

INFLUÊNCIA DA ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE SOBRE CONCENTRAÇÕES DE LACTATO EM ANIMAIS TREINADOS

Paulo Cesar Caetano Júnior¹, Lia Campos Lemes²
 Sílvia Regina Ribeiro³, Tatiana Sousa Cunha⁴
 Rodolfo de Paula Vieira⁵, Wellington Ribeiro²

RESUMO

Introdução: A eritropoetina humana recombinante (rHuEPO) promove o aumento de glóbulos vermelhos no sangue, podendo potencializar o desempenho físico. No entanto, este hormônio pode desencadear outros efeitos que ainda são pouco discutidos na literatura. **Objetivo:** Verificar a influência do tratamento com rHuEPO sobre as concentrações de lactato e tempo de exaustão em 20 ratos treinados. **Materiais e Métodos:** Os animais foram divididos em grupo sedentário (S), grupo treinado (T) e grupo treinado + rHuEPO (T+rHuEPO). O período de administração e de treinamento foi de seis semanas. **Resultados:** Houve diferença significativa entre as concentrações de lactato do S vs T e T+rHuEPO ($P < 0,05$). Os valores de tempo de exaustão foram significativamente diferentes para T vs S, T+rHuEPO vs S e T ($P < 0,05$). **Conclusão:** Os resultados mostraram que o tratamento com rHuEPO pode maximizar a resistência física de animais treinados, sem necessariamente alterar significativamente os níveis de glóbulos vermelhos e concentrações sanguíneas de lactato.

Palavras-chave: Drogas ilícitas. Desempenho atlético. Resistência física.

ABSTRACT

Effects of human recombinant erythropoietin on lactate concentrations in trained animals

Introduction: Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) is an erythropoiesis-stimulating agent that can improve the exercise performance. Other effects can be observed from the treatment with rHuEPO, but are little discussed in the literature. **Aims:** To evaluate the influence of rHuEPO on lactate concentrations and exhaustion time of trained animals. **Methods:** Male Wistar rats ($n=20$) were randomly divided into sedentary group (S), trained group (T) and trained + rHuEPO group (T+rHuEPO). The period of administration of rHuEPO and aerobic swimming training was six weeks. **Results:** There was a significant difference between the blood lactate concentrations to S vs T and T+rHuEPO ($P < 0,05$). The values of time of exhaustion were also significantly different between T vs S, T + and T rHuEPO vs S and T ($P < 0,05$). **Conclusion:** The findings showed that the treatment with rHuEPO increases exercise performance, not necessarily changing the levels of red blood cells and blood lactate concentrations.

Key words: Street drugs. Physical endurance. Exercise.

1-Universidade Paulista (UNIP), São José dos Campos-SP, Brasil.

2-Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos-SP, Brasil.

3-Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa-PR, Brasil.

4-Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São José dos Campos-SP, Brasil.

5-Instituto Brasileiro Ensino/Pesquisa em Imunologia Pulmonar e do Exercício, São José dos Campos-SP, Brasil.

E-mails dos autores:
paulocaetanoj@hotmail.com
sta.branca@hotmail.com
sribeiro2908@gmail.com
ts.cunha@unifesp.br
rodrelena@yahoo.com.br
gton@univap.br

INTRODUÇÃO

A eritropoetina humana recombinante (rHuEPO) é uma glicoproteína altamente purificada, composta por uma sequência de aminoácidos idêntica à da eritropoetina (EPO) endógena (Jacobs e colaboradores, 1985).

Esta substância tornou-se comercialmente disponível a partir de 1988 (Choi e colaboradores, 1996) e foi oficialmente proibida pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) em 1990 (Cazzola, 2002).

Em virtude da dificuldade de detecção e diferenciação entre a rHuEPO e a EPO endógena, bem como do uso da técnica natural de hipóxia intermitente, que desencadeia aumento da produção de EPO no organismo (Balestra e Germonpré, 2010), este hormônio recombinante passou a ser utilizado de forma indiscriminada por atletas (Magnani e colaboradores, 2001) com o objetivo de melhorar o desempenho físico (Cazzola, 2002).

