

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
ASSOCIADO AO TREINAMENTO FÍSICO NOS PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR**

YONÁ DE FÁTIMA MURAD CURSINO DE MOURA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
ASSOCIADO AO TREINAMENTO FÍSICO NOS PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR**

YONÁ DE FÁTIMA MURAD CURSINO DE MOURA

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cecília Braga Laposy

636.089 644 M929e Moura, Yoná de Fátima Murad Cursino de.
Efeito da administração de hormônio do crescimento associado ao treinamento físico nos parâmetros hematológicos de ratos Wistar / Yoná de Fátima Murad Cursino de Moura. – Presidente Prudente, 2014.
28 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2011.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Braga Laposy

1. Hormônio do crescimento. 2. Treinamento físico.
3. Eritropoiese. 4. RDW. 5. Doping. I. Título.

YONÁ DE FÁTIMA MURAD CURSINO DE MOURA

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO ASSOCIADO AO TREINAMENTO FÍSICO NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cecília Braga Laposy

Presidente Prudente, 26 setembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cecília Braga Laposy
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira
Universidade Estadual Paulista- Unesp
Botucatu-SP

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pelo que representam em minha vida e pelo que me ensinaram a ser, em especial ao meu marido Francisco que compartilha comigo tantos momentos de felicidade, ao meu filho Felipe, que torna nossas vidas mais cheias de sentido e à minha mãe que cuida tão bem de todos nós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me dá saúde e coragem para escrever.

Aos meus queridos pais e irmãos, pelo apoio incondicional.

À Prof. Dra. Cecília Braga Laposy, pela orientação, tendo ficado ao meu lado dando a real contribuição e apoio durante a elaboração deste trabalho.

À Prof. Dra. Ines Cristina Giometti, pela colaboração e pelos seus ensinamentos.

À Prof. Dra. Francis Lopes Pacagnelli pela atenção e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Vamilton Santarém, brilhantismo de valor inestimável.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e seu corpo docente pela atenção, confiança e idealização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Giuffrida pela orientação estatística e análise dos resultados.

Aos estimados coordenadores Dra. Nilva Galli e Dr. Michel J. Cecílio pelo apoio ao ingresso no programa de mestrado.

Aos meus colegas de trabalho Rebeca Bressa e José Bressa pelo incentivo, compreensão e pela franca amizade.

À bibliotecária Jakeline Ortega pela atenção e gentileza.

Ao meu marido Francisco, pelas incontáveis horas de dedicação, paciência e ajuda em absolutamente todos os momentos da execução deste trabalho.

E respeitosamente aos animais que doaram suas vidas para que este estudo pudesse ser realizado.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
não pensou sobre aquilo que todos vêem”.*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Efeito da administração de hormônio do crescimento associado ao treinamento físico nos parâmetros hematológicos de ratos Wistar.

Com o objetivo de verificar as alterações hematológicas decorrentes do uso do rhGH (hormônio do crescimento recombinante humano), associado ou não ao treinamento físico, foram utilizados 80 ratos da linhagem Wistar, peso médio de 211,8 g que foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=20): CT (grupo controle sem treinamento físico e sem administração de rhGH), GH (grupo sem treinamento físico e com rhGH), TR (grupo com treinamento físico e sem rhGH) e TRGH (grupo com treinamento físico e com rhGH). Os animais dos grupos GH e TRGH receberam 0,2 UI/kg de rhGH por via subcutânea a cada dois dias durante o período de 30 dias. O treinamento físico foi realizado por meio de protocolo de salto composto de quatro séries de dez saltos, com sobrecarga de 50% do peso corpóreo, durante três dias na semana, em um recipiente cilíndrico com 38 cm de água aquecida (30°C) em seu interior. Ao final de 4 semanas, os animais foram pesados, anestesiados e então mortos por exsanguinação para colheita do sangue para a realização do hemograma. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW (Red Cell Distribution Width) e contagem de leucócitos totais. As variáveis do eritrograma não sofreram alterações com o treinamento físico e/ou suplementação hormonal. Em todos os grupos, os valores de RDW permaneceram inalterados. A contagem de leucócitos dos animais que fizeram treinamento físico e foram suplementados com hormônio foi maior quando comparados aos sedentários ($P < 0,05$). Conclui-se que a administração do rhGH na dose de 0,2 UI/kg associado ao treinamento físico induziu a leucocitose, porém não influenciou os parâmetros da série vermelha tanto em animais sedentários como ativos. Não foi possível, a partir destas variáveis, detectar estímulo na eritropoiese destes animais.

Palavras-chave: Hormônio do crescimento. Treinamento Físico. Eritropoiese. RDW. Doping.

ABSTRACT

Effect of administration of growth hormone associated with physical training on hematological parameters of Wistar rats.

