



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS

Estudante: **Lara Ferreira Paraiso**

UBERLÂNDIA, MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS

Estudante: **Lara Ferreira Paraiso**

Orientador: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P222e Paraiso, Lara Ferreira, 1986
2015 Efeito do exercício físico na estabilidade de membrana de eritrócitos
/ Lara Ferreira Paraiso. - 2015.
124 f. : il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. 3. Células - Membranas
- Teses. 4. Exercícios aeróbicos - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS

Estudante: **Lara Ferreira Paraiso**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva** (Orientador) [UFU]

Examinador: Professor Dr Morun Bernardino Neto [USP]

Examinador: Professor Dr Natássia Caroline Resende Corrêa [Fiocruz/PR]

Examinador: Professora Dr Guilherme Morais Puga [UFU]

Examinador: Professor Dr. Nádia Carla Cheik [UFU]

Data da defesa: **15/07/2015**

As sugestões da comissão examinadora e as normas do PPGGB para o formato da tese foram contempladas.

Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**
(Orientador)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Ozanita e João Carlos,
pelo apoio irrestrito em todos os momentos da minha vida,
e ao meu marido, Moisés,
pelo amor, compreensão e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho contou com a ajuda de diversas pessoas, cujo auxílio reduziu os diversos obstáculos e limitações presente durante seu desenvolvimento, fazendo com que tudo se tornasse mais fácil. Nesse sentido, gostaria agradecer em especial:

*A **Deus**, pelo Dom da Vida, por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais e por me dar força e saúde para poder realizar meus sonhos...*

*Aos meus pais, **Ozanita Ferreira e João Carlos Paraíso**, pelos valores e ensinamentos. Por me mostrarem o quanto o estudo é importante. Por sempre me incentivar a buscar meus sonhos. Por sempre orarem e torcerem por mim. Por me fazer sentir melhor em qualquer situação. Por fazerem tudo por mim, desde sempre. Obrigada, pai e mãe, por tudo!*

*Ao meu marido, **Moisés**, que está ao meu lado desde a graduação sempre me incentivando e cuidando de mim. Sendo meu ombro amigo, meu porto seguro em todos os momentos. Muito obrigada pelo carinho, amor e dedicação.*

*Ao professor **Nilson Penha Silva**, por ser este modelo de pessoa e profissional em quem tanto me espelho. Obrigada professor pelo seu enorme apoio, paciência e incentivo, que me ajudaram a vencer as dificuldades e a crescer como pessoa e profissional, a minha gratidão.*

*A minha família, minha irmã **Lorena**, minha prima **Stefânia**, minhas avós **Aurora e Fátima**, obrigada por todo auxílio e amor evidenciado ao longo da minha vida.*

*Às amigas **Ana Flávia Oliveira, Mariana Vaini e Letícia Arvelos**, obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias, por estarem sempre dispostas a ajudar em todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho. Por estarem ao meu lado, me ensinando e ajudando sempre que eu precisei. Meu muito obrigado, por todo carinho e dedicação.*

*À querida amiga **Liandra**, que me ajudou desde o início e acreditou no meu potencial.*

*Aos meus colegas de laboratório que já se foram e que estão chegando, **Alice Vieira, Juliana Huss, Lucas Cunha, Marcelo Costa, Márcia Aires, Mário Garrote, Morun***

Bernardino, Rita Netto, Rodney Paixão e Wener Barbosa, muito obrigada pela ajuda nos experimentos e pelo apoio.

*Aos colegas **Éven Aline** e **Omar Neto**, por colaborarem com as coletas de sangue em todos os experimentos. Obrigada pela ajuda e pela dedicação.*

*Obrigada a todos os **voluntários** que aceitaram a participar da pesquisa. Por tornar possível a realização deste trabalho.*

*Aos **colegas da turma de doutorado**, pelos momentos de aprendizado compartilhados.*

*Aos **professores do INGEB**, pelo estímulo ao estudo e pelos ensinamentos.*

*Aos **funcionários do INGEB** pelas colaborações no desenvolvimento do presente trabalho.*

*À **CAPES** e à **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**, pelo incentivo ao estudo e a pesquisa.*

A todos aqueles que de alguma forma tornaram realizável este percurso, permitindo a aquisição de um conjunto de vivências e conhecimento relevantes. Manifesto aqui o meu sincero agradecimento.

APOIO

Laboratório de Biofísicoquímica



Universidade Federal de Uberlândia



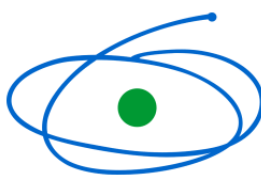
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



SUMÁRIO

	Pág.
Abreviaturas	xi
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xv
Apresentação	01
CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	02
O SANGUE HUMANO	03
ERITRÓCITOS	03
1- Estrutura e função dos eritrócitos	03
2- Hemoglobina	04
3- Formação dos eritrócitos	05
4- Metabolismo dos eritrócitos	07
5- Envelhecimento e morte dos eritrócitos	09
MEMBRANAS CELULARES	12
1- Funções das membranas celulares	12
2- Estrutura e composição da membrana dos eritrócitos	12
3- Propriedades da membrana dos eritrócitos	18
4- Avaliação da estabilidade da membrana dos eritrócitos através do teste de fragilidade osmótica (FO)	20
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO SANGUE	22
1- Hemograma	22
2- Lipidograma	23
3- Antioxidantes solúveis e enzimáticos	23
4- Enzimas indicadoras de lesão muscular	24
5- Ferro sérico	25

EXERCÍCIO FÍSICO	25
1- Aspectos gerais sobre exercício físico	25
2- Efeitos do exercício na reologia do sangue	26
2.1 Alterações hemorreológicas agudas	27
2.2 Alterações hemorreológicas crônicas	31
3- Alteração leucocitária e plaquetária em resposta ao exercício físico agudo	34
4- Estresse oxidativo e exercício	35
5- Efeitos do exercício físico nas propriedades de membrana do eritrócito	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 2 - INFLUENCE OF ACUTE EXERCISE ON THE OSMOTIC STABILITY OF THE HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE	61
RESUMO	63
ABSTRACT	64
1- INTRODUCTION	65
2- MATERIAL AND METHODS	67
2.1 Population	67
2.2 Experimental procedures	67
2.3 Blood collections	68
2.4 Determination of hematological and biochemical variables and activity of glutathione peroxidase (GPx)	68
2.5 Evaluation of osmotic stability of the erythrocyte membrane	68
2.6 Statistical analyses	69
3- RESULTS	70
4- DISCUSSION	71
5- REFERENCES	80

CAPÍTULO 3 - EFEITO DO EXERCÍCIO AGUDO E CRÔNICO NA ESTABILIDADE DE	86
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DE NADADORES DE COMPETIÇÃO	
RESUMO	88
ABSTRACT	89
1- INTRODUCTION	90
2- MATERIAL AND METHODS	91
2.1 Population	91
2.2 Protocols of training and blood collection	91
2.3 Determination of hematologic and biochemical variables	91
2.4 Evaluation of the osmotic stability of the erythrocyte membrane	92
2.5 Statistical analyzes	93
3- RESULTS	93
4- DISCUSSION	94
5- REFERENCES	103

ABREVIATURAS

%	Percentage (porcentagem)
1/H₅₀	Inverse of the NaCl concentration capable of promoting 50% hemolysis (inverso da concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise)
2,3 DGP	2,3 bisphosphoglycerate (2,3 bifosfoglicerato)
A₁ e A_{min}	Minimal average value of absorbance (absorbância com valor mínimo de hemólise)
A₂ e A_{max}	Maximal average value of absorbance (absorbância com valor máximo de hemólise)
A₅₄₀	Absorbance at 540 nm (absorbância a 540 nm)
ATP	Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
Ca²⁺	Calcium (cálcio)
CAT	Catalase
CK	Creatine kinase (creatinaquinase)
CK-MB	Creatine kinase MB (creatinaquinase MB)
Cl⁻	Chlorine (cloro)
CO₂	Carbon dioxide (dióxido de carbônico)
dl	Deciliter (decilitro)
dX	Variation in NaCl concentration responsible for total lysis of the erythrocytes (variação da concentração de sal responsável pela transição de hemólise)
EO	Osmotic stability (estabilidade osmótica)
EPO	Erythropoietin (eritropoietina)
Fe	Serum iron (ferro)
Fe²⁺	Iron in the ferrous state (ferro no estado ferroso)
Fe³⁺	Iron in the ferric state (ferro no estado férrico)
FO	Osmotic fragility test (teste de fragilidade osmótica)
Ft	Fentliter (fentolitros)
g	Grams (gramas)
GPx	Glutathione peroxidase (glutathiona peroxidase)

H⁺	Proton
H₅₀	NaCl concentration capable of promoting 50% hemolysis (concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise)
HIIE	High-intensity interval exercise (exercício intervalado de alta intensidade)
H₂O	Water (água)
H₂O₂	Hydrogen peroxide (peróxido de hidrogênio)
Hb	Hemoglobin (hemoglobina)
HbO₂	Oxihemoglobin (oxihemoglobina)
HCO₃⁻	Bicarbonate (bicarbonato)
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de alta densidade)
Ht	Hematocrit (hematócrito)
K⁺	Potassium (potássio)
LABFIQ	Laboratório de Biofísicoquímica
LDH	Total lactate dehydrogenase (lactato desidrogenase)
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de baixa densidade)
Leu	Leukocytes (leucócitos)
µg	Micrograms (microgramas)
µm²	Square micrometers (micrômetros ao quadrado)
MAS	Maximal aerobic speed (velocidade aeróbia máxima)
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin (hemoglobina corpuscular média)
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration (concentração de hemoglobina corpuscular média)
MCV	Mean corpuscular volume (volume corpuscular médio)
MetHb	Methemoglobin (metemoglobina)
MetHbRed	Methemoglobin reductase (metemoglobina redutase)
MICE	Moderate-intensity continuous exercise (exercício contínuo de intensidade moderada)
milh	Millions (milhões)
mm³	Cubic millimeter (milímetro cúbico)
Na⁺	Sodium (sódio)
NaCl	Sodium chloride (cloreto de sódio)

NADH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido)
NO	Nitric oxide (óxido nítrico)
O₂	Oxygen (oxigênio)
O₂⁻	Superoxide (superóxido)
OH[•]	Hydroxyl radical (radical hidroxila)
Ox-LDL	LDL oxidate (LDL oxidada)
pg	Picogram (picograma)
PO₄³⁻	Phosphate (fosfato)
Pt	Platelets (plaquetas)
RBC	Red blood cell (eritrócitos)
RDW	Red cell distribution width (variação de tamanho dos eritrócitos)
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas do oxigênio)
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio)
SOD	Superoxide dismutase (superóxido dismutase)
t-C	Total cholesterol (colesterol total)
T5	Maximal aerobic test of 5 minute (teste aerobio de 5 minutos)
UA	Uric acid (ácido úrico)
U/l	Units per liter (unidades por litro)
TG	Triglycerides (triglicérides)
VLDL-C	Very low density lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)
VR	Reference value (valor de referência)

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
CAPÍTULO 1		
Figura 1	Imagem do eritrócito humano por microscopia de força atômica	41
Figura 2	Estágios da formação do eritrócito	42
Figura 3	Representação esquemática da membrana da célula vermelha com as interações entre as proteínas da bicamada lipídica com as proteínas do citoesqueleto	43
Figura 4	Curva típica de lise de eritrócitos por NaCl ajustada por regressão sigmoidal	44
Figura 5	Processos de formação de produtos oxidativos no citosol do eritrócito	45
CAPÍTULO 2		
Figure 1	Sigmoidal fitting of a typical curve of hemolysis promoted by NaCl	75
Figure 2	Comparison among the values of the osmotic stability parameter $1/H_{50}$ before and after the single sessions of moderate-intensity exercise (MICE) and high-intensity interval exercise (HIIE)	76
CAPÍTULO 3		
Figure 1	Typical curve of erythrocytes lysis curve by decrease in the NaCl concentration. Data were adjusted by sigmoidal regression	99

LISTA DE TABELAS

		Pág.
	CAPÍTULO 1	
Tabela 1	Principais alterações físico-químicas que ocorrem na célula com o envelhecimento	46
	CAPÍTULO 2	
Table 1	Baseline characteristics of the study population	77
Table 2	Haematological parameters (mean \pm SD) before and after the single sessions of moderate-intensity continuous exercise (MICE) and high-intense interval exercise (HIIE)	78
Table 3	Comparison of biochemical variables before and after moderate-intensity continuous exercise (MICE) and high-intensity interval exercise (HIIE)	79
	CAPÍTULO 3	
Table 1	Characterization of training sessions	100
Table 2	Comparison between the values of variables before (pre-training) and after (post-training) each training session	101

APRESENTAÇÃO

A realização de exercício físico promove grandes alterações fisiológicas e metabólicas tanto a curto (agudas) quanto em longo prazo (crônicas).

Dentre estas alterações estão modificações na reologia do sangue, inclusive nas células vermelhas. Estudar o efeito do exercício nessas células é muito importante, uma vez que, são os eritrócitos as células responsáveis pelo transporte e entrega de oxigênio aos músculos em atividade.

Para realizar adequadamente suas funções, a célula vermelha, principalmente sua membrana, possui propriedades específicas, tais como deformabilidade, fluidez e estabilidade.

Assim sendo, investigar o efeito do exercício físico nas propriedades da membrana pode elucidar se o exercício é capaz de promover melhorias ou prejuízos na funcionalidade do eritrócito.

É nesse sentido que o presente trabalho foi desenvolvido. O Capítulo 1 trás a fundamentação teórica da tese. Nesse capítulo é feita uma breve explanação sobre o eritrócito, desde sua estrutura, formação, função, metabolismo e morte. Em seguida, é feita uma abordagem sobre a membrana do eritrócito, sua estrutura, composição, função e propriedades. Além da descrição da técnica do teste para avaliação da estabilidade de membrana e a descrição dos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados no presente estudo. Por fim, foram descritos os aspectos gerais do exercício físico e seus efeitos na reologia do sangue e nas propriedades da membrana.

No capítulo 2 foram avaliados os efeitos agudos do exercício físico de intensidade moderada e alta, na estabilidade osmótica da membrana do eritrócito. A investigação da estabilidade osmótica foi feita através do teste de fragilidade osmótica, padronizado no Laboratório de Biofísicoquímica (LABFIQ) do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

O capítulo 3 analisou o efeito do treinamento agudo e crônico, de intensidade e volume variados, na estabilidade de membrana de eritrócitos. Esse estudo foi conduzido durante 18 semanas, em que foi avaliado um grupo de atletas nadadores de alto nível.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O SANGUE HUMANO

A função primordial do sangue é manter a homeostase, suprindo todos os tecidos do corpo com as substâncias vitais para a funcionalidade e removendo o que precisa ser descartado.

O sangue é composto basicamente por células e plasma. O compartimento celular do sangue é muito complexo, pois é composto por vários tipos de células distintas, como células vermelhas ou eritrócitos (RBC), células da série branca e as plaquetas. Já o plasma é constituído por água, eletrólitos, metabólitos (uréia, glicose e aminoácidos), nutrientes, proteínas e hormônios, suspensos em uma solução salina complexa (Baskurt et al., 2007).

Existem muitos íons no sangue, tais como, sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), bicarbonato (HCO_3^-) e fosfato (PO_4^{3-}). A concentração de íons é altamente controlada, uma vez que alterações nessas concentrações podem ocasionar um desequilíbrio osmótico ou afetar o pH sanguíneo, o que prejudica a reologia do sangue e as propriedades mecânicas das células (Baskurt et al., 2007).

O sangue contém grande variedade de proteínas (simples, glicoproteínas e lipoproteínas) que são os principais componentes sólidos do plasma. Podem ser separadas em três grupos principais: fibrinogênio, albumina e globulinas (Rodwell, 2015). As proteínas exercem funções importantes no plasma. Algumas são enzimas, anticorpos, imunoglobulinas e hormônios. Atuam como transportadoras, em processos inflamatórios e de coagulação (Rodwell, 2015).

ERITRÓCITOS

1- Estrutura e função dos eritrócitos

Os eritrócitos são discos bicôncavos enucleados compostos basicamente pela proteína hemoglobina (Hb) e revestidos por uma membrana plasmática (Smith, 1995) (Figura 1). É uma célula bastante simples, pois perde as organelas durante sua diferenciação, o que limita seu tempo de vida (\cong 120 dias), pois são incapazes de reproduzir e reparar eficientemente os danos oxidativos causados a ela (Gordon-Smith, 2007, 2013).

A função primária dos eritrócitos é transportar os gases respiratórios ligados à hemoglobina (Hb). Nos pulmões, o oxigênio (O_2) se difunde pela barreira alveolar e se liga à Hb, formando a HbO_2 , em um processo denominado oxigenação. A Hb circula por todo o corpo, liberando O_2 para os tecidos e recolhendo dióxido de carbono (CO_2) produzido pelas células durante o metabolismo. O CO_2 é enzimaticamente convertido pela anidrase carbônica em HCO_3^- nos tecidos e nas células vermelhas para ser eliminado (Mairbaurl, 2013). Sendo assim, além de transportar O_2 , a Hb dos RBC atua na eliminação de CO_2 e prótons gerados pelo metabolismo tecidual (Gordon-Smith, 2007; Mohandas & Gallagher, 2008).

Além do transporte de gases, os RBC recolhem metabólitos liberados na circulação, como por exemplo, o lactato, que é liberado pelo músculo esquelético durante o exercício físico intenso. Atuam também na diminuição da resistência vascular periférica. Essa ação é realizada através da liberação de óxido nítrico (NO) e estimulando sua formação endotelial. O NO é um potente vasodilatador que leva a vasodilatação arteriolar e aumenta o fluxo sanguíneo local em determinadas situações fisiológicas, inclusive durante a realização de exercício físico (Mairbaurl, 2013).

2- Hemoglobina

A molécula de hemoglobina é formada por uma porção protéica denominada globina e uma porção que corresponde ao heme (Azevedo, 2014). Se encontra dissolvida no citosol do RBC em concentrações muito altas (~34% por peso) correspondendo a cerca de 95% do conteúdo intracelular protéico dessa célula (Rodwell, 2015).

Trata-se de uma proteína tetramérica composta por 2 cadeias α (cada uma com 141 resíduos) e 2 cadeias β (cada uma com 146 resíduos) de globina. Em cada cadeia da estrutura da proteína contém um grupo prostético heme.

O heme é composto por um anel protoporfirínico contendo um átomo de ferro no seu estado ferroso (Fe^{2+}). O ferro é um componente essencial da estrutura da proteína, pois é nesse mineral que o O_2 se liga para ser transportado (Azevedo, 2014; Gordon-Smith, 2007, 2013; Klinken, 2002; Nelson, 2014).

Os eritrócitos maduros são incapazes de sintetizar a Hb. Sua produção na eritropoese começa a partir do proeritroblasto e vai aumentando durante a maturação da célula até a fase de reticulócito (responsável por 35% da produção total).

A hemoglobina é responsável pelo transporte de gases (O_2 e CO_2). Se as moléculas de O_2 fossem transportadas diluídas em soro sanguíneo, apenas 5 ml/min poderia ser entregue aos tecidos, enquanto que a hemoglobina tem a capacidade de transportar 50 vezes mais esta quantidade, isto é 250 ml/min. O controle da afinidade da Hb com o O_2 depende de vários fatores como pH, temperatura, pressão parcial de oxigênio, pressão parcial de gás carbônico, e concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3 DGP) (Azevedo, 2014; Gordon-Smith, 2007).