Além dos efeitos clássicos relacionados ao estímulo à eritropoiese, os estudos têm demonstrado que a administração subcutânea de rHuEPO, em diferentes doses, pode potencializar a capacidade aeróbia de humanos (Audran e colaboradores, 1999; Juel e colaboradores, 2007), explicada principalmente pelo aumento da oferta de O₂ para os músculos ativos.

No entanto, há relatos de que este tratamento pode também influenciar o sistema anaeróbio, por meio de alterações relacionadas às concentrações de lactato no sangue (Connes e colaboradores, 2004; Lavoie e colaboradores, 1998; Meierhenrich e colaboradores, 1996).

Alguns estudos observaram reduções dos níveis de lactato sanguíneo durante o exercício físico em pacientes em hemodiálise e atletas recreacionais tratados com rHuEPO (Meierhenrich e colaboradores, 1996; Russell e colaboradores, 2002).

Isto pode ser explicado pelas diferentes modificações fisiológicas e biológicas no músculo, incluindo as alterações no transporte de lactato, realizadas pelos transportadores monocarboxilatos 1 e 4 e nos eritrócitos, que poderão funcionar como um compartimento de diluição deste substrato durante o exercício, reduzindo seu acúmulo e a acidose (Connes e colaboradores, 2004; Juel e colaboradores, 2003).

Assim, estas adaptações também podem explicar o desempenho físico aeróbio maximizado, pelo fato de que o acúmulo de lactato representa uma das principais causas da fadiga muscular, limitando inclusive a condição física em exercícios de longa duração (Freitas e colaboradores, 2010; Khanna e Manna, 2005).

Neste contexto, um melhor entendimento dos efeitos da rHuEPO sobre este substrato pode ajudar inclusive a estabelecer medidas preventivas e novas estratégias de detecção de doping (Connes e colaboradores, 2004).

É importante destacar que apesar das novas descobertas relacionadas aos efeitos da rHuEPO sobre variáveis que determinam o desempenho físico, os resultados de que o hormônio promova de fato, adaptações no metabolismo do lactato sanguíneo, ainda são inconclusivos.

Desta forma, o presente estudo objetivou verificar se o tratamento com rHuEPO pode modificar a concentração do lactato sanguíneo e tempo de exaustão, em ratos submetidos ao treinamento aeróbio com natação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo experimental

O presente estudo foi realizado baseando-se nos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o qual foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA), da Universidade do Vale do Paraíba (Protocolo de nº A032/CEUA/2011).

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com peso corporal de 304 ± 8 gramas (Média ± DP), divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: sedentário (S) (n=6), treinado (T) (n=7) e treinado + rHuEPO (T+rHuEPO) (n=7). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com acesso à ração e água ad libitum, no biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em temperatura de 22° a 25° C, umidade relativa e luminosidade controlada (Ciclo claro/escuro de 12 horas).

Protocolo de treinamento físico

Com o intuito de reduzir o estresse desencadeado pelo exercício físico, os animais foram previamente adaptados em meio líquido durante cinco dias (Gobatto e colaboradores, 2001).

O treinamento aeróbio foi realizado durante seis semanas, incluindo cinco sessões de treino por semana, com 30 min de duração em cada uma delas. A intensidade do treinamento foi determinada pelo TCM, conforme descrito no estudo de Caetano Junior e colaboradores (2013).

Administração de eritropoetina humana recombinante

A rHuEPO (Eritromax® Blausiegel) foi administrada por via subcutânea, na região dorsal (nuca), em três dias de cada semana, durante seis semanas. A dose administrada foi de 50UI/Kg nas três primeiras semanas e 20UI/Kg nas três últimas. Quinzenalmente os animais receberam por via oral, 2,4 mg de ferro. Optou-se por este protocolo, pelo fato de grande parte dos estudos relacionados ao desempenho esportivo utilizar essas dosagens similares (Audran e colaboradores, 1999; Juel e colaboradores, 2007; Poux e colaboradores, 1995; Russell e colaboradores, 2002).