In order to determine the hematologic changes resulting from the use of rhGH (recombinant human growth hormone), associated or not with physical training in rats, eighty Wistar rats, average weight of 211.8 g were randomly divided into four groups (n=20): CT (control group without physical training and without administration of rhGH), GH (group without physical training and with rhGH), TR (group with physical training and without rhGH) and TRGH (physical training group with rhGH). The animals in groups GH and TRGH received 0.2 IU/kg rhGH subcutaneously every two days during the 30 day period. Physical training was performed using a jumping protocol consisting of four sets of ten jumps with overload of 50% of body weight, three days a week, in a cylindrical container with 38 cm of heated water (30° C). At the end of 4 weeks, the animals were weighed, anesthetized and then killed by exsanguination for collection of blood for analyses. The following parameters were evaluated: number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW (Red Cell Distribution Width), and leukocyte count. Red blood cell parameters did not change with exercise training and / or hormonal supplementation. In all groups RDW remained unchanged. The leukocyte count of the animals that have done physical training and were supplemented with hormone was higher when compared to sedentary rats ($P < 0.05$). The administration of rhGH at a dose of 0.2 IU/kg associated with exercise training increased the number of leukocytes, but did not change the remaining parameters of the hemogram in sedentary and active rats. It was not possible to detect an increase in erythropoiesis, through the use of rhGH, using these variables.

Keywords: Growth Hormone. Physical Training. Erythropoiesis. RDW. Doping.

LISTA DE SIGLAS

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CT – Grupo controle sem treinamento físico e sem administração de hormônio do crescimento

EPO – Eritropoietina

GH – Hormônio do crescimento

GH – Grupo sem treinamento físico e com administração de hormônio do crescimento

Hb – Hemoglobina

Ht – Hematócrito

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina

RDW – Red Cell Distribution Width

rhGH – Hormônio do crescimento recombinante humano

TR – Grupo com treinamento físico e sem administração de hormônio do crescimento

TRGH – Grupo com treinamento físico e com administração de hormônio do crescimento

VCM – Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
--------------------------	----

1 ARTIGO CIENTÍFICO*

Efeito da administração de hormônio do crescimento associado ao treinamento físico nos parâmetros hematológicos de ratos Wistar

Yoná de Fátima Murad Cursino de Moura^a, Cecília Braga Laposy^{b*}, Ines Cristina Giometti^b, Renato Aranda Fernandes^c.

^a Mestranda Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil.

^b Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil.

^c Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil.

* autor para correspondência: Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Presidente Prudente, Brasil. Tel/Fax +55 (18) 3229-2077.
e-mail : claposy@unoeste.br (C. Laposy)

Destaques:

rhGH associado ao treinamento físico induziu leucocitose nos ratos.

rhGH não alterou o eritrograma.

rhGH foi insuficiente para estimular a eritropoiese.

RESUMO

Objetivos: Verificar as alterações hematológicas decorrentes do uso do rhGH (hormônio do crescimento recombinante humano), associado ou não ao treinamento físico, em ratos Wistar. A hipótese é que o estímulo eritropoiético resultante da associação da suplementação hormonal com treinamento físico possa implicar em diferenças nos parâmetros hematológicos quando comparados com ratos sedentários.

Desenho do estudo: Oitenta ratos da linhagem Wistar, peso médio de 211,8 g foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=20): CT (grupo controle

* Artigo elaborado conforme as normas da revista Growth Hormone & IGF Research.

sem treinamento físico e sem administração de rhGH), GH (grupo sem treinamento físico e com rhGH), TR (grupo com treinamento físico e sem rhGH) e TRGH (grupo com treinamento físico e com rhGH). Os animais dos grupos GH e TRGH receberam 0,2 UI/kg de rhGH por via subcutânea a cada dois dias durante o período de 30 dias. O treinamento físico foi realizado por meio de protocolo de salto composto de quatro séries de dez saltos, com sobrecarga de 50% do peso corpóreo, durante três dias na semana, em um recipiente cilíndrico com 38 cm de água aquecida (30°C) em seu interior. Ao final de 4 semanas, os animais foram pesados, anestesiados e então mortos por exsanguinação para colheita do sangue para a realização do hemograma. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW (Red Cell Distribution Width) e contagem total de leucócitos.

Resultados: A contagem de leucócitos dos animais que fizeram treinamento físico e foram suplementados com hormônio foi maior quando comparada aos sedentários ($P < 0,05$). Os valores das demais variáveis hematológicas não sofreram alterações com o treinamento físico e/ou suplementação hormonal. Em todos os grupos, os valores de RDW permaneceram inalterados.

Conclusões: A administração de rhGH na dose de 0,2 UI/kg associado ao treinamento físico elevou o número de leucócitos, mas não alterou os demais parâmetros do hemograma. O RDW não se alterou com o treinamento físico e/ou com suplementação hormonal. Não foi possível, a partir destas variáveis, detectar estímulo na eritropoiese destes animais.

Palavras-chave: Hormônio do crescimento, treinamento físico, eritropoiese, RDW, doping

Título abreviado: Uso do GH e treinamento físico em ratos Wistar

Introdução

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio anabólico importante, secretado de forma pulsátil pelas células da hipófise anterior, com liberação

lenta e constante, intercalada por picos de secreção desencadeados por hipoglicemia, sono, estresse e especialmente exercício [1].

O exercício é um potente estímulo para liberação de GH e os principais fatores que modulam seu perfil de liberação são a intensidade e duração, aumentando proporcionalmente sua secreção [2]. Durante o exercício físico leve a moderado, os níveis plasmáticos de GH variam de 5 a 25 µg/l [3] e em exercícios mais intensos alcança níveis de 50 µg/l [4].