3- Formação dos eritrócitos

A eritropoiese é o processo pelo qual o tecido hematopoiético da medula óssea produz as células vermelhas. Em adultos normais, aproximadamente 200 bilhões (cerca de 1% do total) de eritrócitos velhos são substituídos por eritrócitos jovens na circulação diariamente. O tempo de vida médio de um eritrócito normal é cerca de 120 dias (Koury & Ponka, 2004; Smith, 1995). Após este período, os eritrócitos são retirados da circulação pelos macrófagos presentes principalmente no baço e no fígado para serem destruídos (Azevedo, 2014).

A figura 2 ilustra a eritropoiese. Trata-se de um processo contínuo em que a proliferação e diferenciação do RBC se iniciam com as células tronco (*stem cells*) do tecido hematopoiético.

As *stem cells* constituem uma pequena população de células indiferenciadas da medula óssea (1 a 3%). Sua proliferação, diferenciação e manutenção funcional são mediadas por interleucinas e fatores estimulantes de colônias, que agem diretamente em receptores de membrana estimulando ou inibindo o crescimento celular. A interação de fatores de crescimento ou citocinas (interleucinas) com a célula tronco induz a divisão assimétrica destas células, que podem ser renovadas ou originar colônias de células progenitoras multipotenciais, que possuem potencial para expressar ambos os genes de linhagem mielóide e linfóide. A linhagem mielóide são as unidades formadoras dos eritrócitos (Klinken, 2002; Koury & Ponka, 2004).

O conjunto de eritrócitos e seus precursores medulares são conhecidos como *eritron*. O processo de produção da eritropoese pode ser dividido na fase de reprodução, responsável pelas mitoses celulares (proliferação) e na fase de maturação, caracterizada pela hemoglobinação e perda do núcleo (**Figura 2**). A eritropoiese dura cerca de 7 dias e um proeritroblasto produz 16 eritrócitos maduros (Koury & Ponka, 2004).

Os eritrócitos são liberados na circulação como reticulócitos. Estes são células anucleadas 20% maiores do que os eritrócitos maduros contendo resíduos de RNA e mitocôndrias capazes de realizar a respiração oxidativa. Os reticulócitos correspondem cerca de 1-2% das células vermelhas circulantes e permanecem no sangue periférico por 24-48 horas até se transformarem em eritrócitos (Smith, 1995). Ao passarem pelos vasos esplênicos eles perdem seus resíduos de RNA e suas organelas passando a se tornar células (RBC) maduras (Gordon-Smith, 2007).

O hormônio eritropoietina (EPO) é o principal regulador da eritropoiese. Trata-se de uma glicoproteína sintetizada nos túbulos distais e coletores corticais dos rins. Este hormônio atua na proliferação e diferenciação de células progenitoras, principalmente no estágio de transformação do proeritroblasto em eritroblasto. Promove o aumento da síntese de hemoglobina e a saída de reticulócitos do compartimento medular (Azevedo, 2014; Koury & Ponka, 2004).

A EPO não entra na célula alvo, mas age através do segundo mensageiro, o AMP cíclico, aumentando a concentração intracelular desse mediador. O aumento desse mediador nas células eritróides da medula óssea pode ser induzido por outros hormônios, tais como catecolaminas, vasopressina, hormônio do crescimento, hormônio adrenocorticotrófico, hormônios da tireóide, corticosteróides e andrógenos (Besa & Bullock, 1981; Szygula, 1990).

A EPO é produzida normalmente em pequenas quantidades, mas quando ocorre uma diminuição da entrega de oxigênio, como nas anemias, ou em situações em que uma maior quantidade de oxigênio é requisitada (hipóxia), a síntese de EPO e consequentemente o aumento na produção de eritrócitos acontece (Smith, 1995). Caso cesse a necessidade de aumentar a demanda de oxigênio pelos tecidos, a produção de EPO pelos rins é reduzida, voltando aos níveis normais (Azevedo, 2014; Koury & Ponka, 2004).

A eritropoiese é um processo altamente dinâmico e regulado. Além da EPO, outras substâncias são essenciais para uma produção adequada de células vermelhas tais como folato, cobalamina e ferro. A deficiência de algum desses três nutrientes pode levar a uma diminuição na produção de eritrócitos e, subseqüentemente, a redução no número de eritrócitos circulantes, causando anemia (Koury & Ponka, 2004).

A deficiência de folato e cobalamina está relacionada ao desenvolvimento da anemia megaloblástica, em que ocorre a presença de hemácias macrocíticas e de reticulocitopenia. Nessa doença os eritrócitos são incapazes de maturar adequadamente, fazendo com que a medula óssea aumente o número de eritroblastos e megaloblastos imaturos que sofrem apoptose precocemente (Koury & Ponka, 2004).

O ferro é um componente essencial dos eritrócitos, uma vez que esse mineral está envolvido na síntese das protoporfirinas e da globina, para a formação de Hb (Azevedo, 2014; Klinken, 2002).

A deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia (anemia ferropriva). A anemia ferropriva é causada por uma diminuição da oferta de ferro para a síntese de heme e, conseqüentemente, a formação de hemoglobina no desenvolvimento de células eritróides. A diminuição da hemoglobinizacão leva à produção de eritrócitos normais pequenos (microcíticos) e com quantidades reduzidas de hemoglobina (hipocrômicos) (Koury & Ponka, 2004).

A deficiência desses nutrientes pode ser devida a inúmeros fatores. No caso do folato e da cobalamina, as causas estão relacionadas a deficiências nutricionais, a defeitos genéticos, auto-imunes ou metabólicos que envolvem o transporte e absorção das vitaminas. Com relação ao ferro sua deficiência no organismo também pode ser nutricional, defeitos nas proteínas de transporte, na sua absorção e também devido à perda de sangue, que pode estar sendo causada por diversos motivos (Koury & Ponka, 2004).

4- Metabolismo dos eritrócitos

Por não possuírem núcleo e organelas, a energia para os eritrócitos sobreviverem provém da via glicolítica de *Embden-Meyerhof*, mas os eritrócitos também têm uma via das pentoses muito ativa.

O substrato energético nos eritrócitos é a glicose. Sua fonte é exclusivamente extracelular, pois estas células não possuem a capacidade de armazená-la (Baskurt & Meiselman, 2003). A entrada de glicose na célula ocorre por difusão facilitada através de transportadores específicos de alta afinidade, os GLUT-1 (Rodwell, 2015).

Dentro dos eritrócitos, a glicose é degradada pela via glicolítica de *Embden-Meyerhof* ou glicólise anaeróbia, com a finalidade de produzir adenosina trifosfato (ATP) (Gordon-Smith, 2007).

Outra via muito ativa nos eritrócitos é a via das pentoses, cuja importância reside na produção de moléculas de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH).

O ATP produzido é de extrema importância para os eritrócitos realizarem diversas funções relacionadas com transporte de íons (principalmente Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) o que impede a hiper-hidratação da célula. Serve também como substrato para reações envolvendo quinases e auxilia na manutenção do estado deformável dos eritrócitos, controlando o volume e a área de superfície celular (Azevedo, 2014; Baskurt & Meiselman, 2003; Gratzer, 1981).

O NADH produzido no eritrócito pode atuar como substrato da metemoglobina-redutase, capacitando-a a reduzir a metemoglobina inativa (Fe^{3+}) em hemoglobina ativa (Fe^{2+}). Essa conversão é importante, pois o ferro quando se encontra no estado férrico (Fe^{3+}) é incapaz de se ligar ao O_2 , prejudicando assim a função da molécula de Hb (Rodwell, 2015).

O agente redutor NADPH atua em seu sistema de reparo oxidativo. Ele atua como cofator da enzima glutatona redutase (que reduz a glutatona oxidada a glutatona reduzida) para proteção da hemácia contra lesões oxidativas (Azevedo, 2014).

A via glicolítica também produz 2,3-difosfoglicerato (2,3-DGP), um dos maiores moduladores alostéricos *in vivo* da afinidade entre o O_2 e a Hb. Esta enzima possui a capacidade de enfraquecer a ligação do O_2 com a Hb, permitindo sua dissociação em situações de hipóxia (Benesch & Benesch, 1967; Chanutin & Curnish, 1967). Dessa forma o 2,3-DGP atua facilitando a liberação de O_2 em tecidos onde há baixa pressão de O_2 , enquanto nos tecidos com alta pressão de O_2 (pulmão), a molécula de 2,3-DGP é deslocada do centro da Hb desoxigenada, facilitando a captação de O_2 .

Dois fatores estão envolvidos nesse processo: 1) o 2,3-DGP se liga às moléculas de Hb causando alterações conformacionais envolvidas na modulação alostérica desta proteína; 2) o aumento produção 2,3-DGP (que é um ânion intracelular incapaz de atravessar a membrana) faz com que ocorra um aumento no efluxo de íons H^+ na célula, causando uma queda no pH intra-eritrocitário. A queda do pH faz com que ocorra aumento da liberação de O_2 para os tecidos pela Hb (efeito Bohr) (Brewer, 1974; Gordon-Smith, 2007; Mulquiney & Kuchel, 1999).

5- Envelhecimento e morte dos eritrócitos

Após serem liberadas na circulação, as hemácias sofrem várias agressões mecânicas, metabólicas e osmóticas durante sua vida útil. Isso quer dizer que com o passar dos dias de vida, os eritrócitos vão perdendo pouco a pouco sua organização estrutural e suas propriedades, diminuindo assim progressivamente sua eficácia em realizar o transporte de gases (Kosower, 1993).

Por serem células anucleadas, os eritrócitos possuem um sistema muito limitado de auto-reparação. Assim sendo, alguns danos em sua estrutura ou nos componentes presentes na membrana celular muitas vezes não podem ser reparados (Clark, 1988) e esses danos irreversíveis vão se acumulando com o envelhecimento do RBC.

A **tabela 1** resume as principais alterações que ocorrem no RBC ao longo de sua vida útil. De uma forma geral ocorre uma perda progressiva das propriedades do RBC. Ele se torna menos deformável, menos fluído e mais rígido. Essas mudanças são reflexos dos processos que a célula realiza para desempenhar suas funções.

Se compararmos as características físicas e mecânicas dos eritrócitos jovens em relação aos eritrócitos velhos, existem algumas diferenças bem definidas. Uma delas é o aumento da densidade e diminuição do volume da célula (Bartosz, 1991; Clark, 1988; Waugh et al., 1992). Esses eventos estão associados à perda de eletrólitos, o que leva a perda de água e desidratação na célula (Fortier et al., 1988; Shiga et al., 1985).

Alguns autores relatam também diferenças no tamanho do RBC jovem comparado com o senescente, indicando uma perda progressiva no tamanho da célula (Cordero, Rodriguez, & Romero, 2004) e também diminuição da área de superfície (Waugh et al., 1992). Essas alterações estão relacionadas com processos de microvesiculação da

membrana, que encapsula porções do citoplasma. A perda desses fragmentos da membrana é que faz com que a célula se torne menor e com menor volume (Bartosz, 1991).

Outra alteração que acontece é a mudança na morfologia da célula (Cordero et al., 2004). Essa alteração está associada a mudanças nas interações entre as proteínas do citoesqueleto e as proteínas transmembrânicas, o que afeta a forma e prejudica a deformabilidade da célula (Cordero et al., 2004).

Com o envelhecimento do RBC ocorre alterações na proteína banda 3. Suas porções intra-membranas se agregam na superfície da célula e passam a ser uns dos primeiros marcadores morfológicos para a eliminação celular (Bartosz, 1991; Cordero et al., 2004).

De uma forma geral, alterações no comportamento das proteínas estão relacionadas ao aumento da densidade e diminuição da deformabilidade nos eritrócitos senescentes. Durante o processo de envelhecimento, ocorre um aumento nos processos de agregação, glicação e degradação protéica (Clark, 1988; Smith, 1995).

Os agregados protéicos são formados principalmente através de ligações cruzadas com as proteínas da membrana entre si, com a Hb e com as proteínas do citoesqueleto. Esse processo é mediado por ação enzimática, por ação do malondialdeído e outros produtos da peroxidação lipídica com os grupos amino das proteínas. Já a glicação ocorre de forma não enzimática devido ao contato contínuo das proteínas com açúcares, principalmente a glicose (Bartosz, 1991).

O dano oxidativo na célula vermelha é muito grande, esse é um dos principais fatores que levam à morte celular (Danon & Marikovsky, 1988; Lutz et al., 1988). Um processo muito frequente é a peroxidação dos lipídios da membrana. Os produtos desse processo vão se acumulando progressivamente na membrana dos eritrócitos, causando danos estruturais e morfológicos (Bartosz, 1991; Schroeder, 1984).

Um dos danos estruturais decorrentes dos processos de peroxidação lipídica é a diminuição da assimetria dos lipídios da membrana. Essa é uma alteração importante, pois a exposição da fosfatidilserina na face extracelular da membrana é um dos marcadores para a remoção das células senescentes pelos macrófagos (Fadok et al., 1998; Fadok et al., 2001; Kuypers & de Jong, 2004).

Todos esses processos contribuem para o envelhecimento do RBC e a diminuição de sua deformabilidade. Embora a alteração na deformabilidade parecesse ser o principal determinante do tempo de vida dos RBC, os fatores exatos que regulam a sobrevivência e promovem o sequestro de células senescentes por macrófagos teciduais não são totalmente conhecidos, e tudo indica ser um processo de causas multifatoriais ([Danon & Marikovsky, 1988](#)).

Quando os danos no RBC chegam a um ponto crítico, a célula se arreventa. Se esse processo ocorrer na corrente sanguínea é denominada hemólise intravascular; se ele ocorrer no interior do baço, ele recebe o nome de hemólise extravascular, pois a circulação sanguínea nesse órgão é aberta ([Wallace & Blakemore, 1970](#)).

Cerca de 200 bilhões de eritrócitos são catabolizados por dia. Após o tempo de vida útil, os eritrócitos senescentes são sequestrados pelo baço e a remoção é responsabilidade dos macrófagos mononucleares do sistema retículo endotelial (baço, fígado e medula óssea) onde eles são destruídos ([Bartosz, 1991](#); [Bratosin et al., 1998](#); [Rifkind, 1966](#)).

Os macrófagos são seletivos e possuem a habilidade de distinguir células maduras de senescentes. Essa distinção é feita através de sinais específicos que vão surgindo na célula senescente. Dentre os sinais estão o surgimento de antígenos específicos na superfície das células envelhecidas ([Signorini et al., 1995](#)), a presença de receptores ou o aparecimento na superfície da membrana de estruturas que normalmente têm localização transmembrana ou na face interior da membrana ([Bartosz, 1991](#); [Bratosin et al., 1998](#)).

No interior do macrófago, o RBC é lisado e seu conteúdo é reciclado. A globina é degradada em seus aminoácidos componentes para posterior reutilização. O heme proveniente da Hb é degradado enzimaticamente, liberando monóxido de carbono e ferro como subprodutos ([Coburn & Kane, 1968](#)). O ferro degradado retorna ao plasma e se liga à transferrina, sendo reutilizado, o que representa a principal fonte de ferro do organismo ([Rodwell, 2015](#)). Já a protoporfirina é clivada para formar biliverdina, que, por sua vez é reduzida à bilirrubina. A bilirrubina liga-se a albumina (bilirrubina indireta) e segue pela circulação até o fígado, onde é conjugada com duas moléculas de ácido glucurônico (bilirrubina direta) através da enzima glicuronil-transferase. Parte da

bilirrubina direta é eliminada pelas fezes na forma de estercobilinogênio e o restante é reabsorvido e eliminado nos rins como urobilinogênio (Azevedo, 2014; Coburn, Williams, & Forster, 1964; Gordon-Smith, 2007; Motta, 2009).

MEMBRANAS CELULARES

1- Funções das membranas celulares

As membranas são estruturas semipermeáveis que definem o limite externo das células e regulam o trânsito de moléculas através de sua estrutura. Atuam como transportadoras de substâncias (água, íons) e de gases (O₂ e CO₂) para dentro e fora das células (Agré, 2006; Bratosin et al., 1998). Também funcionam como receptores, pois captam sinais extracelulares e desencadeiam alterações moleculares na célula, além de possuírem funções de catálise e de transdução de sinais (Guidotti, 1972; Nelson, 2014).

2- Estrutura e composição da membrana dos eritrócitos

As membranas das células eucariotas seguem o modelo do mosaico fluído, proposto por Singer e Nicolson na década de 70 (Singer & Nicolson, 1972). Nesse modelo, a membrana das células é constituída por uma bicamada de lipídios em que proteínas e glicoproteínas estão interligadas (**Figura 3**).

Cerca de 52% da massa da membrana é composta por proteínas, 40% de lipídios e 8% de carboidratos (Mohandas & Evans, 1994).

Os componentes da membrana estão associados ocorrendo interações proteína-proteína e interações do tipo lipídio-proteína (Chasis & Shohet, 1987). O mosaico é fluído, uma vez que as interações entre seus componentes são não covalentes, deixando as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas livres para se movimentarem lateralmente no plano da membrana (Nelson, 2014).

Os carboidratos são as moléculas em menor número na membrana, estão associados principalmente a lipídios (glicolipídios) ou a proteínas (glicoproteínas). Agem contribuindo para manter a carga negativa externa da membrana e atuam parcialmente como antígenos de grupo sanguíneos (Bratosin et al., 1998; Shiga et al., 1990).

Os maiores constituintes lipídicos da membrana são os fosfolipídios, os esteróis e em menores quantidades os glicolipídios (Cooper, 1978). Todas as três classes de lipídios

são moléculas anfipáticas com uma cabeça polar (hidrofílico) e uma cauda hidrofóbica (Lodish, 2012).

A composição de fosfolipídios da membrana compreende basicamente fosfatidilcolina (30%), fosfatidiletanolamina (28%), esfingomielina (25%) e fosfatidilserina (14%). São estes componentes que formam a bicamada lipídica, sendo distribuídos assimetricamente na membrana (Lucy, 1972; Mohandas & Evans, 1994; Singer & Nicolson, 1972).

A organização dos fosfolipídios na membrana é estrategicamente desenvolvida para criar uma barreira impermeável, que impede a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana. A maioria dos aminofosfolipídios, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e da fosfatidiletanolamina, estão distribuídos na face interna enquanto que a fosfolipídios de colina, fosfatidilcolina e esfingomielina, estão localizados predominantemente na face externa (Schroeder, 1984). A distribuição deve ser assimétrica para a manutenção da forma e para modular as propriedades biofísicas da membrana, inclusive a estabilidade mecânica. Para isso, a organização dos lipídios na membrana é enzimaticamente regulada (Manno et al., 2002).

Os esteróis são outro tipo de lipídios que compõem estruturalmente a membrana plasmática. A estrutura característica desse grupo de lipídios é o núcleo esteróide rígido constituído por quatro anéis fundidos entre si. A estrutura planar rígida do núcleo de esteróides reduz a liberdade de movimentação por rotação das moléculas que são vizinhas a ele, fazendo com que elas assumam sua conformação totalmente estendida reduzindo assim a fluidez no interior da bicamada (Nelson, 2014).

No caso da membrana dos eritrócitos, o esterol predominante é o colesterol. Trata-se de uma estrutura anfipática com um grupo cabeça polar e um corpo hidrocarbonado não polar. Este componente é encontrado predominantemente na face externa da monocamada da membrana (Schroeder, 1984). Em quantidades adequadas, o colesterol atua como um modulador de várias funções na membrana, tais como, transporte, trocas iônicas, além de regular a ação de receptores e da ação de enzimas na membrana (Yeagle, 1985, 1991).