Análise da concentração sanguínea de lactato

Ao final do protocolo experimental, os animais foram submetidos individualmente, a um teste de esforço físico contínuo de natação com sobrecarga de 8% do peso corporal. O sangue (25µL) foi coletado pela porção distal da cauda de cada animal, em repouso, aos 10 e 20 min. (Gobatto e colaboradores, 2001) e colocado em tiras-teste (BMLactate®) para quantificação do lactato, através de um analisador portátil Accutrend® Lactate.

Coleta sanguínea

Para avaliação da série vermelha do sangue os animais, 24 horas após o teste de lactacidemia, foram anestesiados com 50 mg/Kg⁻¹ de Ketamina (Cetamin 10%, 50 mL; Syntec do Brasil Ltda.) e 40 mg/Kg⁻¹ de xilazina (Xilazin 2%, 50 mL; Syntec do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil), por via intramuscular.

O sangue foi coletado (0,5 mL por animal) por punção cardíaca, armazenado em tubo com EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) e levado, sob refrigeração, para análise hematológica automática. Em seguida, os animais foram sacrificados, por meio de injeção intracardíaca de cloreto de potássio (KCl) a 20%.

As amostras de sangue foram homogeneizadas por cinco min. (AP22, Phoenix), em seguida, foram analisadas por 30 min., utilizando um analisador hematológico automático (BC-2800Vet, Mindray®, Nanshan, China), para avaliação do número de eritrócitos e concentração de Hb.

Análise estatística

Inicialmente, os resultados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Kolmogorov Smirnov (KS). Para a comparação entre grupos, utilizou-se a análise de variância ANOVA (One Way) e o teste de Tukey. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (DP) e o nível de significância adotado foi de P<0,05.

RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados os valores (média ± DP) de eritrócitos e concentração de Hb dos três grupos estudados. De acordo com os resultados obtidos, observa-se que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais.

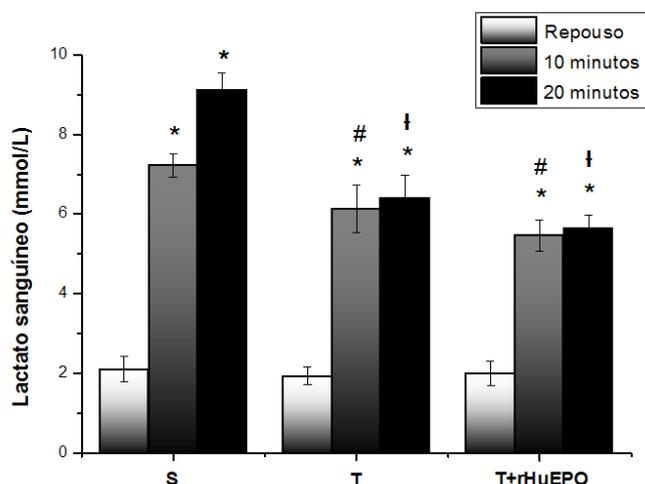
Tabela 1 - Valores sanguíneos de eritrócitos (10⁶/µL) e de hemoglobina (g/dL) de ratos sedentários (S), somente treinados (T) e treinados e tratados com rHuEPO (T+ rHuEPO), durante seis semanas.

Grupos	Eritrócitos (10 ⁶ /µL)	Hemoglobina (g/dL)
S	8,1 ± 0,7	12,7 ± 0,4
T	8,6 ± 0,3	13,1 ± 0,7
T+rHuEPO	8,6 ± 0,7	13,3 ± 0,7

Legenda: Valores expressos em média ± DP. Não houve diferença significativa entre os respectivos grupos experimentais.

