995.

RASSIER, D. J. E.; DE ROSE, E. H. Eritropoietina e exercício físico. **Movimento**; 4, 1996.

RAY, C. A.; REA, R. F.; CLARY, M. P.; et al.: Muscle sympathetic nerve response to dynamics one-legged exercise: Effect of body posture. **Am. J. Physiol.**; 264: H1-H7, 1993.

**Recormon**<sup>®</sup> (betaepoetina). Rio de Janeiro: Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., 2014. Bula de remédio.

REIS, F.; BASTOS, G.; MESQUITA, T.; ROMEU, L.; NOBREGA, L. Disfunção parassimpática, variabilidade da frequência cardíaca e estimulação colinérgica após enfarto agudo do miocárdio. **Arq. Bras. de Card.**; 70 (3), 1998.

REMY, I.; WILSON, I. A.; MICHNICK, S. W. Erythropoietin receptor activation by a ligand induced conformation change. **Science**; 283:990–3, 1999.

RENDIC, S. Human recombinant erythropoietin (rHuEPO) – physiology and biochemistry. Em: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis. **Sport und Buch Strauß**; 191-208, 1997.

REZAAE, M. A.; MOALLEM, S. A.; IMENSHAHIDI, M.; FARZADNIA, M.; MOHAMMADPOUR, A. H. Effects of erythropoietin on electrocardiogram changes in carbon monoxide poisoning: an experimental study in rats. **Iran J. Pharm. Res. Autumn.**; 11 (4): 1191-1199, 2012.

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**. In press 2003.

RIKSEN, N. P.; HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection. **Tren. in Pharm. Scie.** vol. 29; nº 5, 2008.

ROAN, D. Banido do ciclismo por doping, Lance Armstrong diz: “Faria tudo de novo”. **BBCsport-Brasil**, Rio de Janeiro, RJ, 26 jan. 2015. Disponível em: <[http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/01/150126\\_lance\\_armstrong\\_entrevista\\_rm](http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/01/150126_lance_armstrong_entrevista_rm)>. Acesso em: 27 ago. 2015.

ROBERTS, W. Heart rate variability with deep breathing as a clinical test of cardiovagal function. **Clevel. Clinic. J. of Med.**; 76 (Suppl 2), S37-S40, 2009.

ROBERTSON, R. J.; CILCHER, R.; METZ, et al. Hemoglobin concentration and aerobic work capacity in women following induced erythrocythemia. **J. Appl. Physiol.**; 57:568-75, 1984.

ROMÃO JUNIOR, J. E.; ABENSUR, H.; DRAIBE, A. S.; BANDEIRA, F.; RUZZANY, F.; LOWEN, J. et al. Uso da eritropoetina recombinante humana no tratamento da anemia do paciente em hemodiálise: um estudo multicêntrico. **Rev. da Assoc. Méd. Bras.** v. 38, n. 2, p. 57-61, 1992.

RONDON, M. U. P. B; BRUM, P. C. Exercício físico como tratamento não farmacológico da hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**; 10: 134-139, 2003.

ROQUE, J. M. A. **Variabilidade da Frequência Cardíaca**. Trabalho de seminário integrado no plano de estudos (Licenciatura em Educação Física) – Faculdade de Ciência do Desporto e Educação Física, Universidade de Coimbra, Coimbra. 2009.

ROWEL, L. B. Human Circulation: Regulation During Physical Stress. 2<sup>nd</sup> ed.; **Oxford University Press**. 1996.

SAITO, M.; TSUKANAKA, A.; YANAGIHARA, D.; et al.: Muscle sympathetic nerve responses to graded leg cycling. **J. App. Physiol.** 75:663-667, 1993.

SANCHIS-GOMAR, F.; et al. Erythropoietin and the heart: Physiological effects and the therapeutic perspective. **Int. J. Cardiol.**, 2013.

SANTOS, M. D. B.; MORAES, F. R.; MARÃES, V. R. F. S.; SAKABE, D. I.; TAKAHASHI, A. C. M.; OLIVEIRA, L.; et al. Estudo da arritmia sinusal respiratória e da variabilidade da frequência cardíaca de homens jovens e de meia-idade. **Rev. Soc. Cardiol.**; 13(3 supl A): 15-24, 2003.