Além das ações metabólicas do GH, foi identificado seu envolvimento na eritropoiese, pois a sua deficiência frequentemente cursa com anemia, que é revertida quando se faz a reposição com rhGH (hormônio do crescimento recombinante humano) [5].

O GH e o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) são fatores importantes na eritropoiese juntamente com a eritropoietina (EPO). O IGF-1 é o principal mediador do GH no que diz respeito à eritropoiese [6]. Receptores de IGF-1 são encontrados em células precursoras eritróides e em eritrócitos maduros e ao se adicionar anticorpo monoclonal contra receptores de IGF-1 em culturas de precursores eritróides, observa-se inibição de seu crescimento [7]. Estima-se que em concentrações normais de EPO, 40% da eritropoiese depende da EPO, 30% do eixo GH/IGF e 30% de outros fatores de crescimento [5]. Ratos hipofisectomizados tratados com rhGH ou IGF-1 apresentaram respostas semelhantes em ganho de peso, incorporação de ferro nos eritrócitos e aumento de reticulócitos [8]. Pacientes com deficiência de GH que receberam 0,4UI/kg por semana de rhGH apresentaram aumento da hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e número de hemácias [9].

Existe controvérsia se o uso de rhGH em doses suprafisiológicas estimularia a eritropoiese. Alguns estudos mostram ausência de efeito do rhGH nos parâmetros hematológicos [10,11], enquanto outros têm como resultado aumento de Hb, Ht e reticulócitos [12].

O rhGH é bastante usado por atletas com o objetivo de aumentar a força muscular e se ocorrer aumento da massa eritrocitária pelo seu efeito eritropoiético, haverá aumento do desempenho do atleta pelo maior transporte de oxigênio (doping). Nestes casos, a massa eritrocitária é fator determinante no transporte de oxigênio para a musculatura, especialmente quando se almeja

a capacidade máxima de exercício [13]. Como este tipo de doping é de detecção muito difícil, estratégias vêm se desenvolvendo nos últimos anos e parâmetros hematológicos estão sendo estudados para identificar atletas em uso de rhGH [14].

Um dos índices do hemograma, conhecido como RDW (Red Cell Distribution Width) mede a heterogeneidade no tamanho das hemácias e seu aumento, acima de 15%, pode indicar estímulo exógeno da eritropoiese. Atletas submetidos a um ciclo de treinamento aeróbico intenso mostraram aumento de Hb e RDW em relação aos valores iniciais [15], mas não existem estudos na literatura que correlacionem uso de rhGH com RDW.

Os resultados da interação entre uso de rhGH e exercício na eritropoiese são escassos na literatura, sendo que a maioria dos trabalhos avaliou o efeito isolado de cada um na formação da série vermelha. Esta interação também é importante para a detecção do doping, já que tem sido proposto o uso dos parâmetros hematológicos para este fim. A hipótese é que o estímulo eritropoiético resultante da combinação da suplementação hormonal com treinamento físico possa implicar em diferenças nos parâmetros hematológicos quando comparados com ratos sedentários.

O objetivo do trabalho foi determinar se a associação do rhGH e treinamento físico em ratos produz estímulo na eritropoiese que possa ser detectado pelas variáveis hematológicas, especialmente o RDW.

Material e Métodos

Animais

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo 1714). Foram utilizados 80 ratos da linhagem Wistar com nove semanas de idade e peso médio de 211,8 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil. Os animais foram mantidos em local com temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de $55 \pm 5\%$ e fotoperíodo 12h claro/escuro, iniciando período claro às 7 horas da manhã. Durante todo o período experimental receberam ração peletizada e água *ad libitum* e foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal da própria instituição.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 20 animais (10 machos e 10 fêmeas): CT (grupo controle sem treinamento físico e sem administração de rhGH), GH (grupo sem treinamento físico e com rhGH), TR (grupo com treinamento físico e sem rhGH) e TRGH (grupo com treinamento físico e com rhGH).

Os grupos GH e TRGH receberam 0,2 UI/kg rhGH (Saizen[®]) por via subcutânea [16] a cada dois dias por 30 dias. Nos demais ratos foi administrada solução fisiológica em volume similar.

O treinamento físico foi realizado por meio de um protocolo de atividade muscular anaeróbica de saltos verticais na água segundo Malheiro et al. [17]. Uma semana antes de iniciar o experimento, os ratos foram adaptados ao treinamento físico na água, com realização de séries progressivas (uma, duas e três) de 10 saltos verticais com coletes acomodados na região anterior ao tórax que continham uma sobrecarga de 50% do peso corporal. O treinamento ocorreu dentro de um tubo de PVC de 25 cm de diâmetro com 38 cm de água aquecida (30°C) em seu interior. Os animais foram pesados em um a cada dois dias de treinamento físico, a fim de recalcular a carga do colete. Após esta adaptação, os ratos foram submetidos a um protocolo de quatro séries de 10 saltos com intervalo de um minuto entre cada série, três vezes por semana, durante 30 dias. Após o treinamento era realizada a secagem dos ratos.