Os valores da concentração de lactato sanguíneo, durante teste de esforço com sobrecarga de 8% do peso corporal (Figura 1), mostraram um aumento significativo dos valores obtidos em 10 e 20 min. comparados aos concentrações em repouso do S ($2,1 \pm 0,3$ mmol/L; $7,2 \pm 0,3$ mmol/L; $9,1 \pm 0,4$ mmol/L; $P < 0,001$).

As concentrações de lactato em repouso do T ($1,9 \pm 0,2$ mmol/L), também foram significativamente diferentes em relação aos tempos de 10 ($6,1 \pm 0,6$ mmol/L; $P < 0,001$) e 20 min. ($6,4 \pm 0,6$ mmol/L; $P < 0,001$), o mesmo observado entre as concentrações do T+rHuEPO em repouso ($2,0 \pm 0,3$ mmol/L), comparada aos 10 min. ($5,4 \pm 0,4$ mmol/L; $P < 0,001$) e 20 min. ($5,6 \pm 0,3$ mmol/L; $P < 0,001$).



Legenda: * $P < 0,05$ entre os níveis de lactato obtidos em repouso vs valores de lactato obtidos aos 10 e 20 min. # $P < 0,05$ concentrações de lactato obtidas aos 10 min. do S vs T e T+rHuEPO. † $P < 0,05$ comparação dos níveis de lactato obtidos aos 20 min. do S vs T e S vs T+rHuEPO.

Figura 1 - Concentração de lactato sanguíneo dos grupos S (n=6), T (n=7) e T+rHuEPO (n=7), no repouso e em 10 e 20 min., após a realização do teste de esforço com sobrecarga de 8% do peso corporal.

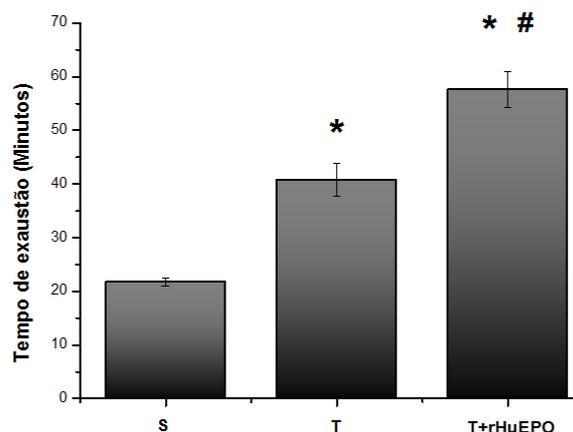
DISCUSSÃO

Com o objetivo de verificar as alterações do lactato sanguíneo e da resistência física aeróbia de ratos treinados e tratados com rHuEPO, pode-se observar que o tratamento influenciou ambas as variáveis, sem necessariamente aumentar

Ainda com relação à concentração sanguínea de lactato, os valores coletados em 10 min. do S foram significativamente diferentes dos valores dos T e T+rHuEPO ($P < 0,05$), bem como entre os valores obtidos em 20 min. do S vs T e T+rHuEPO ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as concentrações de lactato em repouso, dos respectivos grupos.

Os tempos de exaustão registrados após protocolo de natação com sobrecarga de 8% do peso corporal de cada animal estão descritos na figura 2.

O T+rHuEPO apresentou um tempo de exaustão significativamente maior ($57,9 \pm 4,0$ min.) do que o T ($40,7 \pm 3,1$ min.) ($P < 0,01$). Ambos os grupos apresentaram tempos significativamente superior ao do S ($21,7 \pm 0,7$ min.) ($P < 0,01$).



Legenda: * $P < 0,01$ vs S; # $P < 0,01$ vs T. S-Sedentário; T-Treinado; T+rHuEPO-Treinado e tratado com rHuEPO.

Figura 2 - Tempo de exaustão (Min.) dos animais durante teste de esforço físico contínuo de natação, com sobrecarga de 8% do peso corporal, após seis semanas de treinamento e/ou tratamento com rHuEPO.

significativamente os glóbulos vermelhos no sangue.