SCHAEFER, R. M.; LESCHKE, M.; STRAUER, B. E.; HEIDLAND, A. Blood rheology and hypertension in hemodialysis patients treated with erythropoietin. **Am. J. Nephrol.** 8, 449-453. 1988.

SCHAIBLE., T. F.; SCHEUER, J. Cardiac function in hypertrophied hearts from chronically exercised female rats. **Journal of Applied Physiology**, 50: 1140-1145, 1981.

SHEPERD, J.T. Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complex. **J Hypertens** 8 (Suppl 7): S15-S27, 1990.

SHIRAIISHI, I.; TAKAMATSU, T.; MINAMIKAWA, T.; ONOUCHI. Z.; FUJITA S. Quantitative histological analysis of the human sinoatrial node during growth and aging. **Circulation.**; 85:2176–2184. 1992.

- SILVA, V. J. D. da; JANUÁRIO, E. N. Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial na insuficiência cardíaca congestiva. **Rev. Bras. Hipertens.**; 12 (1): 21-26, 2005.
- SILVA, K. A.; LUIZ RDA, S.; RAMPASO, R. R.; ABREU, N. P. de; MOREIRA, E. D.; MOSTARDA, C. T.; et al. Previous exercise training has a beneficial effect on renal and cardiovascular function in a model of diabetes. **PLoS One**, 7(11), e48826, 2012.
- SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 2ª ed. São Paulo: Manole, 2003.
- SOUZA, H. C. D. de; PENTEADO, D. M. D; MARTIN-PINGE, M. C. NETO, O.B; TEIXEIRA, V. P. A.; BLANCO, J. H. D.; SILVA, V. J. D. da. O bloqueio da síntese do óxido nítrico promove aumento da hipertrofia e da fibrose cardíaca em ratos submetidos a treinamento aeróbio. **Arq. Bras. Cardiol.**; V.89 nº 2. São Paulo, Aug, 2007.
- TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH. American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circul.**; 93(5):1043-65, 1996.
- TAUCHI, T.; FENG, G. S.; SHEN, R.; et al. Involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp in erythropoietin receptor signal transduction pathways. **J. Biol. Chem.**; 270:5631–5, 1995.
- TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol. Rev.**; (79): 855-916, 1999.
- THOMPSON, J. M.; STONE, J. A.; GINSBURG, A. D.; et al. Transport during exercise following blood reinfusion. **J. Appl. Physiol.**; 53:1213-9, 1982.
- THOMPSON, P. D. **O Exercício e a cardiologia do esporte**. 1ª ed. Barueri, SP: Manole, 2004.
- THURASINGHAM, R. A. Preprocessing RR interval time series for heart rate variability analysis and estimates of standard deviation of RR intervals. **Comput. Meth. Prog. Biomed.**; 83(1):78-82, 2006.
- TILBROOK, P. A., KLINKEN, S. P. The erythropoietin receptor. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**; 31:1001–5, 1999.
- VAN DER MEER, P.; LIPSIC, E.; HENNING, R. H.; BODDEUS, K.; VAN, dVJ.; VOORS, A. A.; et al. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol.**; 46(1):125-33. 2005.
- VANDERLEI, L. C. M.; PASTRE, C. M.; HOSHI, R. A.; CARVALHO, T. D. de.; GODOY, M. F. de. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev. Bras. Cir. Cardiovas.**; 24(2):205-217, 2009.

VAZIRI, N. D. Mechanism of erythropoietin-induced hypertension. **Am. J. Kidney Dis.** 33, 821-828. 1999.

VOORS, A. A.; BELONJE, A. M.; ZIJLSTRA F. et al. A single dose of erythropoietin in ST elevation myocardial infarction. **Eur. Heart J.**; 31:2593–600, 2010.

WADA. World Anti-Doping Agency. List of prohibited classes of substances and prohibited methods. Desde 1963 pelo International Olympic Committee (IOC). **World Anti-Doping Code**, Montreal, Canada, 2015. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

WESTENBRINK, B. D.; et al. Therapeutic Potential of Erythropoietin in Cardiovascular Disease: erythropoiesis and Beyond. **Cur. Heart Fail. Rep.**; n.4, p. 127-133, 2007.