O colesterol é que confere às camadas lipídicas maior espessura e rigidez, uma vez que sua parte hidrofóbica contribui para o aumento da afinidade entre os fosfolipídios.

Na verdade, são as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio que ocorre entre os lipídios é o que mantêm a integridade da bicamada permitindo a movimentação celular da membrana sem mantê-la rígida (Cooper, 1978).

Outras funções do colesterol na membrana estão relacionadas com as propriedades de permeabilidade, estabilidade e de fluidez. Para a manutenção dessas propriedades é preciso haver certa proporção de fosfolipídios em relação a colesterol na membrana. Um aumento dos níveis de colesterol no meio afeta sua proporção na membrana, e esse aumento está diretamente correlacionado a uma redução da fluidez e da permeabilidade e aumento da rigidez da membrana, devido ao núcleo rígido do anel esteróide, o qual diminui a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono (Rodwell, 2015). Essas alterações prejudicam a célula a desempenhar adequadamente suas funções fazendo com que estas sejam removidas precocemente pelo baço para serem destruídas (Cooper, 1978; Shiga, Maeda, Kon, 1990). Além dos esteróis, o teor de ácidos graxos saturados e insaturados nos fosfolipídios também influencia na fluidez e rigidez da membrana plasmática. Quanto maior a quantidade de ácidos graxos saturados, maior é a rigidez devido à quantidade de interações de van der Waals entre as cadeias alinhadas das caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios. Por sua vez, um maior teor de ácidos graxos insaturados *cis*-configurados aumenta a fluidez da membrana (Rodwell, 2015).

As proteínas da membrana plasmática se dispõem de duas formas: mergulhadas na bicamada (proteínas intrínsecas ou integrais) ou associadas à superfície interna ou externa da bicamada (proteínas extrínsecas ou periféricas) (Lague, Zuckermann, & Roux, 2001; Shiga, Maeda, Kon, 1990).

As proteínas integrais estão fortemente ligadas à membrana por meio de interações hidrofóbicas entre os lipídios na bicamada e os domínios hidrofóbicos dessas proteínas. Elas possuem relevância direta na integridade estrutural da membrana, pois se ligam através de seus domínios citoplasmáticos a proteínas presentes no citoesqueleto (An & Mohandas, 2008). Além disso, desempenham várias funções na membrana, como sinalização, transporte (de cátions, água e ureia) e adesão das células vermelhas com outras células. As proteínas integrais mais estudadas são a banda 3 e as glicoforinas.

Banda 3 é a maior proteína integral da membrana correspondendo entre 15-20% da quantidade total de proteína. As principais funções da banda 3 são: a) fazer a ligação

entre a bicamada lipídica com o citoesqueleto, através de interações do seu domínio citoplasmático com as proteínas presentes no citoesqueleto (anquirina, proteína 4.1 e proteína 4.2) e b) realizar o transporte de anions através da membrana (Low, 1986; Mohandas & Evans, 1994).

São quatro glicoproteínas pertencentes à classe das glicoforinas: A, B, C e D. Elas correspondem a cerca de 2% do total de proteínas das membranas dos eritrócitos. Por serem ricas em ácido siálico, são chamadas também de sialoglicoproteínas. A presença de resíduos de ácido siálico confere uma forte carga negativa líquida à superfície da célula; esta carga é funcionalmente importante na redução da interação entre as células vermelhas, bem como das células vermelhas com outras células, incluindo endotélio vascular (Chasis & Mohandas, 1992).

Dentre as funções das glicoforinas estão o transporte de especificidades de alguns grupos sanguíneos. A glicoforina A transporta a especificidade do grupo sanguíneo MN, a glicoforina B a especificidade Ss, e glicoforina C a especificidade de grupo sanguíneo Gerbich (Reid et al., 1990).

Estas proteínas integrais também atuam como ligantes ao citoesqueleto da membrana, bem como transportadoras nas células vermelhas (Mohandas & Evans, 1994).

Existem também associadas à membrana as proteínas periféricas, que estão localizadas na superfície citoplasmática da bicamada lipídica e podem ser facilmente liberadas da membrana através de uma simples manipulação de força iônica do meio, pois só se associam à membrana por meio de interações eletrostáticas ou pontes de hidrogênio que estabelecem com domínios hidrofílicos das proteínas integrais e com os grupos polares da cabeça dos lipídios de membrana (Nelson, 2014). As proteínas periféricas incluem espectrina, actina e proteína 4.1R, constituintes do citoesqueleto da membrana (Mohandas & Evans, 1994).

O citoesqueleto é uma rede de proteínas que são responsáveis pela integridade e elasticidade da membrana (Barthes-Biesel, 1996; Chasis & Shohet, 1987). Controla o tamanho, a forma, a flexibilidade e a durabilidade da membrana do RBC, como também as interações célula-célula e a fusão da membrana. Qualquer alteração nesse complexo modifica profundamente a morfologia do RBC e causa a fragmentação da membrana em pequenas vesículas (Bratosin et al., 1998).

O citoesqueleto é composto por três proteínas principais: espectrina, actina e proteína 4.1 (Bennett, 1985, 1990a, 1990b). Encontra-se associado à bicamada lipídica citosólica por meio de interações proteína-proteína e lipídio-proteína (Figura 3).

A espectrina é a maior proteína do citoesqueleto. É composta por duas cadeias polipeptídicas, a α - e a β - espectrina, que são alinhadas de forma antiparalela e interligadas formando um dímero. Um dímero interage com outro formando tetrâmeros. A forma que a espectrina se associa confere a esta molécula flexibilidade tanto da proteína quanto da membrana. Esta proteína pode se associar de diferentes formas: a outra espectrina, à anquirina, à actina ou à proteína 4.1 (An & Mohandas, 2008; Rodwell, 2015; Smith, 1995).

Além da associação entre as proteínas, ocorrem associações entre a espectrina e a fosfatidilserina, presente na camada interna da membrana. Essa associação é extremamente importante, pois é responsável por regular a estabilidade mecânica do RBC (Manno et al., 2002).

Anquirina é uma proteína em forma de pirâmide que se liga à espectrina. Por sua vez, a anquirina liga-se fortemente a banda 3 para assegurar a ligação de espectrina à membrana (An & Mohandas, 2008; Rodwell, 2015).

A actina existe nas células vermelhas como filamentos de dupla hélice e se liga principalmente à proteína 4.1 (Rodwell, 2015).

A proteína 4.1 é uma proteína globular que se liga fortemente na extremidade da cauda da espectrina, perto do local de ligação da actina, formando assim os complexos juncionais espectrina-actina-proteína 4.1 (Figura 3). A proteína 4.1 também se liga a proteínas integrais como as glicoforinas A e C e a certos fosfolípidios, juntando assim o complexo das proteínas do citoesqueleto com a bicamada lipídica (An & Mohandas, 2008; Rodwell, 2015). O complexo juncional é um importante regulador da integridade mecânica da membrana (An & Mohandas, 2008).

A ligação entre a bicamada e o citoesqueleto é essencial para a membrana plasmática ser capaz de sofrer os rearranjos conformacionais para a célula realizar suas funções, essa propriedade é a deformabilidade. (Chasis & Mohandas, 1986). Para um funcionamento ideal, as associações entre as proteínas da membrana e do citoesqueleto

devem ser adequadas e a proximidade da rede do citoesqueleto com a bicamada deve ser criticamente regulada (Mohandas & Evans, 1994).

A distribuição assimétrica dos fosfolipídios na bicamada também contribui para a ancoragem do citoesqueleto na membrana dos eritrócitos. Os fosfolipídios fosfatidilserina e fosfatidilinositol, que estão localizados no interior da bicamada, interagem com a espectrina (fosfatidilserina) e com a proteína 4.1R (fosfatidilinositol). Estudos revelam que a ligação entre espectrina e fosfatidilserina melhora a estabilidade mecânica dos eritrócitos (Manno et al., 2002) enquanto que a ligação entre fosfatidilinositol e proteína 4.1R regula as interações transmembrânicas entre a proteína banda 3 e a glicoforina C (An & Mohandas, 2008; Mohandas & Gallagher, 2008).

Tanto as ligações verticais quanto as laterais das proteínas do citoesqueleto com a bicamada são importantes para a manutenção das propriedades de elasticidade, deformabilidade e coesão da membrana. A perda das ligações com citoesqueleto resulta em perda de lipídios e redução da área de superfície da membrana, o que compromete a habilidade da célula se deformar durante a circulação, além de ser um agravante que contribui diretamente para a redução da sobrevivência do eritrócito e remoção precoce dos eritrócitos pelo baço, ocasionando anemia no indivíduo (Mohandas & Gallagher, 2008).

Algumas desordens genéticas estão associadas diretamente a danos nas proteínas do citoesqueleto ou das ligações entre o citoesqueleto e a bicamada. Nessas doenças, as células vermelhas apresentam forma diferente de sua típica forma bicôncava, sendo esféricas (esferocitose hereditária), elípticas (eliptose hereditária) ou ovais (ovalocitose hereditária) (An & Mohandas, 2008; Perrotta, Gallagher, & Mohandas, 2008).

As alterações na estrutura dos RBC nessas doenças estão associadas à deficiência ou anormalidade da espectrina, de outras proteínas do citoesqueleto ou das proteínas da bicamada. A consequência dessas alterações na forma dos eritrócitos é a redução da área de superfície dessas células, o que prejudica a deformabilidade, a regulação do volume da célula e promove sua destruição precoce, causando anemia de origem hemolítica. O principal tratamento dessas condições é feito pela retirada cirúrgica do baço, pois assim os eritrócitos são mantidos por mais tempo na circulação, amenizando o quadro de anemia hemolítica (An & Mohandas, 2008; Rodwell, 2015).

3- Propriedades da membrana dos eritrócitos

O formato e a organização estrutural das membranas dos eritrócitos são responsáveis pela habilidade dessas células de passar por longas deformações reversíveis durante sua vida útil na circulação e se manterem estruturalmente íntegras. A membrana dessa célula é altamente elástica, responde rapidamente as tensões aplicadas e é capaz de se estender amplamente sem se fragmentar. As características peculiares da membrana são consequência direta da sua composição estrutural e de interações que ocorrem entre a estrutura da bicamada e a rede do citoesqueleto (An & Mohandas, 2008).

Uma propriedade essencial para os eritrócitos exercerem sua função primária de entrega de O₂ é a deformabilidade. Essa propriedade está relacionada com a habilidade da célula mudar sua forma em resposta a uma tensão. A deformação dos eritrócitos envolve mudanças na curvatura, uma deformação uniaxial, ou na área de expansão (Chien, 1987). A tensão de deformação pode ser aplicada dentro ou fora da célula, sendo que a extensão, o nível e a forma de deformação dependem da magnitude, frequência e da direção do stress aplicado (Chien, 1987).

A deformabilidade determina a extensão da alteração da membrana. Quanto maior a deformabilidade menor será a tensão aplicada na célula para permitir a sua passagem entre os capilares de diâmetro muito menor do que as dimensões celulares (Chasis & Mohandas, 1986).

Durante a deformação passiva reversível, a membrana muda sua forma, mas mantém constante sua área de superfície. Para que isso ocorra, as proteínas do citoesqueleto devem ser capazes de se rearranjarem, o que depende de outra propriedade da membrana: a viscoelasticidade (Stuart & Nash, 1990). Esta propriedade está relacionada com a capacidade que as proteínas do citoesqueleto, como a espectrina, possuem de se dobrarem (durante a tensão) e desdobrarem (após a tensão). Perturbações das associações intermoleculares ou intramoleculares da espectrina podem limitar a capacidade de expansão da célula. De maneira similar, um aumento da associação entre as proteínas do citoesqueleto e as proteínas integrais pode prejudicar a habilidade do citoesqueleto de se reorganizar (Chasis & Shohet, 1987).

Além deste comportamento dinâmico do citoesqueleto da membrana, para a célula se deformar deve haver também a interação das complexas propriedades físicas da célula que são inter-relacionadas, tal como a geometria celular e as propriedades reológicas dos fluidos intracelulares.

A geometria celular relaciona o tamanho, a forma e a relação área x volume do eritrócito (Stuart & Nash, 1990). O eritrócito humano normal em repouso é um disco bicôncavo com um diâmetro de aproximadamente 8 μm e um volume corpuscular médio (MCV) de aproximadamente 90 fl. A área de superfície média dessa célula é de aproximadamente 140 μm^2 , a qual é consideravelmente maior do que os 97 μm^2 que são requeridos para cobrir um volume de aproximadamente 90 fl. O formato bicôncavo e o excesso da área de superfície são estrategicamente elaborados para a célula ser capaz de deformar e se espremer em capilares muito menores do que seu diâmetro. Se a célula fosse esférica, ela seria incapaz de se deformar sem sofrer mudanças no volume ou na área de superfície. É a combinação dos dois fatores (formato e excesso de área de superfície) que permite à célula ser capaz de se deformar uniaxialmente, permanecendo com a sua área de superfície e volume constantes sob uma variedade de condições fisiológicas que incluem a deformação durante a passagem nos microcapilares e entre fendas estreitas dos sinusóides esplênicos (Stuart & Nash, 1990).

A deformabilidade também é influenciada pelas características reológicas dos fluidos intracelulares. Essas propriedades são relacionadas às propriedades físico-químicas, medidas através da viscosidade do fluido intracelular, e pela concentração de hemoglobina, medida pela concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC). Quanto maior a viscosidade da célula, menor será sua deformabilidade (Barthes-Biesel, 1996; Chasis & Mohandas, 1986).

A perda de água pela célula é a causa mais comum do aumento da viscosidade. O maior regulador do conteúdo de água intracelular é o potássio. Situações que promovem o efluxo deste cátion afetam diretamente a viscosidade da célula, causando desidratação. A concentração de K^+ pode estar baixa nos eritrócitos em algumas circunstâncias como anemia falciforme, estresse mecânico e estresse oxidativo (Stuart & Nash, 1990).

Para realizar suas funções de troca, transporte e recepção de sinais, as membranas celulares devem ter um nível adequado de fluidez. Essa é outra propriedade

dos eritrócitos, relacionada com a capacidade de mobilidade dos lipídios dentro do núcleo hidrofóbico da membrana. Assim sendo, a fluidez da membrana é fortemente influenciada pela relação fosfolipídios x colesterol (Cooper, 1977, 1978; Tsuda et al., 2003).

Além de deformáveis e fluídos, os eritrócitos devem resistir à fragmentação. Para isso ocorra, a membrana dessas células contém outra importante propriedade, que é a estabilidade. Uma célula é estável quando é capaz de circular sem se fragmentar frente às tensões normais que ocorrem na circulação (estabilidade mecânica) ou ser capaz de resistir à expansão de volume em um meio hipotônico (estabilidade osmótica) ou sob a ação de agentes químicos (estabilidade química). Sendo assim, a estabilidade pode ser definida como a máxima medida da deformação de uma membrana que pode sofrer antes de sofrer lise. Uma redução anormal na estabilidade faz com que a célula sofra lise com maior facilidade (Chasis & Shohet, 1987).

Os fatores já relatados, que determinam e influenciam as propriedades da membrana também afetam a estabilidade dos eritrócitos. Na verdade, a estrutura da membrana e suas propriedades são um processo integrado com todos os componentes agindo sinergicamente. Qualquer desequilíbrio causado por doenças, hiperingestão de ácidos graxos insaturados ou saturados, defeitos genéticos e outros fatores que causam mudanças estruturais ou alterações intra- ou extracelulares no meio, irá afetar o estado estável da membrana dos eritrócitos, prejudicando assim sua funcionalidade no fluxo sanguíneo e perfusão tecidual (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005).

4- Avaliação da estabilidade da membrana dos eritrócitos através do teste de fragilidade osmótica (FO)

A osmolaridade do plasma sanguíneo dos mamíferos é mantida entre 270-310 mosmol. As maiores substâncias que regulam essa propriedade são os cátions, como por exemplo, o sódio (136–145 mM) e o potássio (3.6–5.4 mM), e os anions, como o cloro e o hidrogenocarbonato (Walski et al., 2014).

O grau de resistência dos eritrócitos à lise, ou seja, a estabilidade osmótica (EO) em função da diminuição da concentração de cloreto de sódio (NaCl) no meio é a base do teste de fragilidade osmótica (FO).

Experimentalmente, o teste de FO consiste em mensurar a intensidade da liberação de hemoglobina em solução produzida com eritrócitos suspensos em um meio hipotônico com diferentes concentrações de NaCl. O teste é baseado no monitoramento da liberação da Hb, quantificado por espectrofotometria a 540 nm. A magnitude da absorbância é proporcional à extensão da lise dos eritrócitos (Walski et al., 2014).

Através do teste podemos gerar um gráfico da absorbância em relação à concentração de NaCl. Fazendo um ajuste no gráfico por regressão sigmoidal através da equação de Boltzmann é possível determinar os parâmetros para avaliar a fragilidade osmótica da membrana das células vermelhas (Figura 4) (Penha-Silva et al., 2007). São eles:

- H_{50} : que é a concentração de NaCl que promove lise de 50% dos eritrócitos. Usualmente este parâmetro está relacionado à fragilidade osmótica, e como o objetivo do nosso estudo foi investigar a estabilidade osmótica, trabalhamos com a inversão deste parâmetro, ou seja, $1/H_{50}$.
- dX : que representa a variação da concentração de sal responsável pela transição de hemólise;
- A_1 e A_2 , que representam o platô mínimo (A_{\min}) e máximo (A_{\max}) da absorbância em 540 nm (A_{540}).

Existem inúmeras vantagens em usar este teste para avaliar a estabilidade nos eritrócitos, dentre elas simplicidade, confiabilidade e baixo custo.

O teste de fragilidade osmótica é amplamente utilizado para elucidar a influência de diferentes fatores na propriedade osmótica de eritrócitos, tais como, tensão de cisalhamento, hemólise mecânica (Sowemimo-Coker, 2002), doenças (Bartosz, 1991; de Arvelos et al., 2013; Mascarenhas Netto et al., 2014; Massaldi, Richieri, & Mel, 1988), idade (de Freitas et al., 2014; Penha-Silva et al., 2007), temperatura (Pribush et al., 2003), uso de medicamentos, estresse oxidativo (Walski et al., 2014) e outros (Lemos et al., 2011; Paraiso et al., 2014; Walski et al., 2014).

Avaliar a estabilidade osmótica dos eritrócitos é muito importante, uma vez que mudanças na resistência osmótica estão relacionadas a alterações no número, na forma e

outros parâmetros dessas células (Penha-Silva et al., 2007). Além disso, a avaliação da estabilidade osmótica *in vitro* fornece importantes informações a respeito do comportamento e das características das células *in vivo*, permitindo assim o estabelecimento de correlações entre essa variável e outros parâmetros sanguíneos.

Estudar as propriedades da membrana dos eritrócitos é muito vantajoso, pois é fácil monitorar sua lise, sua membrana é facilmente isolada, sendo livre de contaminação de outras células e organelas, e também porque as alterações da membrana refletem nas propriedades da célula em sua totalidade (Massaldi et al., 1988; Steck, 1974).

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO SANGUE

O hemograma e a análise de parâmetros bioquímicos do sangue fornecem uma avaliação geral do paciente. Através da realização desses exames laboratoriais é possível evidenciar aspectos quantitativos e qualitativos das células sanguíneas e de outras importantes substâncias do sangue (Azevedo, 2014).