Os valores de eritrócitos e de Hb dos grupos T e T+rHuEPO, apesar de não significativos, foram superiores aos valores do grupo S. Assim, pelo fato de não haver diferença entre o T e T+rHuEPO, pressupõe que este aumento se deva exclusivamente ao

treinamento físico aeróbio, conforme mostrado em outros estudos, utilizando animais treinados em esteira (Baker e colaboradores, 2011; Martinez-Bello e colaboradores, 2011).

É importante destacar que a intensidade do treinamento, determinada pela carga, volume e frequência das sessões de treino, promove diferentes efeitos no organismo, podendo modificar ou não o número de eritrócitos e de Hb no sangue de acordo com a intensidade com é executado.

Nascimento e colaboradores (2004), por exemplo, mostraram que a série vermelha do sangue de ratos não foi modificada, após seis semanas de natação, com 45 min./dia e sobrecarga de até 3% do peso corporal. Além disso, há relatos de que o treinamento excessivo, com inadequados períodos de recuperação pode levar a um estado de overtraining reduzindo os níveis de Hb no sangue (Ru e Peijie, 2009).

Grande parte dos estudos encontrados na literatura, utilizando diferentes protocolos experimentais de administração da rHuEPO (Audran e colaboradores, 1999; Durussel e colaboradores, 2013; Thomsen e colaboradores, 2007), mostra que o hormônio aumenta significativamente a série vermelha do sangue. Assim como encontrado no presente estudo, os autores também não observaram aumento significativo de componentes sanguíneos em indivíduos saudáveis até a sexta semana de tratamento com rHuEPO (65UI/Kg) (Robach e colaboradores, 2009). É importante ressaltar que em virtude da carência de estudos associando o treinamento físico sistematizado juntamente com o tratamento com rHuEPO, a explicação e discussão para este achado foi dificultada.

Em relação à resposta do lactato sanguíneo e da resistência física dos animais, verificou que o treinamento físico aeróbio proposto foi também responsável por influenciar o metabolismo do lactato, evidenciado nas concentrações significativamente menores do T comparado ao S, bem como pela diferença não significativa encontrada entre T e T+rHuEPO (Figura 1).

Os resultados estão de acordo com a literatura, que aponta o treinamento físico aeróbio, como sendo um dos principais estímulos para modificar o metabolismo do lactato no sangue, podendo reduzir sua

produção e/ou aumentar sua remoção (Freitas e colaboradores, 2010; Macrae e colaboradores, 1992).

Alguns estudos utilizando diferentes protocolos de treinamento com natação encontraram redução de lactato sanguíneo em animais, Freitas e colaboradores (2010), por exemplo, submetem animais a sessões diárias de natação, por 30 min., sem sobrecarga, durante seis semanas e verificaram que a concentração de lactato dos animais treinados estabilizou-se em $3,8 \pm 0,4$ mmol/L e $6,2 \pm 0,56$ mmol/L, nos testes de esforço sem sobrecarga e com sobrecarga a 5% do peso corporal, respectivamente. Gobatto e colaboradores (2001), por sua vez, após treinamento com natação de 9 semanas (sobrecarga de 8% - peso corporal/60 min. - dia), observaram uma estabilização da concentração de lactato sanguíneo (5,5 mmol/L), nos animais treinados aos 10 e 20 min., durante teste de esforço a 8% do peso corporal.

Em relação à influência do tratamento com rHuEPO sobre o metabolismo do lactato sanguíneo, verificou-se que as alterações de lactato apresentadas pelo T+rHuEPO, são decorrentes do treinamento físico aeróbio, como discutido anteriormente. Estes resultados diferem de alguns relatos da literatura, os quais verificaram tais efeitos pelo tratamento com o hormônio (Connes e colaboradores, 2004; Meierhenrich e colaboradores, 1996). Russel e colaboradores (2002), por exemplo, observaram em atletas submetidos a exercícios com intensidades variando de 60% a 100% do $VO_{2máx}$, menores concentrações de lactato, após oito semanas de tratamento com rHuEPO, sendo as três primeiras a 50 UI/Kg e as cinco últimas a 20 UI/Kg.