Ao final de um mês e após 72 horas do término do último treinamento físico, os animais foram anestesiados com éter etílico e então mortos por exsanguinação para colheita do sangue para a realização do hemograma. Todas as ratas foram mortas em fase de diestro comprovado por meio de citologia vaginal diária.

Exames Laboratoriais

Foram coletados volumes variando de 0,5 a 1 ml de sangue de cada animal e colocados em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) a 10% para a realização do hemograma. Os valores de eritrócitos, Hb, Ht, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), RDW e contagem de leucócitos foram obtidos utilizando o analisador hematológico modelo POCH-100iV DIFF

(Sysmex do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Curitiba/PR-Brasil). Todas as avaliações foram feitas por um único observador e de forma cega.

Análise estatística

Todos os resultados foram analisados quanto ao pressuposto de normalidade e homogeneidade de variâncias respectivamente pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Para comparar os parâmetros estudados entre os grupos experimentais e entre os sexos, recorreu-se a análise de variância (ANOVA) fatorial de medidas repetidas 4 x 2 (4 grupos: sem treinamento físico sem rhGH; sem treinamento com rhGH; com treinamento sem rhGH e com treinamento com rhGH x 2 fatores: macho e fêmea), com contrastes pelo método de Tukey para a ANOVA e teste t não pareado para comparações entre sexos. Todas as análises foram realizadas com o uso do software SPSS for Windows v.13.0 [18]. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. O intervalo de confiança adotado foi de 95%.

Resultados e Discussão

Em todos os grupos estudados, verificou-se um aumento de peso corpóreo significativo durante o decorrer do período avaliado em relação aos valores iniciais, o que já era esperado, uma vez que os ratos cresceram durante o período do estudo. O grupo GH foi o que apresentou maior ganho de peso, porém, sem diferença estatística, corroborando a literatura que mostra resultados controversos relativos ao efeito anabólico da suplementação hormonal de GH em indivíduos normais [19]. Cruzat et al.[20] sugerem ainda que o uso de rhGH mobiliza ácidos graxos livres do tecido adiposo para geração de energia, aumentando a capacidade de oxidação de gordura e consequente aumento do gasto energético, o que contribuiria para redução do peso (Figura 1).

Os resultados dos parâmetros hematológicos referentes aos grupos estão dispostos na tabela 1 e figura 2.

No presente estudo não conseguimos identificar a ocorrência de estímulo eritropoiético anormal (Tabela 1) induzido pela administração de rhGH, treinamento físico ou pela combinação de ambos.

Os estudos são contraditórios nos seus resultados. O uso de rhGH não alterou os parâmetros hematológicos em pacientes com GH normal [10], bem como em pacientes com deficiência de GH, mas sem alteração na série vermelha [11]. Em outro estudo, porém, a administração de IGF-1 em ratos normais provocou aumento dos níveis de Hb, Ht e número de hemácias [12].

Existe dificuldade em identificar variáveis hematológicas que possam ser usadas de maneira segura e consistente na detecção do doping [21]. Marcadores usuais como Hb e Ht, apesar de fácil realização, costumam ser alterados com exercício agudo, ingestão de fluidos, perdas hídricas (sudorese, diarreia), promovendo uma grande variação de resultados [22].

Foi descrito por diversos autores que o exercício físico muito intenso e prolongado pode causar diminuição da série vermelha também conhecida como anemia do exercício, caracterizada como uma pseudoanemia dilucional por aumento do volume plasmático [23-25]. Apesar da anemia, os trabalhos indicam que a eritropoiese está aumentada, pois nos períodos em que o atleta diminui sua atividade, há uma tendência de aumento de Hb, Ht e reticulócitos [26]. No presente estudo, a anemia do exercício pode ter mascarado um possível estímulo da eritropoiese, porém no grupo de animais que não realizaram treinamento físico e receberam rhGH também não houve alteração significativa do eritrograma.

O tipo de exercício também pode fazer diferença no estímulo eritropoiético. Matsuo et al.[27] estudaram o efeito de exercício aeróbico (natação) ou de resistência (escalada) na Hb de ratos com dieta muito deficiente em ferro e observou que os ratos submetidos a exercícios de resistência apresentaram níveis de Hb superiores aos ratos submetidos à mesma dieta, porém realizando exercícios aeróbicos. Em ratos com dieta pouco deficiente em ferro não houve diferença entre os tipos de exercício.

Ocorre mobilização de células progenitoras hematopoiéticas pelo exercício e alterações no perfil hematológico de atletas participantes de esportes de resistência [28-30]. Em camundongos submetidos a exercícios de resistência houve aumento no conteúdo de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea [31]. Biancotti et al. [32] não demonstraram variação dos valores hematológicos em diferentes tipos de esporte e

concluíram que a variabilidade individual destes parâmetros é muito maior que a possivelmente induzida pelo tipo de exercício.

A literatura tem realizado estudos sobre a massa total de hemoglobina, um novo parâmetro hematológico que não sofre influência da hemodiluição ou hemoconcentração. Esse novo método mostrou que pode ocorrer aumento da série vermelha, sem aumento dos níveis de Hb ou Ht [33].