1- Hemograma

O hemograma é um conjunto de análises laboratoriais que evidenciam aspectos quantitativos e qualitativos das células sanguíneas (série vermelha, branca e plaquetas). O hemograma completo fornece os seguintes parâmetros, com os respectivos valores de referência (VR):

- 1- **Contagem de glóbulos vermelhos** (VR: homens: 4.5 a 5.5 milh/mm³, mulheres: 4 a 5 milh/mm³) **e brancos** (VR leucócitos: adultos: 5 a 10.000/mm³);
- 2- **Hematócrito** (VR: homens: 40-50%, mulheres: 34-45%);
- 3- **Dosagem de hemoglobina** (VR: homens: 14 a 18 g/dl, mulheres: 12 a 16 g/dl);
- 4- **Cálculo dos índices hematimétricos** (MCV – VR: 80-97 fl; MCH – VR: 27 a 32 pg; MCHC – VR: 32 a 36%; RDW – VR: 11 a 15%);
- 5- **Contagem de plaquetas** (Pt – VR: 135.000 a 350.000 mm³).

A contagem dos glóbulos vermelhos, brancos e de plaquetas consiste na determinação no número dessas células por mm³ de sangue.

O hematócrito da amostra de sangue constitui a medida da razão entre o volume de eritrócitos e o volume de sangue total. O resultado em porcentagem (%) exprime a concentração de células obtidas por centrifugação em um dado volume de sangue.

A dosagem da Hb está relacionada diretamente com o conteúdo e coloração do RBC. Um baixo valor desse parâmetro está relacionado com processos anêmicos.

O volume corpuscular médio (MCV) indica o tamanho médio do RBC. O MCV aumentado ou diminuído em relação ao valor numérico de referência está associado, respectivamente, à macrocitose ou microcitose.

A hemoglobina corpuscular média (MCH) avalia a coloração média de hemoglobina. A intensidade da coloração constitui um indicador aproximado da quantidade de hemoglobina existente no RBC.

A concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) avalia a concentração média de hemoglobina.

O coeficiente de variação do tamanho dos glóbulos vermelhos (RDW) verifica a distribuição dos eritrócitos em relação à variação de tamanho ([Azevedo, 2014](#)).

2- Lipidograma

O lipidograma fornece informações a respeito da concentração dos lipídios no sangue.

Os lipídios fisiologicamente e clinicamente mais importantes de serem mensurados são triglicérides (TG), colesterol total (t-C) e o colesterol das lipoproteínas plasmáticas, as quais transportam lipídeos na circulação sanguínea.

As lipoproteínas são constituídas por quantidades variáveis de colesterol livre e seus ésteres, TG, fosfolipídios e apolipoproteínas. Na avaliação laboratorial são realizadas a mensuração do teor de colesterol da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-C, rica em triglicérides), da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C, rica em colesterol) e da lipoproteína de alta densidade (HDL-C, rica em colesterol a ser destinado ao fígado no processo chamado de transporte reverso de colesterol) ([Motta, 2009](#)).

3- Antioxidantes solúveis e enzimáticos

Os antioxidantes são substâncias que atuam minimizando os danos promovidos pelo estresse oxidativo. Agem formando um radical menos ativo ou minimizando os danos causados pelos radicais livres nas moléculas danificadas (Dekkers et al., 1996).

Uma variedade de antioxidantes atua no organismo, podendo ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Já os antioxidantes não enzimáticos englobam algumas vitaminas, os flavonóides, o ácido úrico (UA), a bilirrubina e alguns micronutrientes (Dekkers et al., 1996).

A eficiência do sistema antioxidante depende da ingestão nutricional (vitaminas e micronutrientes) e da produção endógena que pode ser modificada pelo exercício, por doenças e pelo envelhecimento (Finaud, Lac, & Filaire, 2006).

4- Enzimas indicadoras de lesão muscular

Existem várias enzimas que são consideradas como indicadoras de lesão tecidual, inclusive do tecido muscular. Pelo fato dos níveis teciduais dessas enzimas serem muito maiores dos que encontrados no soro, quando ocorre lesão ou hemólise nos tecidos, há uma elevação significativa de suas concentrações no plasma.

A realização de exercício físico é um fator que pode ocasionar aumento significativo das enzimas indicadoras de lesão muscular tais como a lactato desidrogenase (LDH) e a creatinaquinase (CK) (Ahlborg & Brohult, 1967; Alemany et al., 2014; Boros-Hatfaludy, Fekete, & Apor, 1986; Brancaccio, Maffulli, & Limongelli, 2007; Nerdrum, 1964).

A LDH é uma enzima da classe das oxidorredutases que catalisa a conversão reversível de lactato a piruvato. Ela está presente no citoplasma de todas as células do organismo, sendo abundante no miocárdio, no fígado, músculo esquelético, nos rins e nos eritrócitos. O valor de referência para a LDH no soro é de 95 a 225 U/l (Motta, 2009).

A CK catalisa a conversão reversível de creatina em creatina fosfato, atuando na produção de energia para nos tecidos. A função predominante da enzima ocorre nas células musculares, onde está envolvida no armazenamento de energia como creatina fosfato. Os valores de referência da CK são de 46 a 171 U/l para homens e 34 a 145 U/l em mulheres (Motta, 2009).

5- Ferro sérico

O ferro é um elemento metálico essencial. Está presente em várias proteínas, inclusive no grupo heme da hemoglobina.

O ferro sérico refere-se ao ferro ligado a siderofilina presente no plasma. Os valores de referência no sangue desse mineral são 65 a 170 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) para homens e 50 a 170 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) para mulheres (Motta, 2009).

EXERCÍCIO FÍSICO

1- Aspectos gerais sobre exercício físico

O exercício físico nada mais é do que a realização de trabalho muscular. O termo exercício físico é utilizado para definir a realização de trabalho muscular de forma planejada, estruturada e repetitiva (Caspersen, Powell, & Christenson, 1985), ou seja, controlando as variáveis: tempo, intensidade, volume, duração e frequência.

O exercício físico pode ser classificado de diferentes maneiras que incluem: a intensidade, a via metabólica dominante, a mecânica muscular e o ritmo.

Em relação à classificação pela via metabólica, essa categorização diz respeito à principal via metabólica utilizada pelo organismo para fornecer energia (na forma de ATP) para os músculos que estão em atividade. Nesse sentido, o exercício físico pode ser classificado como anaeróbio ou aeróbio.

O exercício é dito anaeróbico quando a produção de energia independe da utilização de O_2 . As vias metabólicas responsáveis pela geração de ATP sob estas condições são o sistema fosfocreatina e a glicólise. Esta denominação é feita para exercícios de alta intensidade e curta duração (menos de 45 segundos) (Powers, 2014).

Quando o tempo de exercício vai aumentado, a energia passa a ser predominantemente produzida de forma aeróbia. Nessas circunstâncias é utilizando O_2 e o ATP passa a ser produzido dentro das mitocôndrias, envolvendo a interação de duas vias metabólicas cooperativas: ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons (Powers, 2014).

A intensidade e o volume de treino são outras importantes variáveis que servem para classificar o exercício físico. Uma depende da outra, pois se o volume de exercício é

alto a intensidade não pode ser alta também. Sendo assim, de maneira geral, tanto a intensidade quanto o volume podem ser classificados em alto, moderado e baixo.

Apesar de muitos autores classificarem didaticamente os tipos de exercício deve-se entender que os itens de classificação não são absolutos. É muito difícil realizar um exercício estritamente estático ou dinâmico, ou ainda, puramente anaeróbio ou aeróbio. As vias metabólicas se interagem e a energia para realizar a maioria dos tipos de exercício é originária de uma combinação de fontes. Na prática, todo exercício físico apresenta todos os componentes que são utilizados para classificá-lo, o que varia é a proporção relativa de cada um deles em cada exercício executado (Powers, 2014).

Inúmeros protocolos são utilizados para prescrever e medir a intensidade do treino. A escolha do protocolo mais adequado depende das características específicas do exercício a ser realizado, das características do executante (nível de aptidão física, tempo de treino, objetivo a ser alcançado) e da disponibilidade de equipamentos para realizar o teste (Powers, 2014).

O trabalho muscular é capaz de desequilibrar muitas variáveis homeostáticas, sendo capaz de promover alterações fisiológicas, metabólicas e bioquímicas no organismo para suprir o desequilíbrio causado (Powers, 2014).

Podemos categorizar as alterações relativas ao exercício como sendo agudas (curto prazo) e crônicas (longo prazo).

O efeito agudo do exercício são as alterações que acontecem em associação direta com a sessão de trabalho muscular. Elas podem ser imediatas ou tardias. O efeito agudo imediato refere-se às alterações observadas imediatamente após a realização do exercício. Já as alterações agudas tardias são as observadas ao longo das primeiras 24 horas que se seguem após uma sessão de exercício.

As alterações crônicas, também denominadas ajustes fisiológicos, são aquelas que resultam da realização regular de exercício físico por um maior período de tempo, dado em meses ou anos.

2- Efeitos do exercício na reologia do sangue

A realização de exercício físico de diferentes protocolos (máximo x submáximo, curta x longa duração) frequentemente promove alterações hemorreológicas (Brun,

2002; Brun et al., 1998; Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007; Brun et al., 1991; Connes et al., 2013; Yalcin et al., 2000; Yalcin et al., 2003).

Entende-se por hemorreologia o estudo do fluxo e dos componentes do sangue na micro- e na macrocirculação (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007). Nesse ramo de pesquisa também ocorre à investigação dos fatores e das situações fisiológicas ou patológicas que influenciam o fluxo sanguíneo (Copley, 1990). Dentre estes fatores estão os elementos que constituem o sangue, a deformabilidade e as propriedades físicas do sangue e das células vermelhas, tais como: viscosidade, rigidez e estabilidade. Há um crescente número de dados clínicos e experimentais indicando claramente que o comportamento do fluxo sanguíneo é o fator determinante para uma perfusão tecidual adequada (Baskurt & Meiselman, 2003).

A membrana do RBC é o primeiro elemento estrutural que determina o comportamento dinâmico da célula (Chasis & Shohet, 1987). Assim sendo, alterações hemorreológicas são diretamente relacionadas com as propriedades da membrana do RBC.

Estudar o exercício físico com relação à hemorreologia é extremamente importante, pois são as propriedades hemorreológicas que irão determinar a capacidade das células de transportar e transferir O₂ para os tecidos.

A compreensão dos efeitos do exercício físico na hemorreologia deve compreender análises separadas das alterações agudas e crônicas. As alterações estão relacionadas com intensidade, tipo, duração do exercício e nível de aptidão física do indivíduo (Connes et al., 2013; Yalcin et al., 2003).

2.1 Alterações hemorreológicas agudas

As principais alterações hemorreológicas agudas em decorrência do exercício são aumento da viscosidade (Letcher et al., 1981; Nosadova, 1977; Vandewalle et al., 1988; Wood, Doyle, & Appenzeller, 1991) e o aumento da rigidez e diminuição da deformabilidade dos eritrócitos (Brun et al., 1998; Yalcin et al., 2003). Essas modificações estão relacionadas primordialmente às alterações dos fluidos corporais, comumente denominada “hemoconcentração”, aumento do número de células circulantes e da produção de metabólitos.

São inúmeros os fatores responsáveis pela mudança de fluídos no organismo em decorrência da realização de exercício físico. Os principais são:

- a- Redistribuição das células vermelhas no leito vascular (Martins. E., 1988);
- b- Contração do baço para aumentar a liberação de células vermelhas circulantes (Convertino et al., 1981; Szygula, 1990);
- c- Aumento da concentração de proteínas no plasma (Nosadova, 1977);
- d- Perda de água via suor e respiração para termorregulação (Stephenson & Kolka, 1988);
- e- Entrada de água dentro das células musculares (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007).

Essas modificações fisiológicas acontecem para suprir alta demanda de O₂ pelos músculos e para regular a homeostase durante a realização do exercício. Os reflexos dessas alterações no sangue são o aumento da viscosidade e menor resistência do fluxo.

Especificamente nos eritrócitos são observadas alterações nas propriedades da membrana, um aumento na rigidez e diminuição da deformabilidade e no volume da célula (aumento do hematócrito) (Wardyn et al., 2008; Yalcin et al., 2003).

Tanto o exercício agudo máximo e submáximo aumenta a viscosidade do sangue. Essa alteração é dependente de algumas variáveis: a) viscosidade plasmática, b) hematócrito, e c) parâmetros estruturais associados principalmente à agregabilidade e à rigidez da célula (J. F. Brun et al., 1998).

O aumento da viscosidade plasmática está diretamente associado às mudanças envolvidas com a alteração dos fluídos corpóreos e com a concentração de proteínas no plasma (Mairbaur, 2013).

Já as alterações no hematócrito e na viscosidade sanguínea não são muito claras (Mairbaur, 2013). Algumas associações são evidentes, como por exemplo, que o aumento no hematócrito é linearmente proporcional ao aumento da capacidade de transporte de oxigênio. Sendo assim, seria conveniente pensar que quanto maior o valor do hematócrito, melhor seria para o indivíduo. Porém, com o aumento no hematócrito ocorre proporcionalmente um aumento da viscosidade e da resistência do fluxo sanguíneo, o que diminui a entrega de O₂ para os tecidos. Esta complexa relação faz com que deva existir um valor ideal de hematócrito em que a capacidade de entrega de O₂ aos

tecidos seja a máxima possível (Baskurt & Meiselman, 2003). Apesar do valor do hematócrito aumentar durante o exercício, a restauração de seu valor é rápida e muitas vezes a elevação não chega a ser evidenciada no pós-exercício (Wood et al., 1991).

Uma alteração reológica menos comum de ser observada é o aumento da agregabilidade dos eritrócitos. Esse aumento está associado à elevação da concentração de proteínas no plasma, tais como albumina e fibrinogênio. A presença de agregados pode prejudicar a distribuição normal das células vermelhas e a dinâmica do fluxo na microcirculação, levando a uma transferência inadequada de oxigênio para os tecidos (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005).

A maioria dos estudos encontrados indica que o exercício físico promove diminuição na deformabilidade dos eritrócitos e um aumento de sua rigidez (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007).

Uma das alterações plasmáticas que contribui diretamente com o aumento da rigidez dos eritrócitos é a elevação da concentração de lactato sanguíneo. Experimentalmente está comprovado que esse metabólito encolhe as células vermelhas e diminui sua flexibilidade (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007; Brun et al., 1991).

Porém, estudos recentes encontraram resultados divergentes em relação à ação do lactato promover rigidificação dos eritrócitos (Mairbaur, 2013). Connes et al. (2004) concluíram que *in vitro* o lactato aumenta a deformabilidade dos eritrócitos em indivíduos treinados e diminui em indivíduos não treinados (Connes et al., 2004). Esse resultado sugere que indivíduos bem treinados, como atletas de *endurance* (exercício aeróbio de longa duração), apresentam hemácias mais resistentes à ação do lactato, sendo que o nível de aptidão física influencia diretamente a ação desse metabólito nas células vermelhas (Connes et al., 2010).

O estresse oxidativo é outro fator que prejudica a deformabilidade dos eritrócitos. O estresse é induzido pelo aumento na produção de radicais livres durante o exercício tanto intrinsecamente na célula quanto extracelularmente. Yang e colaboradores avaliaram a deformabilidade dos eritrócitos após uma corrida de 5 km. Uma redução da deformabilidade foi encontrada associada a alterações na forma da célula, com aumento no número de células equinoides e uma alta taxa de hemólise. Junto com essas alterações foi observado um aumento na concentração de malondialdeído dentro das células

vermelhas, em decorrência da lipoperoxidação, uma vez que aquele metabólito é o produto da peroxidação de ácidos graxos polinsaturados (Yang, 1995).

A quantidade de água dentro do eritrócito é outro fator que influencia a deformabilidade durante o exercício. Cerca de 62% do conteúdo celular é água. A maior parte dessa molécula se encontra “ligada” a outras moléculas da célula e em menor quantidade (25%) “livres” dentro do RBC. A porcentagem de moléculas de água “ligadas” está associada à deformabilidade e ao transporte de O₂. Durante o exercício agudo a quantidade total de água não muda no eritrócito ou diminuiu discretamente, mas a porcentagem de água “livre” aumenta resultando em uma menor quantidade de água “ligada”, o que resulta em uma diminuição da deformabilidade (Baskurt et al., 2007; Brun et al., 1998).

Com relação a todas as alterações hemorreológicas agudas relatadas, a alteração na deformabilidade é o fator mais importante a ser avaliado, pois variações nesta propriedade da célula resultam em modificações no fluxo sanguíneo nos capilares. Além disso, uma menor deformabilidade pode limitar a perfusão sanguínea (Yalcin et al., 2003).

Estudos recentes sugerem que uma diminuição singela da deformabilidade pode facilitar a extração de oxigênio do sangue. Assim sendo, essa redução, se não for acentuada, pode contribuir facilitando e aumentando a entrega de O₂ dos eritrócitos para os tecidos que estão realizando trabalho muscular (Connes et al., 2013).

Em conjunto, estes resultados indicam que agudamente o exercício físico promove aumento da viscosidade do sangue. Esse comportamento é resultado dos efeitos combinados de aumento da viscosidade do plasma e diminuição da deformabilidade das células vermelhas. Essas alterações podem prejudicar a microcirculação e, portanto, a liberação de O₂ para os músculos em atividade (Mairbaur, 2013).

É importante destacar que as alterações hemorreológicas relatadas são modificações fisiológicas adaptativas que ocorrem durante a realização da maioria dos exercícios e não implica riscos maiores para o indivíduo. Presumidamente, tais alterações são facilmente controladas com a hidratação durante o treinamento (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005) e com os mecanismos fisiológicos que promovem a vasodilatação e o aumento do volume plasmático, resultando em um processo denominado “auto-hemodiluição” (Brun et al., 1998; Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007).

Recentemente estudos ressaltaram a importância do RBC em liberar NO para promover vasodilatação durante o exercício. A liberação de NO pelo endotélio e pelos eritrócitos contribui para a vasodilatação e para uma maior deformabilidade dessas células, uma vez que a nitrosilação de proteínas do citoesqueleto na membrana do RBC parece melhorar sua deformabilidade (Grau et al., 2013). Esse achado é relativamente novo e precisa de maiores investigações para esclarecer os mecanismos de ação envolvendo o RBC e a liberação de NO (Connes et al., 2013; Mairbaurl, 2013).

2.2 Alterações hemorreológicas crônicas

É interessante destacar que as propriedades reológicas são alteradas em decorrência do exercício crônico. Na verdade existe uma correlação negativa entre o aumento da capacidade aeróbia e a viscosidade sanguínea (Brun et al., 2000). Sendo assim, a viscosidade do plasma, o hematócrito, a agregação e a rigidez dos eritrócitos são menores em atletas quando comparados com indivíduos treinados (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005). O exercício regular faz com que o sangue seja mais diluído e que os efeitos agudos da hemoconcentração ocorram de forma mais branda, em um processo que é denominado de auto-hemodiluição crônica.

São inúmeras as adaptações promovidas pelo exercício responsáveis pela melhora da hemorreologia. Sendo que as principais são:

- 1- Aumento do volume plasmático e sanguíneo;
- 2- Modificação nas propriedades dos eritrócitos;
- 3- Aumento da taxa de renovação celular;
- 4- Mudança na composição corporal;
- 5- Maior oxidação de gorduras.

Após horas da realização de exercício físico ocorre um aumento do volume plasmático, o que representa uma resposta reversa da hiperviscosidade, resultando em uma “auto-hemodiluição”. O aumento do volume plasmático reflete em um aumento do volume de sangue, acompanhado de uma diminuição no Ht e das proteínas plasmáticas. Com a prática regular de exercício físico esse processo se torna constante e o sangue dos indivíduos ativos e atletas se torna mais diluído quando comparado com pessoas sedentárias (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007; El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005).