Um fator que ajuda a explicar esta divergência é que os mesmos autores (Russell e colaboradores, 2002), verificaram aumento de hematócrito nos grupos tratados.

Alguns estudos têm demonstrado que a rHuEPO pode elevar o transporte intracelular de lactato para o interstício dos eritrócitos, mediado por transportadores monocarboxilato 1 e 4 nos eritrócitos, bem como pode intensificar a capacidade destas células em funcionar como compartimento de diluição deste substrato durante o exercício, reduzindo seu acúmulo e a acidose (Connes e

colaboradores, 2004; Juel e colaboradores, 2003).

Os valores de tempo exaustão mostraram que os protocolos de treinamento físico aeróbio e de tratamento com rHuEPO, potencializaram o desempenho físico dos animais. O T foi significativamente diferente do S, enquanto que o T+rHuEPO diferenciou significativamente ($P < 0,01$) dos demais grupos (Figura 2).

Este achado corrobora com outros estudos, os quais encontraram aumento do tempo de exaustão e do VO_{2max} em indivíduos submetidos ao mesmo tipo de tratamento (Juel e colaboradores, 2007; Russell e colaboradores, 2002; Thomsen e colaboradores, 2007).

Os resultados também mostraram que o tratamento com rHuEPO pode contribuir para o aumento do desempenho físico dos animais, concomitante a níveis de eritrócitos, Hb e lactato similares aos de animais somente treinados. Apesar da pequena diferença encontrada entre as concentrações de lactato do T+rHuEPO e T, os componentes sanguíneos analisados não podem explicar o tempo de exaustão significativamente prolongado dos animais tratados. Isto sugere que os efeitos deste hormônio recombinante vão além daqueles relacionados aos glóbulos vermelhos no sangue (Cayla e colaboradores, 1992; Robach e colaboradores, 2009) e às concentrações sanguíneas de lactato (Freitas e colaboradores, 2010; Lavoie e colaboradores, 1998).

Há relatos de que o tratamento com rHuEPO pode influenciar proteínas musculares (Juel e colaboradores, 2007; Lundby e colaboradores, 2008), aumentar da concentração de ácidos graxos livres e glicogênio muscular (Lavoie e colaboradores, 1998), e ainda, pode promover efeitos neurais, potencializando o desempenho físico, sem necessariamente alterar a produção de células vermelhas do sangue (Schuler e colaboradores, 2012).

Neste sentido, sugere-se novos estudos associando o tratamento com rHuEPO e exercício físico, envolvendo inclusive outras variáveis que ajudam a explicar mais precisamente a melhora do desempenho esportivo por meio deste tratamento.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o treinamento físico apresenta-se como um dos principais estímulos capaz de reduzir as concentrações de lactato sanguíneo, e ainda, que o tratamento com rHuEPO potencializa consideravelmente o desempenho físico de animais treinados, sem necessariamente alterar significativamente os níveis de eritrócitos, Hb e lactato sanguíneo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES.

REFERÊNCIAS

- 1-Audran, M.; Gareau, R.; Matecki, S.; Durand, F.; Chenard, C.; Sicart, M. T.; Marion B.; Bressolle, F. Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med Sci Sports Exerc.* Vol. 31. Núm. 5. 1999. p. 639-645.
- 2-Baker, J. M.; De Lisio, M.; Parise, G. Endurance exercise training promotes medullary hematopoiesis. *FASEB J.* Vol. 25. Núm. 12. 2011. p. 348-357.
- 3-Balestra, C.; Germonpré, P. EPO and doping. *Eur J Appl Physiol.* Vol. 109. 2010. p. 1001-1002.
- 4-Caetano Junior, P. C.; Lemes, L. C.; Ribeiro, S. R.; Ozório, R. A. L.; Ribeiro, W. Influência da eritropoetina humana recombinante sobre o desempenho físico de ratos treinados. *Buenos Aires.* Vol. 17. Núm. 178. 2013.
- 5-Cayla, J. L.; Maire, P.; Duvallat, A.; Wahrman, J. P. Erythropoietin induces a shift of muscle phenotype from fast glycolytic to slow oxidative. *Int J Sports Med.* Vol. 29. Núm. 6. 2008. p. 460-465.
- 6-Cazzola, M. A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. *Haematologica.* Vol. 85. Núm. 6. 2002. p. 561-563.