WILLIAMS, M. H.; WESSELDINE, S.; SOMMA, T.; et al. The effect of induced erythrocythemia upon five-mile treadmill run time. **Med. Sci. Sports Exerc.**; 13:169-75, 1981.

WITTHUHN, B. A.; QUELLE, F. W.; SILVENNOINEN, O.; et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. **Cell**; 74:227–36, 1993.

YOSHIMURA, A.; MISAWA, H. Physiology and function of the erythropoietin receptor. **Curr. Opin. Hematol.**; 5:171–6, 1998.

YOUSSOUFIAN, H.; LONGMORE, G.; NEUMANN, D.; YOSHIMURA, A.; LODISH, H.F. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. **Blood**; 81, 2223–2236, 1993.

YUE, L.; XIE, J.; NATTEL, S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. **Cardiovasc. Reserc.**; 89, 744-753, 2011.

ZANICHELLI, M. A.; FURRER, A. A.; PEREIRA FILHO, T. S.; VAZ, F.A.C. Hematopoese, Fatores de Crescimento e Aplicação Clínica da Eritropoetina na Anemia da Prematuridade. **Pediatria**; v.17, n. 3, p. 124-42, 1995.

ZHANG, Y.; XIONG, Y.; MAHMOOD, A.; et al. Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit. **Brain Res.**; 1294:153–64, 2009.

## APÊNDICE



Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

### Parecer Consubstanciado PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

#### IDENTIFICAÇÃO

**TÍTULO DO PROJETO:** Efeitos da administração crônica de eritropoietina aliado ao treinamento físico sob a função autonômica cardiovascular em ratos Wistar.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto

**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM

**DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM:** 17/10/2014

**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** 335

#### SUMÁRIO DO PROJETO

##### 1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

Geral: Avaliar os efeitos da administração crônica de rHuEPO (eritropoietina recombinante) e sua associação com o treinamento físico na função autonômica cardiovascular em ratos Wistar.

Específicos: Avaliar em ratos Wistar os efeitos da administração de rHuEPO e do treinamento físico sobre:

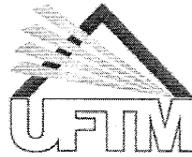
- Peso corpóreo e índice de Lee;
- Parâmetros basais da FC e da PA;
- Modulação autonômica cardiovascular por métodos da variabilidade da FC e da PA;
- Sensibilidade barorreflexa;
- Tônus autonômico cardíaco;
- Massa cardíaca.

##### 2. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos envolvidos na cardioproteção induzida pela rHuEPO estão relacionadas com efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios e angiogênicos. Estudos prévios, sobretudo, evidenciaram que a administração crônica da rHuEPO induziu alterações cardiovasculares, tais como hipertensão arterial e taquicardia em ratos. Não foram encontradas informações referentes a alterações diretas da administração crônica de rHuEPO sobre a função autonômica cardiovascular, bem como os efeitos do treinamento físico sobre essas possíveis alterações em modelos animais.

##### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta ratos Wistar machos de 7 semanas, pesando entre 200g e 250g, provenientes do Biotério Central de Ratos da Universidade de Campinas (UNICAMP), Rua 05 de junho, s/n – CEP.: 13083-877 - Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Campinas/SP. Os animais serão transportados em caixas com tamanho de 41 x 34 x 18 cm contendo maravalha e água suficiente para o número de animais (3-4 por caixas) pelo tempo de viagem ou de acordo com as necessidades dos animais. Os mesmos serão transportados em veículo oficial da UFTM contendo ar condicionado, também estarão devidamente protegidos contra movimentos bruscos. Após a chegada dos respectivos animais ao laboratório de Fisiologia (onde ficarão alojados até o final do protocolo), os mesmos permanecerão por um período de aclimação às novas instalações e a equipe, as condições clínicas serão avaliadas antes do seu uso no projeto. Os animais serão mantidos em 3 a 4 por caixa de 41 x 34 x 18 cm, com maravalha estéril, durante todo o protocolo. As trocas serão realizadas duas vezes por semana e diariamente serão conferidos/repostos água e ração. Serão mantidos em um ciclo claro/escuro



Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

**Parêcer Consubstanciado**  
**PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**

**IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO:** Efeitos da administração crônica de eritropoietina aliado ao treinamento físico sob a função autonômica cardiovascular em ratos Wistar.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto

**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM

**DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM:** 17/10/2014

**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** 335

de 12 horas (7:00/19:00), temperatura mantida por ar condicionado digital a 22°C. As salas de experimentação terão essas mesmas condições.