Aliado as alterações reológicas, as propriedades dos eritrócitos de indivíduos ativos e atletas são diferentes quando comparadas com aquelas de indivíduos sedentários.

A primeira adaptação positiva é o aumento da deformabilidade. A melhora dessa propriedade está relacionada ao aumento do volume plasmático, ao aumento da porcentagem de água dentro do RBC, ao aumento da taxa de renovação celular e à diminuição da rigidez da membrana do RBC (Connes et al., 2013; El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005).

Além do aumento na % de água total dentro do eritrócito, ocorre um aumento na % de água “ligada” e diminuição na % de água livre. Essa modificação contribui imensamente para uma melhora na deformabilidade dos eritrócitos (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005; Peyreigne et al., 1998).

O aumento da taxa de renovação celular é uma adaptação hematológica promovida pelo exercício que contribui para a melhoria nas propriedades hemorreológicas do sangue (Connes et al., 2013; El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005; Schmidt et al., 1988; Smith, 1995).

O exercício é um importante fator capaz de estimular a eritropoiese (Szygula, 1990). Na verdade são as alterações na homeostase e os mecanismos utilizados para reparar esses danos, que são os responsáveis pelo aumento da eritropoiese, tais como:

- 1- Hipóxia;
- 2- Ação Hormonal;
- 3- Maior taxa de hemólise;
- 4- Maior demanda de O₂ para os tecidos em atividade.

A exposição a situações de hipóxia ocorridas durante o exercício é um estímulo para haver produção de RBC. A ação hormonal de cortisol e catecolaminas libera reticulócitos da medula óssea e possivelmente estimulam a eritropoiese. A eritropoiese também é estimulada pelo hormônio do crescimento e fatores de crescimento semelhantes à insulina que também estão elevados durante o exercício (Mairbaur, 2013).

A aceleração da renovação celular em decorrência da prática regular de exercício físico está intimamente relacionada à maior taxa de hemólise intracelular (Deitrick, 1991; El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005). Durante a realização de exercício físico ocorre uma

intensificação da hemólise. Os mecanismos relacionados com essa maior destruição variam com o tipo de atividade realizada. No caso de exercícios que envolvem impacto com o solo, ocorre a destruição traumática dos eritrócitos circulantes nos microvasos da região dos pés devido ao impacto com o solo (Eichner, 1985; Telford et al., 2003).

Além do dano mecânico traumático, também é evidenciado um aumento na taxa de hemólise nos exercícios que não envolvem impacto (Robinson, Cristancho, & Boning, 2006). Nesse caso, a hemólise pode acontecer devido a compressão dos eritrócitos na microcirculação durante a rápida contração dos grandes músculos (Szygula, 1990).

A idade dos eritrócitos é outro fator envolvido na hemólise. Quanto mais velha é a célula, menos resistente ao trauma ela se torna e, conseqüentemente, maior é a chance de ser lisada (Bartosz, 1991; Waugh et al., 1992; Yusof et al., 2007).

Aliado a maior taxa de hemólise que ocorre durante a realização de exercício está a maior necessidade do organismo por oxigênio. Para suprir essa demanda células mais eficientes devem ser recrutadas (Smith, 1995; Szygula, 1990).

Eritrócitos jovens possuem propriedades reológicas diferentes dos velhos. São mais deformáveis, mais fluídos e menos agregáveis, sendo assim mais flexíveis e eficientes para transportar O₂ (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005; Mairbaurl, 2013).

Além do aumento de células vermelhas jovens, os RBC circulantes são menos rígidos em resposta a realização crônica de exercício físico. Essa alteração é um reflexo da perda de peso e da diminuição plasmática de LDL-C e aumento de HDL-C (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005). As alterações dos lipídios circulantes refletem na mudança da composição lipídica das membranas, o que contribui imensamente no aumento da sua fluidez.

Na verdade a prática regular de exercício altera o metabolismo dos lipídios. Há uma maior taxa de oxidação dessas moléculas reduzindo na circulação os níveis de TG e LDL-C. Ocorre também perda de massa gorda e perda de peso (mudança da composição corporal) que contribuem para a desagregabilidade e aumento da deformabilidade dos eritrócitos (Brun et al., 2011).

Resumidamente, o treinamento contribui para a diminuição na concentração de todos os parâmetros conhecidos em alterar a reologia do sangue. Todas as adaptações reológicas em resposta ao treinamento regular são para facilitar a transferência de O₂ e a

oxigenação tecidual, o que resulta em um melhor desempenho (Brun, 2002; Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007).

3- Ativação leucocitária e plaquetária em resposta ao exercício agudo.

Além dos eritrócitos, o comportamento de outras células sanguíneas é alterado em função da realização de exercício físico.

Após o exercício agudo intenso, o número de leucócitos circulantes aumenta (Larrabee, 1902), este processo é denominado leucocitose. A magnitude da leucocitose varia de acordo com a intensidade e duração do trabalho muscular realizado, sendo que a duração influencia no aumento mais do que a intensidade (McCarthy & Dale, 1988).

O aumento do número de leucócitos circulantes está relacionado com o aumento do fluxo sanguíneo, que recruta maiores quantidades destas células do *pool* marginal e também com alterações hormonais, mediadas principalmente por receptores β adrenérgicos e pelo cortisol (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007; McCarthy & Dale, 1988).

As catecolaminas influenciam a liberação de leucócitos durante o exercício. Já o cortisol, colabora com a leucocitose tardia, ou seja, após um período de realização do treinamento (McCarthy et al., 1991; Ronsen et al., 2001).

O aumento no número de leucócitos pode exacerbar processos oxidativos, uma vez que, se ativados eles passam a ser importantes fontes de ROS e proteases. A hipóxia transitória, que ocorre durante a realização de exercício físico, libera citocinas que também contribuem para essa ativação leucocitária (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007).

Os leucócitos ativados reduzem enzimaticamente o O_2 molecular para formarem metabólitos, tais como superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), que causam danos nos constituintes do plasma e nas células vizinhas, inclusive nos eritrócitos. Visto que, as moléculas oxidantes são capazes de difundir através da membrana do RBC aumentando o estresse oxidativo dentro da célula. Além de difundirem para o interior, os produtos da ativação leucocitária modificam a membrana do RBC, no caso das proteínas, alterando a antigenicidade de proteínas e a peroxidação de lipídios. Os danos causados no RBC favorecem a hemólise, o envelhecimento acelerado e a sua remoção precoce (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007; Santos-Silva et al., 2001; Temiz et al., 2000).

Além dos leucócitos, o número de plaquetas aumenta em função da realização de exercício físico. Esse aumento é correlacionado positivamente com a intensidade do treino (Posthuma et al., 2014).

O aumento no número de plaquetas no exercício também está associado à estimulação adrenérgica, que induz a contração do baço e conseqüentemente libera mais plaquetas na circulação (Bakovic et al., 2013; Schaffner et al., 1985).

As plaquetas podem ter uma ação oxidante. Esta ação é mediada principalmente pela LDL oxidada (Ox-LDL) (Poller, Priest, & Thomson, 1971; Posthuma et al., 2014; Tozzi-Ciancarelli, Penco, & Di Massimo, 2002).

É importante ressaltar que as alterações nos leucócitos e nas plaquetas dependem de inúmeras variáveis tais como tipo de exercício, duração, intensidade e características próprias da população estudada (nível de treinamento, idade e gênero) (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005; Posthuma et al., 2014; Santos-Silva et al., 2001).

Apesar desses efeitos agudos, o treinamento crônico é capaz de melhorar a liberação plaquetária e leucocitária em função da realização do exercício físico. Os mecanismos para essas adaptações estão relacionadas à hemodiluição e o aumento na produção de substâncias anti-plaquetárias, como óxido nítrico e prostaglandinas (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005).

4- Estresse oxidativo e exercício

Durante a realização de exercício físico ocorre a produção de radicais livres (Davies et al., 1982). Sua produção depende da frequência, intensidade, duração e tipo de exercício executado (Ji, 1995a, 1995b; Urso & Clarkson, 2003).

Radical livre é qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula que apresenta um elétron não pareado em sua órbita externa. Apesar de serem moléculas importantes do metabolismo celular, são altamente reativos, pois têm a habilidade de se ligar rapidamente a outras moléculas, combinação que causa danos na molécula que se combina com o radical (Baskurt & Meiselman, 2003; Sindhi et al., 2013).

Existem também compostos igualmente reativos, mas que não possuem elétron não-pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres, mas que indiretamente geram radicais livres. Estas substâncias são classificadas de

maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio. Um exemplo comum dessas espécies é o peróxido de hidrogênio (Droge, 2002).

A quantidade de radicais livres produzidos durante o exercício está diretamente relacionada com a velocidade do metabolismo aeróbio (Powers, 2014), pois estes são resultado da intensa utilização de O₂ pelos músculos em atividade. Estima-se que entre 2% a 5% do oxigênio total utilizado pela mitocôndria é convertido em radicais livres (Urso & Clarkson, 2003).

Além dos radicais livres produzidos devido ao consumo de O₂, o exercício pode causar aumento da produção de radicais livres de outras maneiras, tais como pelo aumento das catecolaminas (McAnulty et al., 2003), devido à produção de lactato (Aguilo, Castano, et al., 2000; Kayatekin et al., 2002), à elevada taxa de autooxidação da hemoglobina (Misra & Fridovich, 1972), à hipertermia (Osorio et al., 2003) ao processo de isquemia-reperusão (Droge, 2002) e devido à hipóxia tecidual transitória, que ocorre devido à grande demanda por O₂ pelos tecidos e a insuficiência dos pulmões em suprir essa demanda (Brun, Connes, Varlet-Marie, 2007; El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005). Se a taxa de produção exceder a capacidade de remoção pelos sistemas antioxidantes o estresse oxidativo ocorre.

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de espécies reativas capaz de causar danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente prejuízo da sua funcionalidade (Droge, 2002).

Os eritrócitos são propensos à ação dos radicais livres. Uma vez que, essas moléculas podem se difundir através da membrana, promovendo danos cumulativos no interior da célula. Além disso, o RBC possui altas concentrações de O₂ e ferro, dois fatores que contribuem amplamente para processos de oxidação (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005).

Para combater o dano oxidativo, o organismo contém os antioxidantes. Assim sendo, antioxidante é qualquer substância que em baixas concentrações é capaz de retardar os processos de oxidação nas moléculas convertendo os agentes oxidantes em produtos não tóxicos (Sindhi et al., 2013; Urso & Clarkson, 2003)

Os principais agentes antioxidantes do RBC são as enzimas Cat, SOD e a GPx e os antioxidantes ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) (Bartosz, 1991; Sindhi et al., 2013).

A SOD catalisa a dismutação do O_2^{\bullet} em H_2O_2 e oxigênio molecular. Embora a afinidade com o substrato e a especificidade sejam diferentes, tanto a CAT quanto a GPx atuam na desintoxicação celular reduzindo o H_2O_2 (Urso & Clarkson, 2003).

O α -tocoferol é um antioxidante lipofílico que pode reduzir radicais livres tais como lipoperóxidos, sendo encontrado em todas as membranas celulares. Já a vitamina C está presente no compartimento citossólico da célula, servindo como um doador de elétrons para radicais livres gerados. Esses dois antioxidantes são repostos através da dieta (Gate et al., 1999).

O sistema antioxidante age em conjunto para desintoxicar da melhor maneira o RBC, a fim de promover o menor dano oxidativo possível. Entretanto, se a produção excede a capacidade de ação dos mecanismos de defesa, várias modificações funcionais e estruturais ocorrem no RBC (Baskurt & Meiselman, 2003).

Essas modificações incluem peroxidação lipídica, oxidação protéica, degradação de proteínas, danos no citoesqueleto e alterações nas propriedades físicas da membrana (Baskurt & Meiselman, 2003; Smith, 1995).

A **figura 5** ilustra as principais rotas de formação de radicais livres e ROS nos eritrócitos.

A principal via pela qual ocorre a produção de ROS é a auto-oxidação da oxihemoglobina em metemoglobina (Sindhi et al., 2013). Esta via aumenta em proporção ao aumento na captação de O_2 induzido pelo exercício. O produto gerado pela reação, a metemoglobina, é incapaz de se ligar ao O_2 . Outro prejuízo que ocorre em função da formação desse composto, é que a reação de conversão gera superóxido, radical livre que é precursor da formação de várias espécies oxidativas altamente tóxicas, como o radical hidroxila. Esse radical age danificando diretamente a membrana do RBC, promovendo processos de oxidação das proteínas e peroxidação lipídica (**Figura 5**). A formação de OH^{\bullet} ocorre na reação de reciclagem do ferro para o estado ferroso, em que o peróxido de hidrogênio é o substrato (**Figura 5**) (Smith, 1995).

Os radicais livres e os ROS agem danificando principalmente a membrana plasmática. O processo mais comum é a peroxidação lipídica que ocorre em ácidos graxos polinsaturados da membrana plasmática, resultando na produção de radical peroxil. Esse produto é altamente reativo e pode combinar com outros radicais semelhantes, propagando danos nas estruturas biológicas. O dano irreversível nos lipídios pode aumentar a permeabilidade e a rigidez da membrana, comprometendo a homeostase celular (Gate et al., 1999; Smith, 1995).

Os danos oxidativos nos eritrócitos podem prejudicar as propriedades reológicas e o fluxo sanguíneo. Podem afetar adversamente a deformabilidade e impedir a passagem dos eritrócitos na microcirculação, promovendo efeitos diversos na entrega de nutrientes e O₂ para os músculos, como também na remoção de produtos metabólicos (El-Sayed, Ali, & El-Sayed Ali, 2005). Se os componentes essenciais da membrana e do citoesqueleto sofrem danos irreversíveis, a hemólise ocorrerá (Smith, 1995).

Independente dos fatores envolvidos no desenvolvimento e exacerbação do estresse oxidativo, o próprio envelhecimento da célula por si só é um importante fator que contribui para a existência do processo. Com o passar dos dias de vida, as enzimas e os agentes antioxidantes presentes no RBC vão sendo alvo de oxidação. Paralelo a isso, ocorrem na célula processos de glicação, o que aumenta a vulnerabilidade do RBC ao dano oxidativo (Bartosz, 1991; Szygula, 1990).

Embora ocorra a geração de radicais livres e um possível dano oxidativo devido à realização de exercício físico, esta é uma resposta aguda frente ao desequilíbrio homeostático que ocorre no organismo do indivíduo. O exercício crônico altera positivamente o status antioxidante (Bogdanis et al., 2013; Brites et al., 1999; Finaud et al., 2006), que atuam diminuindo os níveis basais de danos oxidativos e aumentando a resistência ao estresse oxidativo. Essa adaptação ocorre na tentativa de manter o equilíbrio entre o estresse oxidativo promovido pelo exercício e as defesas fisiológicas e bioquímicas (Aguilo et al., 2000).

5- Efeitos do exercício físico nas propriedades da membrana do eritrócito

Devido à quantidade considerável de propriedades que a membrana dos eritrócitos possui e a imensa variedade de formas de realizar exercício físico, o estudo do efeito do exercício físico na membrana do RBC é muito heterogêneo.

As principais propriedades estudadas são a fluidez (Tsuda et al., 2003) e a deformabilidade (Smith et al., 1999). Estudos envolvendo a estabilidade osmótica e exercício físico são relativamente escassos.

A relação da fluidez com o efeito agudo de uma sessão de exercício máximo e submáximo foi investigado por Bersosa et. al. (2011). Nesse estudo, os autores puderam observar que o exercício agudo promoveu uma queda dramática da fluidez e um aumento da rigidez da membrana do RBC. Além disso, após a sessão máxima de treino, houve uma exacerbação da formação de produtos oxidativos. Nesse sentido, os autores concluíram que aumento da rigidez da membrana após a realização de exercício físico estaria intimamente associada à produção de radicais livres e aos danos que essas substâncias podem causar na membrana plasmática (Berzosa et al., 2011).

Brzeszczynska et al. (2008) também detectou aumento da rigidez e diminuição da fluidez da membrana do RBC após 1 hora de exercício incremental até a exaustão realizado em 11 homens não treinados. Essa alteração também foi associada ao aumento do estresse oxidativo (Brzeszczynska et al., 2008).

Com relação ao efeito do nível de treinamento e mudanças nas propriedades da membrana, Smith et. al. (1995) compararam o efeito do exercício agudo na membrana de eritrócitos de indivíduos não treinados com altamente treinados. A suscetibilidade ao dano na membrana, ao estresse oxidativo e conseqüentemente a maior propensão à hemólise diferiu entre os dois grupos, sendo maior nos indivíduos não treinados. Isso quer dizer que o treinamento regular conferiu um efeito protetor contra oxidação nos eritrócitos dos indivíduos altamente treinados (Smith et al., 1995).

Além de Smith et. al. (1995), Cazzola et. al. (2003) encontraram melhora das propriedades da membrana em função da realização de exercício regularmente. Esses achados estão relacionados aos processos adaptativos que o exercício promove, tais como maior taxa de renovação celular e melhora do status antioxidante (Cazzola et al., 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo alvo de tantas ações promovidas pela execução do exercício físico, a membrana dos eritrócitos se torna alvo dessas ações podendo sofrer assim modificações.

O mais interessante é investigar quais são os fatores que contribuem para promover alterações na membrana e até que ponto isso melhora ou prejudica a funcionalidade do RBC.

Estudos a respeito das alterações nas propriedades da membrana em função da realização de exercício são relativamente escassos, principalmente envolvendo a investigação da propriedade de estabilidade osmótica.

Foi nesse sentido que o presente estudo foi desenvolvido, com o intuito de investigar o efeito agudo e crônico do exercício físico na estabilidade osmótica de eritrócitos, tentando encontrar possíveis correlações com as variáveis sanguíneas.

O capítulo 2 faz uma investigação a respeito do efeito do exercício agudo moderado e intenso na estabilidade osmótica em homens saudáveis e ativos. Já o capítulo 3 avalia o efeito do exercício agudo e crônico nas mesmas variáveis em atletas nadadores.

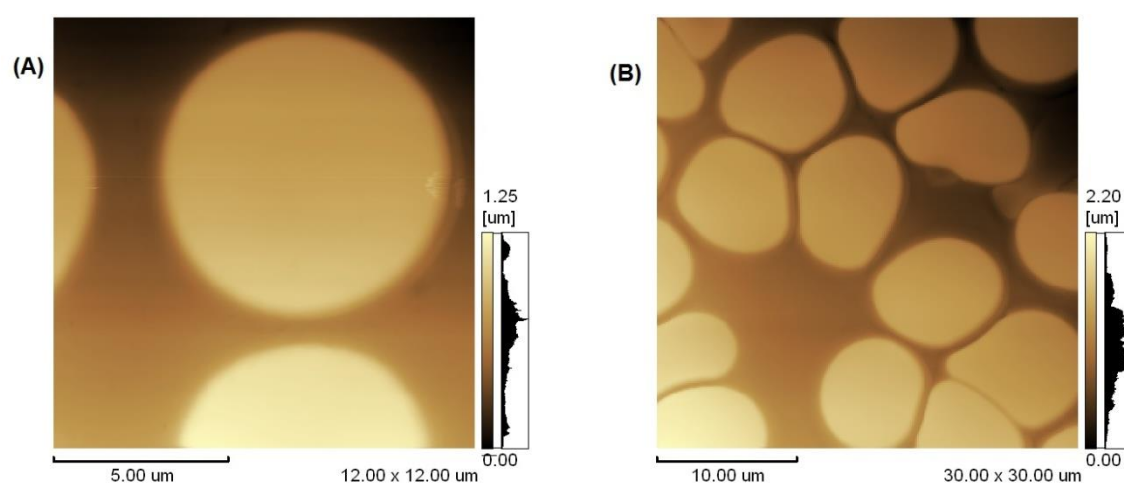


Figura 1. Imagens de microscopia de força atômica: (A) eritrócito humano (área $12 \mu\text{m}^2$) e (B) agrupamento de eritrócitos (área $30 \mu\text{m}^2$) (Banco de dados do laboratório).