Como Hb e Ht parecem ser parâmetros pouco fidedignos, avaliou-se também a possibilidade do RDW indicar a estimulação da medula óssea, pois a liberação de células jovens na circulação promove aumento do RDW, mas não houve diferença entre os grupos.

Não houve diferença estatística nos parâmetros relacionados à série vermelha entre os grupos estudados, mesmo analisando separadamente machos e fêmeas dentro de cada grupo. Porém, quando separamos os animais somente pelo sexo, independente dos grupos de estudo, encontrou-se diferença significativa nos índices hematimétricos RDW, CHCM e VCM (Tabela 2).

A presença de fêmeas nos grupos de estudo poderia ter contribuído para o resultado encontrado, pois pode existir inibição da ação do GH pelo estrógeno. O tratamento com estrógenos, concomitante ao uso de rhGH, em pacientes com hipopituitarismo, antagoniza as ações biológicas do GH. O estrógeno inibe a produção hepática de IGF-1 (inibe a expressão do RNA mensageiro), que é o mediador do estímulo da eritropoiese [34]. Porém, os grupos de estudo foram comparados considerando somente os animais machos e novamente não houve diferença significativa nos parâmetros da série vermelha.

Outra possibilidade é que a administração exógena de GH pode ter inibido sua liberação durante o treinamento físico e desse modo não houve o efeito combinado esperado na concentração plasmática de GH no grupo TRGH, fazendo com que o estímulo na eritropoiese não fosse tão intenso. Voluntários que realizaram exercício após a administração de rhGH, revelaram atenuação importante da elevação esperada de GH sérico durante o exercício [35].

Com relação aos leucócitos totais, observou-se aumento significativo ($P=0,02$) nos animais que foram submetidos ao treinamento físico associado ao rhGH em relação aos ratos sedentários (Figura 2). Também houve diferença estatística quando os animais são separados pelo sexo, independente do grupo de estudo (machos 12.800 ± 330 leucócitos/ mm^3 e fêmeas 10.000 ± 330 leucócitos/ mm^3 com $P<0,01$).

A ocorrência de aumento do número de leucócitos induzida pelo exercício já é fenômeno bem conhecido e tem sido relatada desde o fim do século XIX. O grau de leucocitose é dependente da intensidade e do tipo do exercício e tem sido observado após o primeiro minuto de exercício supra máximo [36]. Em exercício físico inferior à uma hora, a leucocitose é dependente principalmente da intensidade do exercício e não da duração [37]. A maior parte destes leucócitos parece ser proveniente do compartimento marginal de leucócitos (leucócitos na periferia da luz vascular, onde a velocidade do fluxo sanguíneo é baixa e permite adesão reversível da célula com o endotélio). A liberação de catecolaminas durante o exercício também está relacionada com a leucocitose e a vasculatura pulmonar parece ser um dos principais locais de liberação dos leucócitos [38]. A leucocitose também tem uma fase tardia pós-exercício, possivelmente mediada pelo cortisol liberando células da medula óssea [36].

É interessante notar que os animais que realizaram treinamento físico e receberam rhGH mostraram aumento significativo de leucócitos em relação aos animais sedentários, o que não aconteceu com os animais que realizaram exercício e não receberam rhGH, mostrando um provável estímulo da série branca pelo GH. Linfócitos e neutrófilos expressam receptores de GH em sua superfície e a administração deste hormônio, entre seus muitos efeitos imunológicos, aumenta a formação de colônias de granulócitos, além da estimulação da série vermelha [39-41].

As diferenças encontradas entre machos e fêmeas (leucócitos e índices hematimétricos) demonstram a grande variabilidade dos valores de referência hematológicos entre os sexos, mesmo entre ratos da mesma espécie, podendo ainda ser resultante de características de ordem ambiental, manuseio e metodologia utilizada [42].

Conclusão

Sendo assim, nas condições em que o ensaio foi conduzido, conclui-se que a administração do rhGH na dose de 0,2 UI/kg associado ao treinamento físico induziu a leucocitose, porém não influenciou os parâmetros da série vermelha tanto em animais sedentários como ativos. Não foi possível, a partir destas variáveis, detectar estímulo na eritropoiese destes animais.