- 7-Choi, D.; Kim, M.; Park, J. Erythropoietin: physico and biochemical analysis. *J Chromatogr B*. Vol. 687. Núm. 1. 1996. p. 189-199.
- 8-Connes, P.; Caillaud, C.; Mercier, J.; Bouix, D.; Casties, J. F. Injections of recombinant human erythropoietin increases lactate influx into erythrocytes. *J Appl Physiol*. Vol. 97. Núm. 1. 2004. p. 326-332.
- 9-Durussel, J.; Daskalaki, E.; Anderson, M.; Chatterji, T.; Wondimu, D. H.; Padmanabhan, N.; Patel, R. K.; McClure, J. D.; Pitsiladis, Y. P. Haemoglobin mass and running time trial performance after recombinant human erythropoietin administration in trained men. *PLoS One*. Vol. 8. Núm. 2. 2013. p. 56151.
- 10-Freitas, J. S.; Carneiro-Junior, M. A.; Franco, F. S. C.; Rezende, L. S.; Santos, A. S.; Maia, H. O.; Marins, J. C. B.; Antônio José Natali, A. J. Treinamento aeróbio em natação melhora a resposta de parâmetros metabólicos de ratos durante teste de esforço. *Rev Bras Med Esporte*. Vol. 16. Núm. 2. 2010. p. 134-138.
- 11-Gobatto, C. A.; Mello, M. A.; Sibuya, C. Y.; de Azevedo, J. R.; dos Santos, L. A.; Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem and Phys Part A*. Vol. 130. Núm. 1. 2001. p. 21-27.
- 12-Jacobs, K.; Shoemaker, C.; Rudersdorf, R.; Neill, S. D.; Kaufman, R. J.; Mufson, A.; Seehra, J.; Jones, S. S.; Hewick, R.; Fritsch, E. F.; Kawakita, M.; Shimizu, T.; Miyake, T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. Vol. 313. 1985. p. 6-10.
- 13-Juel, C.; Lundby, C.; Sander, M.; Calbet, J. A.; Hall, G. Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. *J Physiol*. Vol. 548. Núm. 2. 2003. p. 639-648.
- 14-Juel, C.; Thomsen, J. J.; Rentsch, R. L.; Lundby, C. Effects of prolonged recombinant human erythropoietin administration on muscle membrane transport systems and metabolic marker enzymes. *Eur J Appl Physiol*. Vol. 102. Núm. 1. 2007. p. 41-44.
- 15-Khanna, G. L.; Manna, I. Supplementary effect of carbohydrate-electrolyte drink on sports performance, lactate removal & cardiovascular response of athletes. *Indian J Med Res*. Vol. 121. Núm. 5. 2005. p. 665-669.
- 16-Lavoie, C.; Diguët, A.; Milot, M.; Gareau, R. Erythropoietin (rHuEPO) doping: effects of exercise on anaerobic metabolism in rats. *Int J Sports Med*. Vol. 19. Núm. 4. 1998. p. 281-286.
- 17-Lundby, C.; Hellsten, Y.; Jensen, M. B. F.; Munch, A. S.; Pilegaard, H. Erythropoietin receptor in human skeletal muscle and the effects of acute and long-term injections with recombinant human erythropoietin on the skeletal muscle. *J Appl Physiol*. Vol. 104. Núm. 4. 2008. p. 1154-1160.
- 18-Macrae, H. S.; Dennis, S. C.; Bosch, A. N.; Noakes, T. D. Effects of training on lactate production and removal during progressive exercise in humans. *J Appl Physiol*. Vol. 72. Núm. 5. 1992. p. 1649-1656.
- 19-Magnani, M.; Corsi, D.; Bianchi, M.; Paiardini, M.; Galluzzi, E.; Gargiullo, E. Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells Mol Dis*. Vol. 27. Núm. 3. 2001. p. 559-571.
- 20-Martinez-Bello, V. E.; Sanchis-Gomar, F.; Nascimento, A. L.; Pallardo, F. V.; Ibañez-Sania, S.; Olaso-Gonzalez, G.; Calbet, J. A.; Gomez-Cabrera, M. C.; Viña, J. Living at high altitude in combination with sea-level sprint training increases hematological parameters but does not improve performance in rats. *Eur J Appl Physiol*. Vol. 111. Núm. 6. 2011. 1147-1156.
- 21-Meierhenrich, R.; Jedicke, H.; Voigt, A.; Lange, H. The effect of erythropoietin on lactate, pyruvate and excess lactate under physical exercise in dialysis patients. *Clin Nephrol*. Vol. 45. Núm. 2. 1996. p. 90-97.
- 22-Nascimento, E.; Cavalcante, T.; Pereira S.; América Palmeira, A.; Rocha, M. C.; Viana, M. T.; Manhães-de-Castro, R.; Célia MMB de-Castro, C. M. M. B.; José Duarte, J.; Leandro, C. G. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos

estressados. Rev Port Cien Desp. Vol. 4. Núm. 3. 2004. 26-33.

23-Poux, J. M. ; Lartigue, M.; Chaisemartin, R. A. Uraemia is necessary for erythropoietin-induced hypertension in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. Vol. 22. Núm. 10. 1995. p.769-771.

24-Robach, P.; Recalcati, S.; Girelli, D.; Gelfi, C.; Aachmann-Andersen, N. J.; Thomsen, J. J.; Norgaard, A. M.; Alberghini, A.; Campostrini, N.; Castagna, A.; Viganò, A.; Santambrogio, P.; Kempf, T.; Wollert, K. C.; Moutereau, S.; Lundby, C.; Cairo, G. Alterations of systemic and muscle iron metabolism in human subjects treated with low-dose recombinant erythropoietin. Blood. Vol. 113. Núm. 26. 2009. p. 6707-6715.

25-Russell, G.; Gore, C. J.; Ashenden, M. J.; Parisotto, R.; Hahn, A. G. Effects of prolonged low doses of recombinant human erythropoietin during submaximal and maximal exercise. Eur J Appl Physiol. Vol. 86. Núm. 5. 2002. p. 442-449.

26-Ru, W.; Peijie, C. Modulation of dendritic cells and NKT cells by excessive exercise in rats. J Med Biol Eng. Vol. 29. Núm. 4. 2009. p. 190-194.

27-Schuler, B.; Vogel, J.; Grenacher, B.; Jacobs, R. A.; Arras, M.; Gassmann, M. Acute and chronic elevation of erythropoietin in the brain improves exercise performance in mice without inducing erythropoiesis. FASEB J. Vol. 26. Núm. 9. 2012. p. 3884-3890.

28-Thomsen, J. J.; Rentsch, R. L.; Robach, P.; Calbet, J. A.; Boushel, R.; Rasmussen, P.; Juel, C.; Lundby, C. Prolonged administration of recombinant human erythropoietin increases submaximal performance more than maximal aerobic capacity. Eur J Appl Physiol. Vol. 1001. Núm. 4. 2007. p. 481-486.

Endereço para correspondência:

Paulo Cesar Caetano Júnior

Universidade Paulista (Unip).

Departamento de Educação Física.

Rod. Presidente Dutra, km 157,5 - Pista Sul.

São José dos Campos-SP, Brasil.

CEP: 12240-420.

Recebido para publicação 14/07/2017

Aceito em 27/11/2017