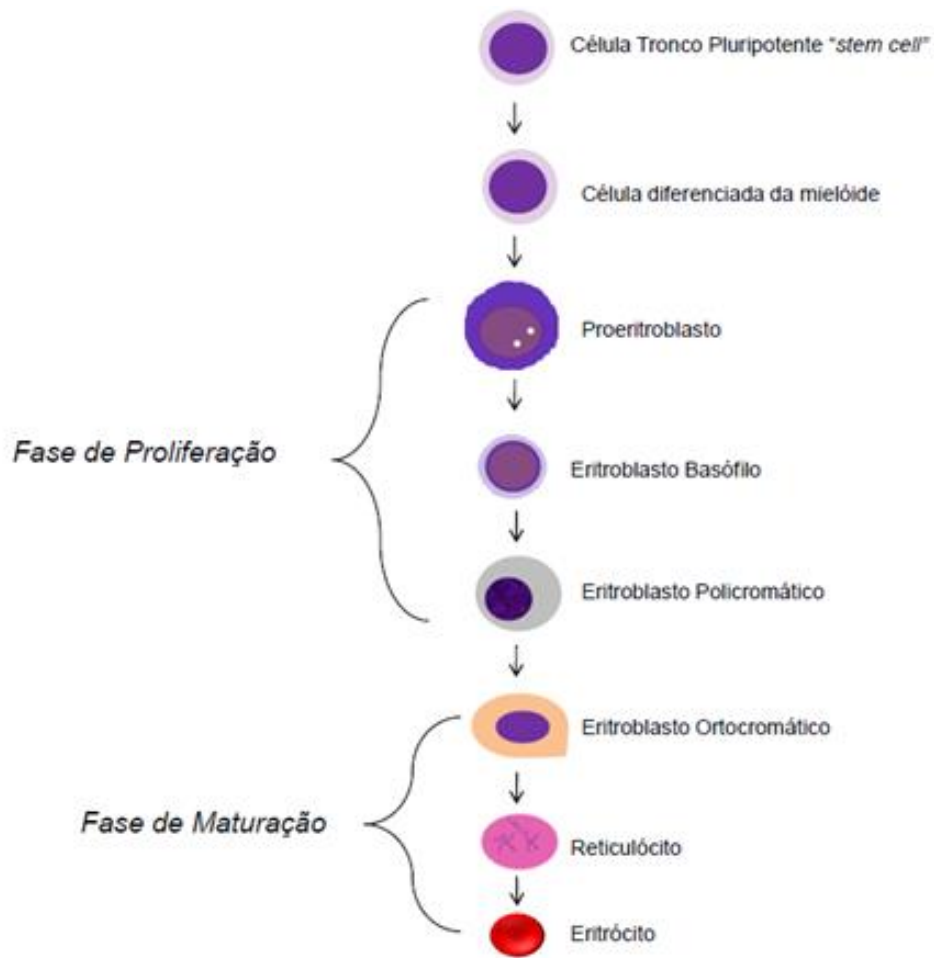


Figura 2. Estágios de formação do eritrócito (Fonte própria do autor).

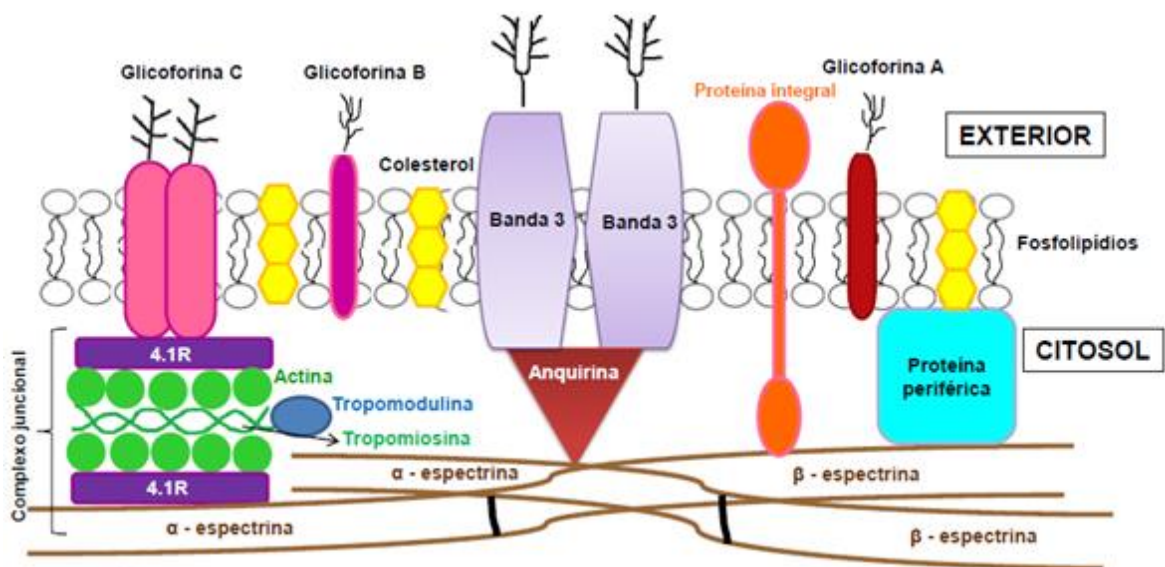


Figura 3. Representação esquemática da membrana da célula vermelha com as interações entre as proteínas da bicamada lipídica com as proteínas do citoesqueleto (Fonte própria do autor).

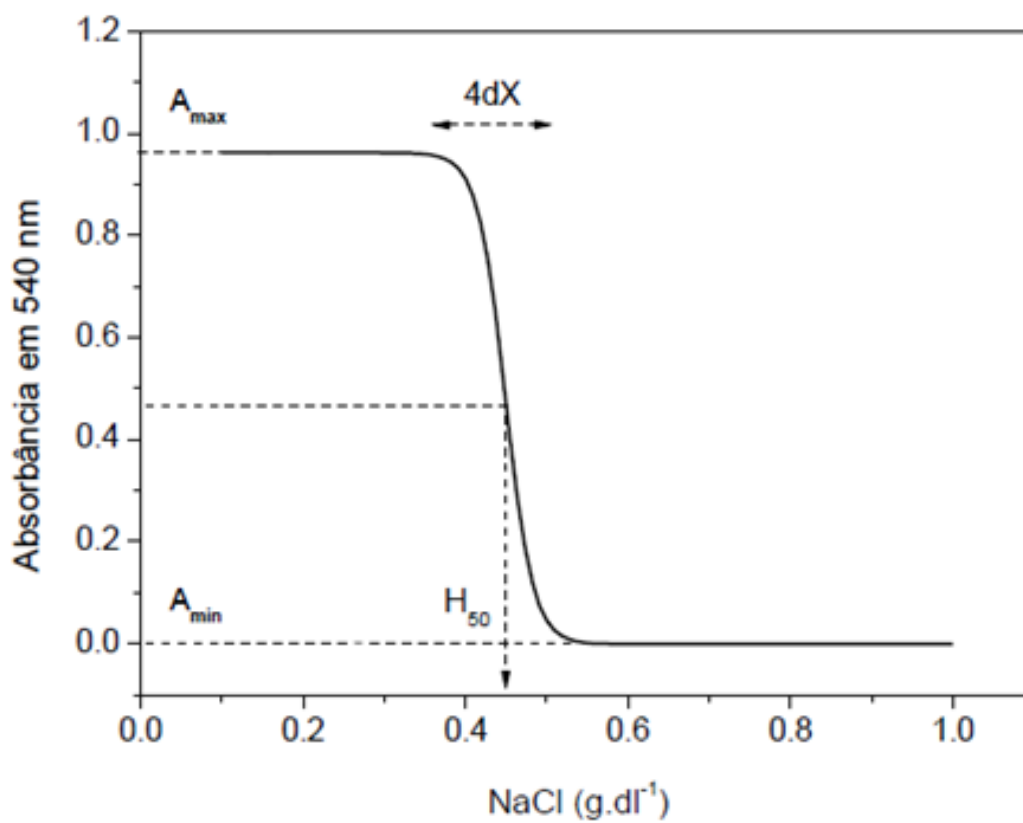


Figura 4: Curva típica de lise de eritrócitos por diminuição na concentração de NaCl ajustada por regressão sigmoideal (Paraiso et.al., 2014).

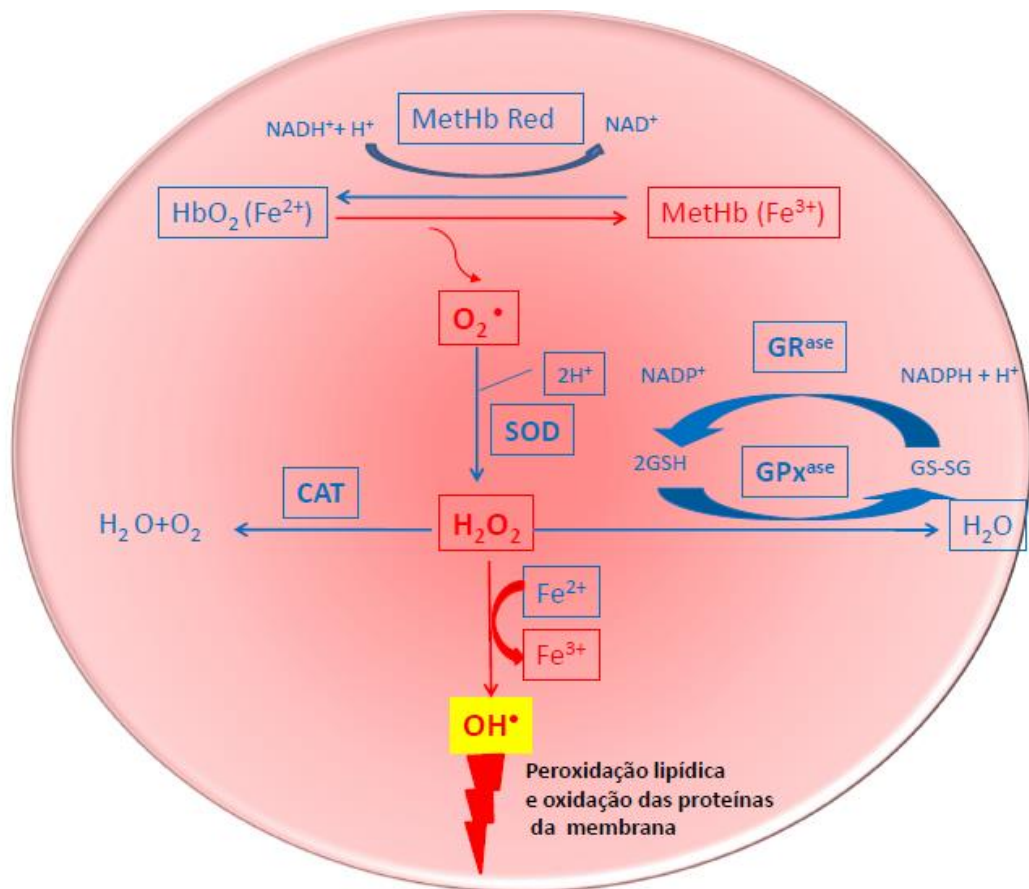


Figura 5. Processos de formação de produtos oxidativos no citosol do eritrócito. Abreviaturas: NAD^+ , dinucleótido de nicotinamida e adenina; MetHb Red, metemoglobina redutase; HbO_2 , oxihemoglobina; MetHb, metemoglobina; $\text{O}_2^{\bullet-}$, superóxido; H^+ : próton; SOD, superóxido dismutase; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; H_2O , água; GPx: glutaciona peroxidase; CAT, catalase; OH^{\bullet} , radical hidroxila; Fe^{2+} : íon ferroso (Fonte própria do autor).

Tabela 1. Principais alterações físico-químicas que ocorrem na célula vermelha com o seu envelhecimento:

-
- 1- Aumento da densidade (Bartosz, 1991; Waugh et al., 1992);
 - 2- Diminuição do volume da célula (Bartosz, 1991);
 - 3- Perda progressiva da área de superfície (Cordero et al., 2004; Waugh et al., 1992);
 - 4- Alterações na forma (Cordero et al., 2004);
 - 5- Diminuição das enzimas intracelulares e depleção de ATP (Cordero et al., 2004);
 - 6- Diminuição na composição lipídica (Schroeder, 1984);
 - 7- Perda da assimetria dos lipídios na bicamada (Bratosin et al., 1998; Schroeder, 1984);
 - 8- Peroxidação lipídica e acúmulo dos produtos deste processo (Schroeder, 1984);
 - 9- Alterações no comportamento das proteínas da membrana (Waugh et al., 1992).
 - 10- Diminuição da deformabilidade (Cordero et al., 2004).
-

(Fonte própria do autor)

REFERÊNCIAS

- Agre, P. (2006). The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc*, 3 (1), 5-13. doi: 10.1513/pats.200510-109JH.
- Aguilo, A., Castano, E., Tauler, P., Guix, M. P., Serra, N., & Pons, A. (2000). Participation of blood cells in the changes of blood amino acid concentrations during maximal exercise. *J Nutr Biochem*, 11(2), 81-86. doi: 10.1016/S0955-2863(99)00073-X.
- Aguilo, A., Tauler, P., Gimeno, I., Fuentespina, E., & Pons, A. (2000). Changes in erythrocyte antioxidant enzymes during prolonged submaximal exercise. *Biofactors*, 11(1-2), 27-30. doi: 10.1002/biof.5520110108.
- Ahlborg, B., & Brohult, J. (1967). Immediate and delayed metabolic reactions in well-trained subjects after prolonged physical exercise. *Acta Med Scand*, 182(1), 41-54. doi: 10.1111/j.0954-6820.1967.tb11498.x.
- Aleman, J. A., Delgado-Diaz, D. C., Mathews, H., Davis, J. M., & Kostek, M. C. (2014). Comparison of acute responses to isotonic or isokinetic eccentric muscle action: differential outcomes in skeletal muscle damage and implications for rehabilitation. *Int J Sports Med*, 35(1), 1-7. doi: 10.1055/s-0032-1327652.
- An, X., & Mohandas, N. (2008). Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol*, 141(3), 367-375. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x.
- Azevedo, Maria Regina Andrade de (2014). *Hematologia Básica - Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial* (Revinter Ed. 5 ed.).
- Bakovic, D., Pivac, N., Zubin Maslov, P., Breskovic, T., Damonja, G., & Dujic, Z. (2013). Spleen volume changes during adrenergic stimulation with low doses of epinephrine. *J Physiol Pharmacol*, 64(5), 649-655.
- Barthes-Biesel, D. (1996). *Advances in Hemodynamics and Hemorheology* (T. V. How Ed. Jai Press, INC Ed. Vol. 1). Connecticut.
- Bartos, G. (1991). Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes. *Gerontology*, 37(1-3), 33-67. doi:10.1159/000213251.
- Baskurt, O. K., Hardeman, M.R., Rampling, M.W., Meiselman, H.J. (2007). *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. Amsterdam: IOS Press.
- Baskurt, O. K., & Meiselman, H. J. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost*, 29(5), 435-450. doi: 10.1055/s-2003-44551.

- Benesch, R., & Benesch, R. E. (1967). The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun*, 26(2), 162-167. doi:10.1016/0006-291X(67)90228-8.
- Bennett, V. (1985). The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Annu Rev Biochem*, 54, 273-304. doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.001421.
- Bennett, V. (1990a). Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev*, 70(4), 1029-1065.
- Bennett, V. (1990b). Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*, 2(1), 51-56. doi:10.1016/S0955-0674(05)80030-4.
- Besa, E. C., & Bullock, L. P. (1981). The role of the androgen receptor in erythropoiesis. *Endocrinology*, 109(6), 1983-1989. doi: 10.1210/endo-109-6-1983.
- Bogdanis, G. C., Stavrinou, P., Fatouros, I. G., Philippou, A., Chatzinikolaou, A., Draganidis, D., Ermidis, G., Maridaki, M. (2013). Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol*, 61, 171-177. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.046.
- Boros-Hatfaludy, S., Fekete, G., & Apor, P. (1986). Metabolic enzyme activity patterns in muscle biopsy samples in different athletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 55(3), 334-338. doi:10.1007/BF02343809.
- Brancaccio, P., Maffulli, N., & Limongelli, F. M. (2007). Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull*, 81-82, 209-230. doi: 10.1093/bmb/ldm014.
- Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., Aminoff, D., Montreuil, J. (1998). Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*, 80(2), 173-195. doi:10.1016/S0300-9084(98)80024-2.
- Brewer, G. J. (1974). 2,3-DPG and erythrocyte oxygen affinity. *Annu Rev Med*, 25, 29-38. doi: 10.1146/annurev.me.25.020174.000333.
- Brites, F. D., Evelson, P. A., Christiansen, M. G., Nicol, M. F., Basilico, M. J., Wikinski, R. W., & Llesuy, S. F. (1999). Soccer players under regular training show oxidative stress

- but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci (Lond)*, 96(4), 381-385. doi:10.1042/CS19980269.
- Brun, J. F. (2002). Exercise hemorheology as a three acts play with metabolic actors: Is it clinical relevance? *Clinical hemorhemology and Microcirculation*, 26, 155-174.
- Brun, J. F., Khaled, S., Raynaud, E., Bouix, D., Micallef, J. P., & Orsetti, A. (1998). The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology? *Clin Hemorheol Microcirc*, 19(2), 89-104.
- Brun, J. F., Varlet-Marie, E., Romain, A. J., & Raynaud de Mauverger, E. (2011). Interrelationships among body composition, blood rheology and exercise performance. *Clin Hemorheol Microcirc*, 49(1-4), 183-197. doi: 10.3233/CH-2011-1468.
- Brun, J.F., Connes, P., Varlet-Marie, E. (2007). Alterations of blood rheology during and after exercise are both consequences and modifiers of body's adaptation to muscular activity. *Science & Sports*, 22, 251–266. doi: 10.1016/j.scispo.2007.09.010.
- Brun, J.F., Fons, C., Raynaud, E., Fédou, C., Orsetti, A. (1991). Influence of circulating lactate on blood rheology during exercise in professional football players. *Rev. Port. Hemorreol.*, 5, 219–229.
- Brzeczczynska, J., Pieniazek, A., Gwozdziński, L., Gwozdziński, K., & Jegier, A. (2008). Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33(6), 1223-1231. doi: 10.1139/H08-125.
- Caspersen, C. J., Powell, K. E., & Christenson, G. M. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*, 100(2), 126-131.
- Cazzola, R., Russo-Volpe, S., Cervato, G., & Cestaro, B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest*, 33(10), 924-930. doi: 10.1046/j.1365-2362.2003.01227.x.