Referências

- [1] C. Ehrnborg, T. Rosén, Physiological and pharmacological basis for the ergogenic effects of growth hormone in elite sports, *Asian J. Androl.* 10 (2008) 373-383. doi: 10.1111/j.1745-7262.2008.00403.x.
- [2] W.M. Widdowson, M.L. Healy, P.H. Sönksen, J. Gibney, The physiology of growth hormone and sport, *Growth Horm. IGF Res.* 19 (4) (2009) 308-319.
- [3] C.J. Pritzlaff, L. Wideman, J.Y. Weltman, R.D. Abbott, et al., Impact of acute exercise intensity on pulsatile growth hormone release in men, *J. Appl. Physiol.* 87 (2) (1999) 498-504.
- [4] L. Wideman, J.Y. Weltman, M.L. Hartman, J.D. Veldhuis, et al., Growth hormone release during acute and chronic aerobic and resistance exercise: recent findings, *Sports Med.* 32 (2002) 987-1004.
- [5] F. Altomare, M. Rubino, P. Matarazzo, C. Montanari, et al., Correlation between IGF-1 serum levels and hemoglobin concentration in children with idiopathic growth hormone deficiency (IGHD), *The Child, a journal of Pediatrics* 1(2012) 7.
- [6] M. Claustres, P. Chatelain, C. Sultan, Somatomedin C/insulin-like growth factor I and in vitro erythropoiesis, *Reprod. Nutr. Dev.* 27 (1987) 569-570.
- [7] S. Merchav, I. Tatarsky, Z. Hochberg, Enhancement of erythropoiesis in vitro by human growth hormone is mediated by insulin-like growth factor I, *Br. J. Haematol.* 70 (1988).267-271.
- [8] A. Kurtz, J. Kapf, K.U. Eckardt, G. Clemon, et al., Insulin-like growth factor I stimulates erythropoiesis in hypophysectomized rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 (1988) 7825-7829.
- [9] A. Ardizzi, G. Guzzaloni, G. Grugni, D. Moro, et al., The effect of GH on erythropoiesis in vivo, *Minerva Endocrinol.* 18 (1993) 83-85.

- [10] G. Valerio, S. Di Maio, M. Salerno, A. Argenziano, et al., Assessment of red blood cell indices in growth-hormone-treated children, *Horm. Res.* 47 (1997) 62-66.
- [11] S. Bergamaschi, C. Giavoli, E. Ferrante, A. Lania, et al., Growth hormone replacement therapy in growth hormone deficient children and adults: Effects on hemochrome, *J. Endocrinol. Invest.* 29 (2006) 399-404.
- [12] P.J. Kling, K.M. Taing, B. Dvorak, S.S. Woodward, et al., Insulin-like growth factor-I stimulates erythropoiesis when administered enterally, *Growth Factors* 24 (3) (2006) 218-223.
- [13] H. Mairböurl, Red Blood Cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells, *Front. Physiol.* 4 (2013) 1-13. doi: 10.3389/fphys.2013.00332.
- [14] C. Lundby, P. Robach, B. Saltin, The evolving science of detection of blood doping, *Br J Pharmacol.* 165 (2012) 1306-1315. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01822.x.
- [15] G.F. Borges, L.M. Rama, S. Pedreiro, F. Rosado, et al., Haematological changes in elite kayakers during a training season, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 37(2012) 1140-1146. doi: 10.1139/h2012-102.
- [16] P. Kaminsky, P.M. Walker, J. Deibener, F. Barbe, et al., Growth hormone potentiates thyroid hormone effects on post-exercise phosphocreatine recovery in skeletal muscle, *Growth Horm. IGF Res.* 22 (6) (2012) 240-244. doi: 10.1016/j.ghir.2012.08.001.
- [17] O.C. De Mello Malheiro, C.T. Giacomini, L.A. Justilin, F.K. Delella, et al., Calcaneal Tendon Regions Exhibit Different MMP-2 Activation After Vertical Jumping and Treadmill Running, *Anat. Rec. (Hoboken)* 292 (2009) 1656-1662. doi: 10.1002/ar.20953.
- [18] J. Maroco, *Análise Estatística - com utilização do SPSS*, third ed., Símbolo, Lisboa 2007.
- [19] C.A.Fett, W.C.R. Rezende, A termogênese como recurso de intervenção eficiente para o combate e controle da obesidade, *R. Min. Educ. Fís.* 9 (1) (2001) 83-106.

- [20] V.F. Cruzat, J.D. Junior, J. Tirapegui, C.D.S. Schneide, Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações finais, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44 (2008) 549-562.
- [21] L. Malcovati, C. Pascutto, M. Cazzola, Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study, *Haematologica* 88 (5) (2003) 570-581.
- [22] W. Jelkmann, C. Lundby, Blood doping and its detection, *Blood* 118 (9) (2011) 2395-2404.
- [23] M.N. Sawka, S.J. Montain, Fluid and electrolyte supplementation for exercise heat stress, *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (Suppl. 2) (2000) 564-572.
- [24] Y.O. Schumacher, D. Grathwohl, J.M. Barturen, M. Wollenweber, et al., Haemoglobin, haematocrit and red blood cell indices in elite cyclists. Are the control values for blood testing valid?, *Int. J. Sports Med.* 21 (5) (2000) 380-385.
- [25] I. Kehat, A. Shupak, I. Goldenberg, O. Shoshani, Long-term hematological effects in special forces trainees, *Mil. Med.* 168 (2) (2003) 116-119.
- [26] I. Mujika, S. Padilla, D. Pyne, T. Busso, Physiological changes associated with the pre-event taper in athletes, *Sports Med.* 34 (13) (2004) 891-927.
- [27] T. Matsuo, H.S. Kang, H. Suzuki, M. Suzuki, Voluntary resistance exercise improves blood hemoglobin concentration in severely iron-deficient rats, *J.Nutr. Sci. Vitaminol.* 48(2) (2002) 161-164.
- [28] K. Spiropoulos, G. Trakada, Hematologic and biochemical laboratory parameters before and after a marathon race, *Lung* 181 (2) (2003) 89-95.
- [29] G.J. Rietjens, H. Kuipers, J.J. Adam, W.H. Saris, et al., Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue, *Int. J. Sports Med.* 26 (1) (2005) 16-26.
- [30] A. Yusof, R.M. Leithauser, H.J. Roth, H. Finkernagel, et al., Exercise-induced hemolysis is caused by protein modification and most evident during the early phase of an ultraendurance race, *J. Appl. Physiol.* 102 (2) (2007) 582-586.
- [31] J.M. Baker, M. De Lisio, G. Parise, Endurance exercise training promotes medullary hematopoiesis, *FASEB J.* 25 (12) (2011) 4348-4357.