Após as duas semanas de aclimatação, os animais passarão por um protocolo de treinamento físico de natação por 8 semanas (com exceção dos grupos sedentários) e receberão 50 UI/kg via subcutânea de rHuEPO (Recormon®, Roche Pharmaceuticals) 3 x por semana (segunda, quarta e sexta) (com exceção dos grupos controles), com 5 sessões semanais e duração de uma hora por dia. Assim, os animais serão distribuídos em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento a que serão submetidos: 10 animais do grupo sedentário controle (SC), 10 animais do grupo treinado controle (TC), 10 animais do grupo sedentário eritropoietina (SE) e 10 animais do grupo treinado eritropoietina (TE)

O treinamento será realizado em um tanque de vidro (100 cm x 50 cm x 60 cm), contendo água aquecida à 30°C,  $\pm 1^\circ\text{C}$  a uma profundidade de 40 cm, para evitar que o animal apóie no fundo do tanque com a cauda. O tanque possui divisórias, de modo que cada animal nade em espaços individuais, evitando afogamento por disputa de espaço entre os animais. O protocolo foi delineado de modo para que a primeira semana seja caracterizada como adaptação na qual, no primeiro dia (segunda-feira) os animais nadarão por 10 minutos, no segundo dia (terça-feira) por 20 minutos e assim sucessivamente até o quinto dia (sexta-feira), em que nadarão por 50 minutos. Já na segunda semana, os animais nadarão por 60 minutos todos os dias (de segunda à sexta-feira), porém haverá um aumento na intensidade do exercício, utilizando-se pesos atados próximos às caudas dos animais, de forma progressiva, ou seja, segunda-feira será de 1% do peso corporal, na terça-feira será de 2% até concluir a semana na sexta-feira com 5% do peso corporal. Da terceira semana até a oitava, a intensidade e a duração do treinamento serão constantes: 60 minutos e carga de 5% do peso corporal atada à cauda. Haverá uma nova pesagem dos animais no início da quarta semana para readequação das cargas, mantendo-se até o fim do protocolo (Medeiros et al., 2000). Para explicar melhor o protocolo segue a Tabela 1.

Tabela 1: Delineamento do protocolo de treino.

Semanas										
	1	2	3	Nova pesagem	4	5	6	7	8	
Segunda-feira	10 min	60 min 1%	60 min 5%		60 min 5%					
Terça-feira	20 min	60 min 2%	60 min 5%		60 min 5%					
Quarta-feira	30 min	60 min 3%	60 min 5%		60 min 5%					
Quinta-feira	40 min	60 min 4%	60 min 5%		60 min 5%					
Sexta-feira	50 min	60 min 5%	60 min 5%		60 min 5%					



Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

**Parecer Consubstanciado**  
**PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**

**IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO:** Efeitos da administração crônica de eritropoietina aliado ao treinamento físico sob a função autonômica cardiovascular em ratos Wistar.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto

**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM

**DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM:** 17/10/2014

**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** 335

Os dois grupos onde serão administrados o fármaco para este estudo receberão a forma recombinante da eritropoietina (rHuEPO) na dose de 50 UI/kg durante o mesmo período do protocolo de natação. Assim, os animais receberão rHuEPO de segunda a sexta-feira, desde a primeira segunda-feira (1ª semana) até a última sexta-feira (8ª semana) de experimentação.