- Chanutin, A., & Curnish, R. R. (1967). Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*, *121*(1), 96-102. doi:10.1016/0003-9861(67)90013-6.
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (1986). Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol*, *103*(2), 343-350. doi:10.1083/jcb.103.2.343.
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (1992). Red blood cell glycoporphins. *Blood*, *80*(8), 1869-1879.
- Chasis, J. A., & Shohet, S. B. (1987). Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Annu Rev Physiol*, *49*, 237-248. doi: 10.1146/annurev.ph.49.030187.001321.
- Chien, S. (1987). Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol*, *49*, 177-192. doi: 10.1146/annurev.ph.49.030187.001141.
- Clark, M. R. (1988). Senescence of red blood cells: progress and problems. *Physiol Rev*, *68*(2), 503-554.
- Coburn, R. F., & Kane, P. B. (1968). Maximal erythrocyte and hemoglobin catabolism. *J Clin Invest*, *47*(6), 1435-1446. doi: 10.1172/JCI105835.
- Coburn, R. F., Williams, W. J., & Forster, R. E. (1964). Effect of Erythrocyte Destruction on Carbon Monoxide Production in Man. *J Clin Invest*, *43*, 1098-1103. doi: 10.1172/JCI104994.
- Connes, P., Bouix, D., Py, G., Caillaud, C., Kippelen, P., Brun, J. F., Varray, A., Prefaut, C., Mercier, J. (2004). Does exercise-induced hypoxemia modify lactate influx into erythrocytes and hemorheological parameters in athletes? *J Appl Physiol*, *97*(3), 1053-1058. doi: 10.1152/jappphysiol.00993.2003.
- Connes, P., Frank, S., Martin, C., Shin, S., Aufradet, E., Sunoo, S., Klara, B., Raynaud de Mauverger, E., Romana, M., Romana, M., Kang, J., Varlet-Marie, E., Feasson, L., Hardy-Dessources, M. D., Wilhelm, B., Brun, J. F. (2010). New fundamental and applied mechanisms in exercise hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc*, *45*(2-4), 131-141. doi: 10.3233/CH-2010-1291.

- Connes, P., Simmonds, M. J., Brun, J. F., & Baskurt, O. K. (2013). Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. *Clin Hemorheol Microcirc*, 53(1-2), 187-199. doi: 10.3233/CH-2012-1643.
- Convertino, V. A., Keil, L. C., Bernauer, E. M., & Greenleaf, J. E. (1981). Plasma volume, osmolality, vasopressin, and renin activity during graded exercise in man. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 50(1), 123-128. doi: 10.1371/journal.pone.0087080.
- Cooper, R. A. (1977). Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med*, 297(7), 371-377. doi: 10.1056/NEJM197708182970707.
- Cooper, R. A. (1978). Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct*, 8(4), 413-430. doi: 10.1002/jss.400080404.
- Copley, A. L. (1990). Fluid mechanics and biorheology. *Biorheology*, 27(1), 3-19. doi:10.1159/000247025.
- Cordero, J. F., Rodriguez, P. J., & Romero, P. J. (2004). Differences in intramembrane particle distribution in young and old human erythrocytes. *Cell Biol Int*, 28(6), 423-431. doi: 10.1016/j.cellbi.2004.03.002.
- Danon, D., & Marikovsky, Y. (1988). The aging of the red blood cell. A multifactor process. *Blood Cells*, 14(1), 7-18. doi:10.1249/00005768-200505001-00171.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107(4), 1198-1205. doi:10.1016/S0006-291X(82)80124-1.
- de Arvelos, L. R., Rocha, V. C., Felix, G. P., da Cunha, C. C., Bernardino Neto, M., Garrote Filho, M. S., de Fátima Pinheiro C., Resende, E.S., Penha-Silva, N. (2013). Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. *J Membr Biol*, 246(3), 231-242. doi: 10.1007/s00232-013-9524-0.
- de Freitas, M. V., Marquez-Bernardes, L. F., de Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., Goncalves, E. Oliveira A. F., Mascarenhas Netto Rde, C., Neto, M.B., Garrote-Filho. M.S., de Souza, P.C., Penha-Silva, N. (2014). Influence of age on the correlations of

- hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*, 19(7), 424-430. doi: 10.1179/1607845413Y.0000000145.
- Deitrick, R.W. (1991). Intravascular haemolysis in the recreational runner. *Br J Sp Med*, 25(4), 183-187. doi: 10.1136/bjism.25.4.183.
- Dekkers, J. C., van Doornen, L. J., & Kemper, H. C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med*, 21(3), 213-238. doi:10.2165/00007256-199621030-00005.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- Eichner, E. R. (1985). Runner's macrocytosis: a clue to footstrike hemolysis. Runner's anemia as a benefit versus runner's hemolysis as a detriment. *Am J Med*, 78(2), 321-325. doi: 10.1016/0002-9343(85)90443-7.
- El-Sayed, M. S., Ali, N., & El-Sayed Ali, Z. (2005). Haemorheology in exercise and training. *Sports Med*, 35(8), 649-670. doi: 0112-1642/05/0008-0649.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, 5(7), 551-562. doi: 10.1038/sj.cdd.4400404.
- Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., & Bratton, D. L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, 276(2), 1071-1077. doi: 10.1074/jbc.M003649200.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36(4), 327-358. doi: 0112-1642/06/0004-0327.
- Fortier, N., Snyder, L. M., Garver, F., Kiefer, C., McKenney, J., & Mohandas, N. (1988). The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood*, 71(5), 1427-1431. doi: 0006-4971/88/7105-0033.
- Gate, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. D., & Tapiero, H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*, 53(4), 169-180. doi: 10.1016/S0753-3322(99)80086-9.

- Gordon-Smith, T. (2007). Red blood cells. *Surgery*, 25(2), 57-60. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2006.12.004>.
- Gordon-Smith, T. (2013). Structure and function of red and white blood cells. *Medicine*, 41(4), 193-199. doi: 10.1016/j.mpmed.2013.01.023.
- Gratzer, W. B. (1981). The red cell membrane and its cytoskeleton. *Biochem J*, 1981, 1-8. doi: 0306-3283/81/070001.
- Grau, M., Pauly, S., Ali, J., Walpurgis, K., Thevis, M., Bloch, W., & Suhr, F. (2013). RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PLoS One*, 8(2), e56759. doi: 10.1371/journal.pone.0056759
- Guidotti, G. (1972). Membrane proteins. *Annu Rev Biochem*, 41, 731-752. doi: 10.1146/annurev.bi.41.070172.003503.
- Ji, L. L. (1995a). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*, 23, 135-166. doi: 10.2165/00007256-199010040-00003.
- Ji, L. L. (1995b). Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*, 18(6), 1079-1086. doi:10.1016/0891-5849(94)00212-3.
- Kayatekin, B. M., Gonenc, S., Acikgoz, O., Uysal, N., & Dayi, A. (2002). Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol*, 87(2), 141-144. doi: 10.1007/s00421-002-0607-3.
- Klinken, S.P. (2002). Red blood cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 1513–1518. doi:10.1016/S1357-2725(02)00087-0.
- Kosower, N. S. (1993). Altered properties of erythrocytes in the aged. *Am J Hematol*, 42(3), 241-247. doi: 10.1002/ajh.2830420302.
- Koury, M. J., & Ponka, P. (2004). New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr*, 24, 105-131. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306.
- Kuypers, F. A., & de Jong, K. (2004). The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50(2), 147-158. doi:10.1155/2014/764268.
- Lague, P., Zuckermann, M. J., & Roux, B. (2001). Lipid-mediated interactions between intrinsic membrane proteins: dependence on protein size and lipid composition. *Biophys J*, 81(1), 276-284. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75698-6.

- Larrabee, R. C. (1902). Leucocytosis after violent Exercise. *J Med Res*, 7(1), 76-82.
- Lemos, G. S., Marquez-Bernardes, L. F., Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., & Penha-Silva, N. (2011). Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell Biochem Biophys*, 61(3), 531-537. doi: 10.1007/s12013-011-9235-z.
- Letcher, R. L., Pickering, T. G., Chien, S., & Laragh, J. H. (1981). Effects of exercise on plasma viscosity in athletes and sedentary normal subjects. *Clin Cardiol*, 4(4), 172-179. doi:10.1002/clc.4960040405.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A. (2012). *Molecular Cell Biology* (Hardcover Ed. 7 ed.). New York: Freeman, W. H. & Company.
- Low, P. S. (1986). Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. *Biochim Biophys Acta*, 864(2), 145-167. doi: 10.1016/0304-4157(86)90009-2.
- Lucy, J. A. (1972). Functional and structural aspects of biological membranes: a suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Ann N Y Acad Sci*, 203, 4-11. doi: 10.1111/j.1749-6632.1972.tb27849.x.
- Lutz, H. U., Fasler, S., Stammer, P., Bussolino, F., & Arese, P. (1988). Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement in phagocytosis of oxidatively-stressed and in clearance of senescent red cells. *Blood Cells*, 14(1), 175-203. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0_6.
- Mairbaurl, H. (2013). Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Front Physiol*, 4, 332. doi: 10.3389/fphys.2013.00332.
- Manno, S., Takakuwa, Y., & Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 1943-1948. doi: 10.1073/pnas.042688399.
- Martins, E., Silva, J. (1988). Blood rheological adaptation to physical exercise. *Rev Port Hemoreol*, 2, 63-67.
- Mascarenhas Netto Rde, C., Fabbri, C., de Freitas, M. V., Bernardino Neto, M., Garrote-Filho, M. S., Lacerda, M. V., Lima, E.S., Penha-Silva, N. (2014). Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of

- human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res*, 113(3), 863-874. doi: 10.1007/s00436-013-3717-4.
- Massaldi, H. A., Richieri, G. V., & Mel, H. C. (1988). Osmotic fragility model for red cell populations. *Biophys J*, 54(2), 301-308. doi: 10.1016/S0006-3495(88)82960-6.
- McAnulty, S. R., McAnulty, L. S., Nieman, D. C., Morrow, J. D., Utter, A. C., Henson, D. A., Dumke, C. L., Vinci, D. M. (2003). Influence of carbohydrate ingestion on oxidative stress and plasma antioxidant potential following a 3 h run. *Free Radic Res*, 37(8), 835-840. doi:10.1016/j.nutres.2003.10.003.
- McCarthy, D. A., & Dale, M. M. (1988). The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med*, 6(6), 333-363. doi:10.2165/00007256-198806060-00002.
- McCarthy, D. A., Grant, M., Marbut, M., Watling, M., Wade, A. J., Macdonald, I., Nicholson, S., Melsom, D., Perry, J. D. (1991). Brief exercise induces an immediate and a delayed leucocytosis. *Br J Sports Med*, 25 (4), 191-195. doi:10.1136/bjism.25.4.191.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem*, 247(21), 6960-62. doi:10.1111/jfbc.12125.
- Mohandas, N., & Evans, E. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23, 787-818. doi: 10.1146/annurev.bb.23.060194.004035.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
- Motta, V.T. (2009). *Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações* (Medbook Ed. 5 ed.). Rio de Janeiro.
- Mulquiney, P. J., & Kuchel, P. W. (1999). Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: computer simulation and metabolic control analysis. *Biochem J*, 342 Pt 3, 597-604. doi: 10.1042/0264-6021:3420597.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2014). *Lehninger Principles of Biochemistry* (W. H. F. a. Company Ed. Sixth Edition ed.). New York.

- Nerdrum, H.J., Berg, K.J. (1964). Changes of Serum Glutamic-Oxaloacetic Transaminase and Serum Lactic Dehydrogenase on Physical Exertion. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 16(6), 624-629. doi: 10.3109/00365516409055226.
- Nosadova, J. (1977). The changes in hematocrit, hemoglobin, plasma volume and proteins during and after different types of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 36(3), 223-230. doi: 10.1007/BF00421753.
- Osorio, R. A., Christofani, J. S., D'Almeida, V., Russo, A. K., & Picarro, I. C. (2003). Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 135(1), 89-95.
- Paraiso, L. F., de Freitas, M. V., Goncalves, E. Oliveira A. F., de Almeida Neto, O. P., Pereira, E. A., Mascarenhas Netto, R. C., Cunha, L.M., Bernardino-Neto, M., de Agostini, G.G., Resende, E.S., Penha-Silva, N. (2014). Influence of acute exercise on the osmotic stability of the human erythrocyte membrane. *Int J Sports Med*, 35(13), 1072-1077. doi: 10.1055/s-0034-1371834.
- Penha-Silva, N., Firmino, C. B., de Freitas Reis, F. G., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., de Freitas, M. V., & Netto, R. C. (2007). Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*, 128(7-8), 444-449. doi: 10.1016/j.mad.2007.06.007.
- Perrotta, S., Gallagher, P. G., & Mohandas, N. (2008). Hereditary spherocytosis. *Lancet*, 372(9647), 1411-1426. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61588-3.
- Peyreigne, C., Bouix, D., Micallef, J. P., Mercier, J., Bringer, J., Prefaut, C., & Brun, J. F. (1998). Exercise-induced growth hormone secretion and hemorheology during exercise in elite athletes. *Clin Hemorheol Microcirc*, 19(2), 169-176.
- Poller, L., Priest, C. M., & Thomson, J. M. (1971). Platelet aggregation and strenuous exercise. *J Physiol*, 213(3), 525-531. doi: 10.1113/jphysiol.1971.sp009397.
- Posthuma, J. J., van der Meijden, P. E., Ten Cate, H., & Spronk, H. M. (2014). Short- and Long-term exercise induced alterations in haemostasis: a review of the literature. *Blood Rev*. doi: 10.1016/j.blre.2014.10.005.
- Powers, S., Howley, E. . (2014). *Exercise Physiology: Theory and Application to Fitness and Performance* (9th ed.): McGraw-Hill Higher Education.

- Pribush, A., Hatskelzon, L., Kapelushnik, J., & Meyerstein, N. (2003). Osmotic swelling and hole formation in membranes of thalassemic and spherocytic erythrocytes. *Blood Cells Mol Dis*, 31(1), 43-47. doi: 10.1016/S1079-9796(03)00122-0.
- Reid, M. E., Takakuwa, Y., Conboy, J., Tchernia, G., & Mohandas, N. (1990). Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. *Blood*, 75(11), 2229-2234.
- Rifkind, R. A. (1966). Destruction of injured red cells in vivo. *Am J Med*, 41(5), 711-723. doi: 10.1016/0002-9343(66)90032-5.
- Robinson, Y., Cristancho, E., & Boning, D. (2006). Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes. *Med Sci Sports Exerc*, 38(3), 480-483. doi: 10.1249/01.mss.0000188448.40218.4c.
- Rodwell, V., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W. (2015). *Harper's Illustrated Biochemistry* (30th Ed. Paperback &dash ed.). United States: McGraw-Hill Medical.
- Ronsen, O., Pedersen, B. K., Oritsland, T. R., Bahr, R., & Kjeldsen-Kragh, J. (2001). Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J Appl Physiol* (1985), 91(1), 425-434.
- Santos-Silva, A., Rebelo, M. I., Castro, E. M., Belo, L., Guerra, A., Rego, C., & Quintanilha, A. (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin Chim Acta*, 306(1-2), 119-126. doi:10.1016/S0009-8981(01)00406-5.
- Schaffner, A., Augustiny, N., Otto, R. C., & Fehr, J. (1985). The hypersplenic spleen. A contractile reservoir of granulocytes and platelets. *Arch Intern Med*, 145(4), 651-654. doi: 10.1001/archinte.1985.00360040069016.
- Schmidt, W., Maassen, N., Trost, F., & Boning, D. (1988). Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J Appl Physiol* 57(4), 490-498.
- kiSchroeder, F. (1984). Role of membrane lipid asymmetry in aging. *Neurobiol Aging*, 5(4), 323-333. doi: 10.1016/0197-4580(84)90010-1.
- Shiga, T., Maeda, N., Kon, K. (1990). Erythrocyte Rheology. *Oncology/Hematology*, 10(1), 09-48. doi: doi:10.1016/1040-8428(90)90020-S.

- Shiga, T., Sekiya, M., Maeda, N., Kon, K., & Okazaki, M. (1985). Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, *814*(2), 289-299. doi:10.1016/0005-2736(85)90447-X.
- Signorini, C., Ferrali, M., Ciccoli, L., Sugherini, L., Magnani, A., & Comporti, M. (1995). Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS Lett*, *362*(2), 165-170. doi:10.1016/0014-5793(95)00235-2.
- Sindhi, Vinita, Gupta, Vartika, Sharma, Kameshwar, Bhatnagar, Sonal, Kumari, Reeta, & Dhaka, Neeti. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, *7*(9), 828-835. doi: 10.1016/j.jopr.2013.10.001.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, *175*(4023), 720-731.
- Smith, J.A., Martin, D.T., Telford, R.D., Ballas, S.K. (1999). Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *276* (3).
- Smith, J. A. (1995). Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med*, *19*(1), 9-31. doi:10.2165/00007256-199519010-00002.
- Sowemimo-Coker, S. O. (2002). Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev*, *16*(1), 46-60. doi: 10.1053/tmrv.2002.29404.
- Steck, T. L. (1974). The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol*, *62*(1), 1-19.
- Stephenson, L. A., & Kolka, M. A. (1988). Plasma volume during heat stress and exercise in women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, *57*(4), 373-381. doi: 10.1007/BF00417979.
- Stuart, J., & Nash, G. B. (1990). Red cell deformability and haematological disorders. *Blood Rev*, *4*(3), 141-147. doi:10.1016/0268-960X(90)90041-P.
- Szygula, Z. (1990). Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training. *Sports Med*, *10*(3), 181-197. doi: 10.2165/00007256-199010030-00004.
- Telford, R. D., Sly, G. J., Hahn, A. G., Cunningham, R. B., Bryant, C., & Smith, J. A. (2003). Footstrike is the major cause of hemolysis during running. *J Appl Physiol* (1985), *94*(1), 38-42. doi: 10.1152/jappphysiol.00631.2001.

- Temiz, A., Baskurt, O. K., Pekcetin, C., Kandemir, F., & Gure, A. (2000). Leukocyte activation, oxidant stress and red blood cell properties after acute, exhausting exercise in rats. *Clin Hemorheol Microcirc*, 22(4), 253-259.
- Tozzi-Ciancarelli, M. G., Penco, M., & Di Massimo, C. (2002). Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol*, 86(3), 266-272. doi: 10.1007/s00421-001-0542-8.
- Tsuda, K., Yoshikawa, A., Kimura, K., & Nishio, I. (2003). Effects of mild aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(5-6), 382-386. doi: 10.1046/j.1440-1681.2003.03846.x.
- Urso, Maria L., & Clarkson, Priscilla M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41-54. doi: 10.1016/s0300-483x(03)00151-3.
- Vandewalle, H., Lacombe, C., Lelievre, J. C., & Poirot, C. (1988). Blood viscosity after a 1-h submaximal exercise with and without drinking. *Int J Sports Med*, 9(2), 104-107. doi: 10.1055/s-2007-1024988.
- Wallace, H. W., & Blakemore, W. S. (1970). Intravascular and extravascular hemolysis accompanying extracorporeal circulation. A clinical study. *Circulation*, 42(3), 521-527. doi: 10.1161/01.CIR.42.3.521.
- Walski, T., Chludzinska, L., Komorowska, M., & Witkiewicz, W. (2014). Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *Biomed Res Int*, 2014, 162102. doi: 10.1155/2014/162102.
- Wardyn, G. G., Rennard, S. I., Brusnahan, S. K., McGuire, T. R., Carlson, M. L., Smith, L. M., McGranaghan, S., Sharp, J. G. (2008). Effects of exercise on hematological parameters, circulating side population cells, and cytokines. *Exp Hematol*, 36(2), 216-223. doi: 10.1016/j.exphem.2007.10.003.
- Waugh, R. E., Narla, M., Jackson, C. W., Mueller, T. J., Suzuki, T., & Dale, G. L. (1992). Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood*, 79(5), 1351-1358.