- [32] P.P. Biancotti, A. Caropreso, G.C. Di Vincenzo, G.P. Ganzit et al., Hematological status in a group of male athletes of different sports, *J. Sports Med. Phys. Fitness* 32 (1) (1992) 70-75.
- [33] T. Pottgiesser, T. Ehteler, P.E. Sottas, M. Umhau, et al., Hemoglobin mass and biological passport for the detection of autologous blood doping, *Med. Sci. Sports Exerc.* 44 (5) (2012) 835-843.
- [34] A.L. Isotton, R. Wender, M.A. Czepielewski, Influências da reposição de estrógenos e progestágenos na ação do hormônio de crescimento em mulheres com hipopituitarismo, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52(5) (2008) 901-916.
- [35] J.D.Wallace, R.C.Cuneo, R. Baxter, H.Orskov, et al., Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potencial test for GH abuse in sport, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (10) (1999) 3591-3601.
- [36] H. Gabriel, L. Schwarz, G. Steffens, W. Kindermann, Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities, *Int. J. Sports Med.* 13 (5) (1992)359-366.
- [37] M. Gimenez, T. Mohan-Kumar, J.C. Humbert, N. De Talance et al., Leukocyte, lymphocyte and platelet response to dynamic exercise. Duration or intensity effect?, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 55 (5) (1986) 465-470.
- [38] P.O. Iversen, A. Stokland, B. Rolstad, H.B. Benestad, Adrenaline-induced leucocytosis: recruitment of blood cells from rat spleen, bone marrow and lymphatics, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 68 (3) (1994) 219-227.
- [39] S. Merchav, I. Tatarsky, Z. Hochberg, Enhancement of human granulopoiesis in vitro by biosynthetic insulin-like growth factor I/somatomedin C and human growth hormone, *J. Clin. Invest.* 81 (3) (1988) 791-797.
- [40] W.J. Murphy, G. Tsarfaty, D.L. Longo, Growth hormone exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts the myelosuppressive effects of azidothymidine, *Blood* 80 (6) (1992) 1443-1447.

[41] N. Hattori, Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system, *Growth Horm IGF Res.* 19 (3) (2009) 187-97.

[42] I. Kampfmann, N. Bauer, S. Johannes, A. Moritz, Differences in hematologic variables in rats of the same strain but different origin, *Vet. Clin. Pathol.* 41 (2) (2012) 228-34.

Tabela 1 – Valores médios e desvios-padrão das variáveis hematológicas de ratos sedentários e submetidos a treinamento físico, suplementados ou não com rhGH, Presidente Prudente, 2014.

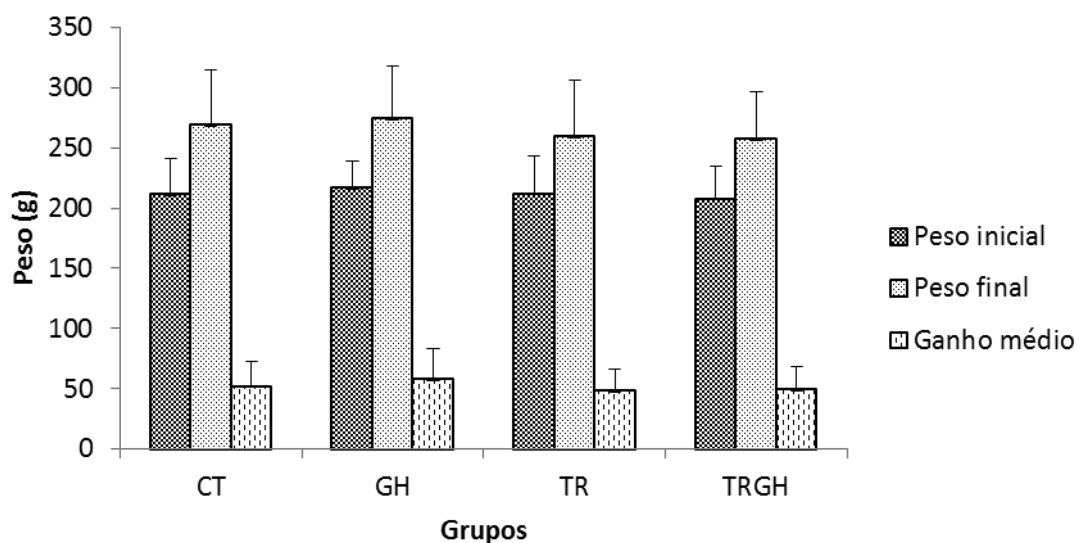
Variáveis/grupos	CT	GH	TR	TRGH
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	9,2± 0,5	9,2± 0,5	9,4± 0,5	9,3± 0,6
Hemoglobina (g/dl)	17,7± 1,0	17,5± 0,9	17,9± 0,8	17,7± 1,2
Hematócrito (%)	50,5± 3,0	50,1± 2,5	51,8± 2,7	50,7± 3,0
VCM(fl)	54,6± 1,8	54,5± 1,9	55,1± 2,1	54,8± 2,0
CHCM(%)	35,0± 0,9	34,9± 0,8	34,6± 0,7	35,0± 0,5
RDW (%)	13,2± 1,4	12,9± 1,5	12,9± 1,7	13,2± 1,6