Um dia após o término do protocolo de treinamento físico, os animais serão submetidos ao procedimento cirúrgico, em que serão inicialmente anestesiados (Tiopental sódico, 40mg/kg, i.p.). Em seguida, cateteres de polietileno serão introduzidos na artéria femoral esquerda para registro direto da PA e veia femoral esquerda para infusão de drogas. Posteriormente, os cateteres serão exteriorizados para a região dorsal dos ratos. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberão via subcutânea, 2 mg/Kg do analgésico Butorphanol, seguido por uma frequência de administração a cada 4h até o período de 8 horas antes do início dos registros. Os animais serão alojados em caixas individuais para recuperação pós-operatório. Após 24 horas de recuperação cirúrgica, o cateter arterial será conectado a um transdutor de PA e a um amplificador de sinais (Model 8805A, Hewlett-Packard, USA), onde o sinal será convertido por placa análogo-digital (com frequência de amostragem – 1000 Hz) será transferido a um sistema computadorizado de aquisição de dados (Aqdados, Lynx Tec. Eletron. SA, São Paulo, Brasil) e posteriormente armazenados em computador. Os animais permanecerão em uma sala com ambiente tranquilo a uma temperatura de 27°C por um período de adaptação de 15 minutos e em seguida serão realizados registros contínuos da PA pulsátil por 30 minutos para obtenção dos valores basais da PA e FC.

Após a obtenção dos parâmetros basais, será realizado o teste da sensibilidade barorreflexa cardíaca em todos os animais. Este teste será feito mediante a avaliação das respostas bradicárdicas e taquicárdicas reflexas geradas por elevações e reduções da PA induzidas pela administração endovenosa de doses alternadas e aleatórias de fenilefrina (FEN, 2 µg/ Kg) e nitroprussiato de sódio (NPS, 8 µg/ Kg), respectivamente. Um intervalo de 5 minutos entre as doses será dado para que a PA e FC retornem aos valores basais. As magnitudes das bradicardias e taquicardias reflexas induzidas, respectivamente, pelas respostas pressóricas da FEN ou depressoras do NPS serão utilizadas no cálculo dos índices de sensibilidade barorreflexa cardíaca.

Após o protocolo de avaliação da sensibilidade barorreflexa cardíaca, sulfato de atropina (4 mg/Kg, i.v.) será administrada por via intravenosa para o bloqueio da ação parassimpática sobre o coração. Quinze minutos depois, cloridrato de propranolol (5mg/Kg, i.v.) será administrado para bloquear o sistema simpático e um registro de mais 15 minutos será feito. Em metade dos animais, para cada grupo experimental, a ordem de bloqueio autonômico será invertida. Tal procedimento permitirá a quantificação do efeito simpático (ES) e vagal (EV) cardíaco, bem como da frequência intrínseca de marcapasso cardíaco (FIMC) e do índice simpato-vagal cardíaco (ISV). Após o término dos protocolos experimentais, todos os animais serão eutanasiados com uma dose supra-anestésica do anestésico tiopental sódico (100 mg/kg). Em seguida os corações dos animais serão excisados e pesados para o cálculo dos pesos absoluto e relativo.



Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

**Parecer Consubstanciado**  
**PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**

**IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO:** Efeitos da administração crônica de eritropoietina aliado ao treinamento físico sob a função autonômica cardiovascular em ratos Wistar.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto

**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM

**DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM:** 17/10/2014

**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** 335

**4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE PARA O USO DE ANIMAIS**

O uso de animais experimentais no presente estudo se justifica pela utilização de métodos invasivos e pela necessidade da análise de órgão alvo (coração), ao final do protocolo, necessariamente levando à eutanásia destes animais.

**5. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO**

Os possíveis desconfortos para os animais poderão ocorrer após o procedimento cirúrgico. Para minimizá-los, visando reduzir a dor ou possíveis agentes que envolvem inflamação excessiva e necrose, serão utilizados fármacos analgésicos (Butorphanol 2 mg / Kg via subcutânea de 4/4 horas por 24 horas). Durante os registros cardiovasculares os animais serão mantidos livres nas caixas de origem com maravalha para diminuir o estresse.

**6. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA**

Os desconfortos e riscos que por ventura possa ocorrer como os membros que atuaram na presente pesquisa (alergia, contato com o sangue do animal, contato com fármacos, etc.) serão minimizados em virtude da utilização de equipamentos de proteção individual pelos pesquisadores (jaleco, máscara, óculos, luvas cirúrgicas, etc.), bem como pelo treinamento de manuseio de animais por técnicos especializados.

**7. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO**

Protocolo bem estruturado e justificado, que obedece aos princípios éticos para experimentação animal.

**PARECER DA CEUA:** Aprovado em 06/02/2015.

*(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).*

*Prof. Dr. Rosângela Soares Chrigger*

Coordenadora da CEUA