Grupo CT (animais sem treinamento físico e sem rhGH), Grupo GH (animais sem treinamento físico e com rhGH), Grupo TR (animais com treinamento físico e sem rhGH), Grupo TRGH (animais com treinamento físico e com GH), VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), RDW (Red Cell Distribution Width).

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão de eritrócitos, Hb, Ht, VCM, CHCM e RDW de ratos machos e fêmeas (independente do grupo de estudo), Presidente Prudente, 2014.

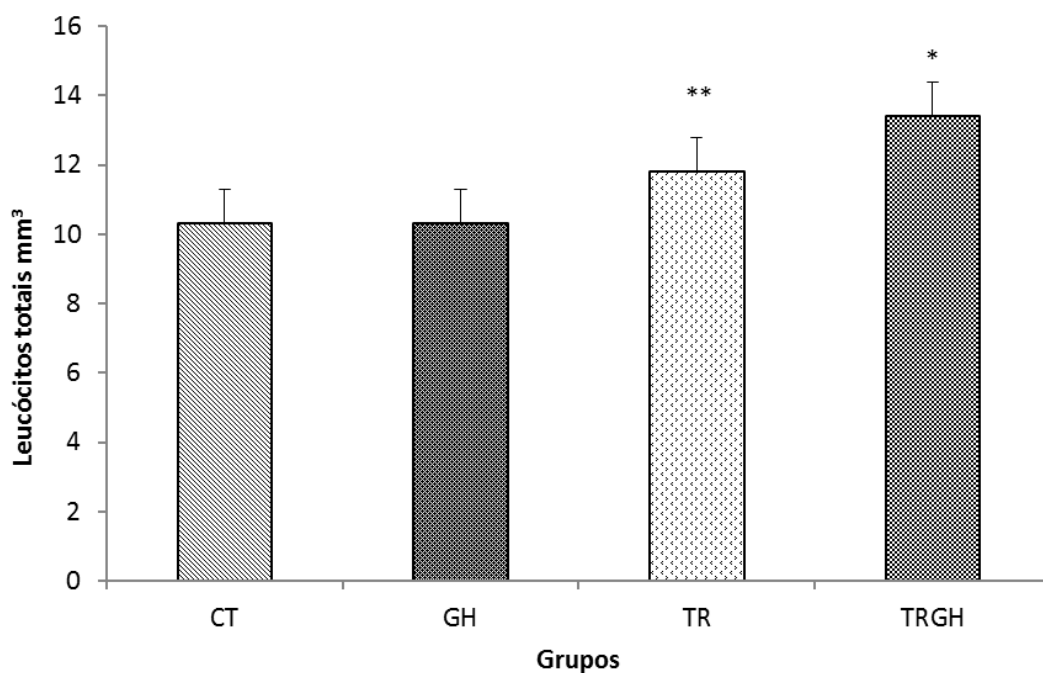
	Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (fl)	CHCM (%)	RDW (%)
Machos	9,4± 0,4	17,7± 0,7	50,2± 2,1	53,5± 1,6	35,2± 0,6	13,9± 1,2
Fêmeas	9,2± 0,4	17,7± 1,2	51,2± 3,3	55,9± 1,4	34,5± 0,7	12,2± 1,3
Valor de p	NS	NS	NS	< 0,01	< 0,01	< 0,01

NS=não significante; valores de p obtidos através do teste de Tukey



Grupo CT (animais sem treinamento físico e sem rhGH), Grupo GH (animais sem treinamento e com rhGH), Grupo TR (animais com treinamento e sem rhGH), Grupo TRGH (animais com treinamento e com GH).

Figura 1: Valores médios e desvios-padrão dos pesos (g) inicial e final de ratos sedentários e submetidos a treinamento físico, suplementados ou não com rhGH, Presidente Prudente, 2014.



Grupo CT (animais sem treinamento físico e sem rhGH), Grupo GH (animais sem treinamento e com rhGH), Grupo TR (animais com treinamento e sem rhGH), Grupo TRGH (animais com treinamento e com GH).

Figura 2: Valores médios e desvios-padrão de leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$) de ratos sedentários e submetidos a treinamento físico, suplementados ou não com rhGH, Presidente Prudente, 2014. * $P=0,02$ (teste de Tukey) quando comparados aos grupos CT e GH. ** $P>0,05$ em relação aos grupos CT e GH.