- Wood, S. C., Doyle, M. P., & Appenzeller, O. (1991). Effects of endurance training and long distance running on blood viscosity. *Med Sci Sports Exerc*, 23(11), 1265-1269. doi: 10.1249/00005768-199111000-00011.
- Yalcin, O., Bor-Kucukatay, M., Senturk, U. K., & Baskurt, O. K. (2000). Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained rats. *J Appl Physiol* (1985), 88(6), 2074-2080.
- Yalcin, O., Erman, A., Muratli, S., Bor-Kucukatay, M., & Baskurt, O. K. (2003). Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained human subjects. *J Appl Physiol* (1985), 94(3), 997-1002. doi: 10.1152/jappphysiol.00368.2002.
- Yang, R.F., Zhao, C.G., Wu, Y.P., Wu, X. (1995). Deformability of erythrocytes after exercise. *Biorheology* 32. doi: doi:10.1016/0006-355X(95)92171-6.
- Yeagle, P. L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 822(3-4), 267-287. doi:10.1016/0304-4157(85)90011-5.
- Yeagle, P. L. (1991). Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie*, 73(10), 1303-1310. doi:10.1016/0300-9084(91)90093-G.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO AGUDO NA ESTABILIDADE OSMÓTICA DA MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS

INFLUENCE OF ACUTE EXERCISE ON THE OSMOTIC STABILITY OF THE HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE

Este Capítulo foi redigido de acordo com os padrões da revista *International Journal of Sports and Medicine* na qual foi publicado.

Influence of Acute Exercise on the Osmotic Stability of the Human Erythrocyte Membrane

L. F. Paraiso¹, M. V. de Freitas¹, A. F. M. Gonçalves-e-Oliveira², O. P. de Almeida Neto², E. A. Pereira¹, R. C. Mascarenhas Netto¹, L. M. Cunha¹, M. Bernardino Neto¹, G. G. de Agostini³, E. S. Resende³, N. Penha-Silva¹

¹ Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

² Faculty of Medicine, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

³ Faculty of Physical Education, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Correspondence to: Dr. Nilson Penha-Silva Institute of Genetics and Biochemistry Federal University of Uberlândia. Av. Pará, 1720 Uberlândia Brazil 38400-902 Tel.: + 55/34/3218 2203 × 23 Fax: + 55/34/3218 2203 × 24 nspenha@ufu.br

Keywords: acute exercise, erythrocyte, membrane, hemolysis, osmotic stability

Accepted after revision: February 04, 2014

Published online: 2014 Int J Sports Med © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York.
ISSN 0172-4622

DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1371834>

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos de dois tipos diferentes de exercício aeróbio sobre a estabilidade osmótica da membrana do eritrócito humano e em diferentes variáveis hematológicas e bioquímicas que estão associados a esta propriedade da membrana. A população do estudo consistiu de 20 homens saudáveis e ativos. Os participantes realizaram sessões únicas de dois tipos de exercício. A primeira sessão foi constituída por 60 min de exercício contínuo de intensidade moderada (MICE). A segunda sessão, executada uma semana depois, consistiu em uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade (HIIE) até a exaustão. A estabilidade osmótica da membrana dos eritrócitos foi representada pelo inverso da concentração de sal ($1/H_{50}$) no ponto médio da curva sigmoidal de dependência entre a absorbância da hemoglobina e a concentração de NaCl. Os valores de $1/H_{50}$ se alteraram de $2,29 \pm 0,1$ para $2,33 \pm 0,09$ após MICE e de $2,30 \pm 0,08$ para $2,23 \pm 0,12$ após HIIE. Durante o MICE o volume corpuscular médio aumentou, provavelmente devido à lise *in vivo* dos eritrócitos mais velhos, com preservação de células que eram maiores e mais resistentes a lise *in vitro*. O estudo mostrou que uma única sessão de exercício agudo afetou a estabilidade osmótica de eritrócitos, ocorrendo aumento após MICE e diminuição após HIIE.

Palavras-chave: exercício agudo, eritrócitos, membrana, hemólise, estabilidade osmótica

ABSTRACT

This study evaluated the effects of two different types of acute aerobic exercise on the osmotic stability of human erythrocyte membrane and on different hematological and biochemical variables that are associated with this membrane property. The study population consisted of 20 healthy and active men. Participants performed single sessions of two types of exercise. The first session consisted of 60 min of moderate-intensity continuous exercise (MICE). The second session, executed a week later, consisted of high-intensity interval exercise (HIIE) until exhaustion. The osmotic stability of the erythrocyte membrane was represented by the inverse of the salt concentration ($1/H_{50}$) at the midpoint of the sigmoidal curve of dependence between the absorbance of hemoglobin and the NaCl concentration. The values of $1/H_{50}$ changed from 2.29 ± 0.1 to 2.33 ± 0.09 after MICE and from 2.30 ± 0.08 to 2.23 ± 0.12 after HIIE. In MICE has occurred an increase in the mean corpuscular volume, probably due to *in vivo* lysis of older erythrocytes, with preservation of cells that were larger and more resistant to *in vitro* lysis. The study showed that a single bout of acute exercise affected the erythrocyte osmotic stability, which increased after MICE and decreased after HIIE.

Keywords: acute exercise, erythrocyte, membrane, hemolysis, osmotic stability

1- INTRODUCTION

Numerous cellular processes such as signal transduction, solute transport and cellular interactions are mediated by membrane (Derby & Gleeson, 2007). For optimal functioning, the cell membranes should particularly associate stability and functionality, properties that depend on their degree of fluidity (Garcia et al., 1997; Stubbs & Smith, 1984).

The membrane fluidity is an important physiochemical property. In the erythrocytes, in particular, this property is responsible for modulating functions such as permeability and transport of ions and oxygen, as well as the activities of membrane-associated enzymes (Berzosa et al., 2011). The excess and lack of fluidity are undesirable characteristics that affect cell physiology and can contribute to loss of stability and acceleration of membrane destruction, leading to cell death (Garcia et al., 2005; Sinensky, 1974).

Blood cells are a good model to study the stability of biological membranes. Currently, the erythrocytes are considered the most convenient cell type for such investigations, since they are simpler and stable cells, whose lysis can be spectrophotometrically monitored in the visible region of spectrum, due to the release of hemoglobin in the solvent. In addition, changes in the composition and behavior of their membranes may reflect the composition and behavior of other cells (de Freitas et al., 2008; G. S. D. Lemos, L. F. Marquez-Bernardes, L. R. Arvelos, L. F. Paraiso, & N. Penha-Silva, 2011; Steck, 1974).

There are many agents that may affect the stability and functionality of membranes, such as heat (Yatvin, 1977), reactive oxygen species (ROS) (Berzosa et al., 2011; Gonsette, 2008; Hensley, Robinson, Gabbita, Salsman, & Floyd, 2000), solutes which stimulate the self-organization of the membrane (such as water and osmolytes) and solutes that can promote their disorganization, such as ethanol (Cunha, Arvelos, Costa, & Penha-Silva, 2007; Penha-Silva et al., 2008) and sodium dodecyl sulfate (Fonseca et al., 2010). The environment in which the red blood cell is found, it is also a decisive factor in determining the composition and fluidity of the cell membrane, and it can be modified by diet, exercise and various diseases (de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2010).

The intake of essential fatty acids of the ω -3 and ω -6 families increases the supply conditions of membrane phospholipids in the body, which contributes to decrease in the cholesterol/phospholipids ratio and increased membrane fluidity. In erythrocytes, these changes favor the occurrence of the morphological changes required to allow their passage through capillaries of small diameter, ensuring the exercise of their functions (W. S. An et al., 2012; Berlin et al., 1992; Cartwright, Pockley, Galloway, Greaves, & Preston, 1985; De Moffarts et al., 2007).

Physical exercise is characterized by increased consumption of oxygen throughout the body, especially by the muscles. The regular practice of physical exercise promotes adaptations in blood rheology, with changes in aggregation, deformability and fluidity of erythrocytes, towards improving efficiency in the collection, transport and delivery of oxygen to tissues (J. F. Brun, 2002; J. F. Brun et al., 1998). The increase in oxygen consumption during exercise is associated with an increased production of reactive oxygen species (ROS), which act by promoting a series of physiological and biochemical changes in the body (Alessio, 1993; Santos-Silva et al., 2001). The excessive production of ROS in relation to their physiological demand and the anti-oxidant defenses creates a condition called oxidative stress, which can manifest on all cellular structures, especially biological membranes. The direct action of the ROS on the erythrocyte membrane can alter its structure and physicochemical properties (Cazzola et al., 2003; Santos-Silva et al., 2001; Soffler, 2007).

Surely, these physicochemical properties must include the stability of erythrocyte membrane. As physical exercise has the ability to promote changes in the oxidative status of the organism, hematological indices and the supply conditions of membrane lipids, the erythrocyte must be influenced by exercise. Undoubtedly, this influence must be well understood, as it is the red blood cell that carries oxygen to the muscle, although the muscle is the agent of the mechanical contraction during exercise. Although previous studies have shown that physical exercise can promote changes in cell membranes (Berzosa et al., 2011; J. F. Brun, 2002; J. F. Brun et al., 1998; J. F. Brun, Connes, P., Varlet-Marie, E., 2007; Brzeczynska et al., 2008; Cazzola et al., 2003; Tsuda et al., 2003), no studies have evaluated the effects of intensity and duration of exercise on the osmotic stability of erythrocytes. It is within this context that the present study investigated the

effects of two different types of acute aerobic exercise on osmotic stability of the erythrocyte membrane and on several hematological and biochemical indices.

2- MATERIAL AND METHODS

2.1 Population

This study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Federal University of Uberlândia (337/11), and all the volunteers involved in the study signed a free informed consent. The study conforms with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and with the international ethical standards in sport and exercise science research (Harriss & Atkinson, 2011). The study included 20 healthy men who practiced some type of regular physical activity for at least six months without any injury or damage to health that might influence physical activity. The volunteers were non-smokers and non-chronic users of alcohol, drugs and / or medications.

2.2 Experimental procedures

The volunteers performed single sessions of two types of acute aerobic exercise: moderate-intensity continuous exercise (MICE) and high-intensity interval exercise (HIIE).

The evaluation of the aerobic capacity of the participants was performed in maximal aerobic test of 5 minutes duration (T5) (Berthon et al., 1997). The total distance covered in 5 minutes was used to obtain the maximal aerobic speed (MAS) of each volunteer. The speed at which each volunteer should accomplish his exercise session was calculated from his value of MAS.

Volunteers were advised to feed normally and do not perform any exercise in the 24 hours before the sessions. The exercise sessions were performed in the morning at the running track (200 meters) of the Faculty of Physical Education of the Federal University of Uberlândia. The exercise sessions were preceded by low-intensity warming-up for 10 minutes.

The first type of exercise was the MICE and consisted of 60-min of *running* at 65% of MAS. A week later, the volunteers returned to the site and performed the second type of exercise (HIIE), which consisted in the repetition of 2.5-min cycles of running at 100%

and 50% of MAS, until exhaustion, i.e., when the volunteer could no longer maintain the speed in the exercise.

2.3 Blood collections

Blood samples were collected by venipuncture before and immediately after both exercise sessions in evacuated tubes (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, Brazil) containing EDTA (for hematological evaluations and determination of the erythrocytes stability), heparin (for the determination of the activity of glutathione peroxidase) and without anticoagulant (for biochemical determinations).

2.4 Determination of hematological and biochemical variables and activity of glutathione peroxidase (GPx)

Routine hematological variables, including erythrocytes (RBC), total leukocytes (Leu) and platelets (Pt) counts, hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), were obtained in an automated hematology analyzer (Cell-Dyn 3700, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL), and determinations of human serum albumin (HSA), uric acid (UA), glucose (Glu), total cholesterol (t-C), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), very low density lipoprotein (VLDL-C), total lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), creatine kinase MB (CK-MB) and serum iron (Fe), were done in an automated biochemical analyzer (ArchITect C 8000, Abbott Diagnostics). The activity of GPx was determined using a commercial kit (Ransel, Randox, United Kingdom).

2.5 Evaluation of osmotic stability of the erythrocyte membrane

NaCl (Labsynth, Diadema, Brasil) used had an ACS purity grade and its solutions were prepared only in ultrapure water (Millipore Corporation, São Paulo, Brazil), using an analytic balance (Shimadzu, model AW220, Japan). The volume measurements were made with automatic pipettes (Labsystems, Helsinki, Finland).

Duplicate sets of microtubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) containing 1.5 ml of 0.1-0.9 g.dl⁻¹ NaCl were preincubated for 10 min at 37 °C in a thermostated water bath (Marconi, MA 184 model, Piracicaba, SP, Brazil). After adding 10 µl of total blood, the tubes were sealed, gently mixed, incubated for 30 min at 37 °C and then centrifuged at 1600 x g for 10 min at 37 °C in a Hitachi Koki centrifuge (CF15RXII model, Hitachinaka, Japan). The absorbance at 540 nm of supernatants was read in a Shimadzu spectrophotometer (UV1650TC model, Japan).

The relationship between absorbance at 540 nm (A_{540}) and the NaCl concentration (X) was adjusted to a sigmoidal regression line (Figure 1) according to the Boltzmann equation:

$$A_{540} = \frac{A_{\min} - A_{\max}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\max} \quad (1),$$

where, A_{\max} and A_{\min} represent the average values of A_{540} at the minimum and maximum plateaus of the sigmoid, respectively, H_{50} is the NaCl concentration (g/dl) capable of promoting 50% hemolysis, and dX is the variation in NaCl concentration responsible for total lysis of the erythrocytes. A_{\max} is the maximal average value of absorbance and is proportional to the amount of hemoglobin released from erythrocytes under the higher hypotonic conditions of the experiment. A_{\min} is the minimum average value of absorbance and may represent the *in vivo* stability of erythrocytes when lysis is not associated with the handling of the patient's blood. The osmotic stability of erythrocytes can be properly expressed by the values of $1/H_{50}$ and dX , since both are directly associated with the osmotic stability of the erythrocyte membrane (Cunha et al., 2007; de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2010; de Freitas et al., 2008; Fonseca et al., 2010; G. S. D. Lemos et al., 2011; Penha-Silva et al., 2008; Penha-Silva, Firmino, Reis, et al., 2007).

2.6 Statistical analyses

The evaluation of the results with respect to normality was accomplished by using the Kolmogorov-Smirnov test. The comparison between the types of exercise (MICE and HIIE) and time (before and after the exercise sessions) were made using Student's t test for paired data. All statistical analyses were performed using Origin 8.5 professional (Microcal, Northampton, MA, USA) or GraphPadPrism 6.01 (La Jolla, CA, USA).

3- RESULTS

All results obtained in this work presented normal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test.

Table 1 shows the anthropometric characteristics and the value of maximal aerobic speed (MAS) of the study participants. The values of these parameters were very homogeneous among the volunteers involved in the study.

Both types of exercise produced statistically significant changes in the osmotic stability variable $1/H_{50}$, but these changes occurred in opposite directions (**Figure 2**). The moderate-intensity continuous exercise (MICE) produced an increase in $1/H_{50}$, while the high-intensity interval exercise (HIIE) has caused a reduction in the values of this parameter. The parameter dX was not affected in any of the two situations.

Both types of exercises also produced significant changes in many hematological variables (**Table 2**). After both types of exercise, the values of RBC, Hb, Ht, Pt and Leu increased. The MCV increased only after the MICE. On the other hand, MCHC decreased only after the HIIE.

A comparison of hematological variables between the two types of exercise showed that after HIIE the total leukocytes count was greater than after MICE, although the total leukocytes count had been greater before HIIE than before MICE. Furthermore, the values of MCHC were lower after HIIE than after MICE (**Table 2**).

Regarding the biochemical parameters, the values of HSA, UA, Glu, t-C, HDL-C and Fe were significantly increased after both kinds of exercise, with significantly higher levels of Glu after HIIE in relation to MICE. Furthermore, after HIIE the iron levels were lower than after MICE. The levels of VLDL-C increased only after the HIIE (**Table 3**).

Among the enzymes indicative of cell injury, LDH increased significantly in both types of exercise. The total CK increased significantly only in MICE, while CK-MB levels increased significantly only in HIIE, although total CK had been higher after HIIE than after MICE (**Table 3**).

The GPx activity increased significantly only after the HIIE and reached a level significantly higher than that obtained after the MICE (**Table 3**).

4- DISCUSSION

The effects of different types of exercise on the composition and fluidity of erythrocyte membrane have been reported in various articles (Berzosa et al., 2011; Brzezczynska et al., 2008; Cazzola et al., 2003; Li, Tong, Xu, & Chan, 1999; Senturk et al., 2005; Yalcin, Erman, Muratli, Bor-Kucukatay, & Baskurt, 2003).

This study was the first to evaluate the influence of two different types of acute aerobic exercise on the osmotic stability of erythrocytes. The determination of the stability of the erythrocyte membrane is a minimally invasive method of analysis, which is of great accuracy and reliability (Cunha et al., 2007; de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2010; de Freitas et al., 2008; Fonseca et al., 2010; Lemos et al., 2011; Penha-Silva et al., 2008).

The present study showed that after performing a single exercise session, both MICE and HIIE changed the erythrocyte stability variable $1/H_{50}$ (**Figure 2**), besides affecting many hematological (**Table 2**) and biochemical (**Table 3**) parameters.

The continuous exercise of moderate intensity promoted an increase in the values of $1/H_{50}$, meaning that there was an increase in the osmotic stability of the erythrocyte membrane. But the high-intensity interval exercise, in turn, caused a reduction in the values of $1/H_{50}$, which means that this type of exercise decreased the osmotic stability of the erythrocyte membrane (**Figure 2**).

The literature on the influence of exercise on erythrocyte membrane shows the absence of a consensus on the issue, with many authors stating that physical exercise promotes a stabilizing effect on the membrane (Berzosa et al., 2011; Brzezczynska et al., 2008; Li et al., 1999), while others saying just the opposite (Cazzola et al., 2003; Kamada, Tokuda, Aozaki, & Otsuji, 1993; Tsuda et al., 2003).

The studies that show that exercise is able to promote destabilization of the membrane relate this effect mainly to oxidation, which is exacerbated during training. The increased production of free radicals and oxidation leads to an increase in lipid peroxidation (Li et al., 1999) and protein carbonyl content (Berzosa et al., 2011), with aggregation of membrane proteins (Brzezczynska et al., 2008), and destabilization of the plasmatic membrane.

The studies claiming that exercise promotes an improvement in the structure of the membrane relate this change to an increase in aerobic capacity and antioxidant activity (Brites et al., 1999; Finaud et al., 2006; Senturk et al., 2005). Tsuda et al. reported an increase in membrane fluidity and decrease in microviscosity of erythrocytes of men with essential hypertension after six months of exercise (Tsuda et al., 2003). Cazzola et al. showed that after three weeks of training there was an increase in membrane fluidity and anti-oxidants levels in erythrocytes of both athletes and sedentary men (Cazzola et al., 2003).

All volunteers in this study had experience with running and most practiced other sports (weightlifting, cycling, tennis or soccer), but none of them was used to perform high-intensity aerobic exercise. Although the two types of training had led to acute increases in serum concentrations of albumin and uric acid, only HIIE increased significantly the values of GPx, certainly by exacerbation of *in vivo* hemolysis by mechanisms that also favored increased *in vitro* hemolysis after this type of exercise.

This mechanism should include increased oxidative aggression caused by exercise. Acute exercise can increase the permeability of the membrane, making it more unstable (J. F. Brun et al., 1998). In fact, lipid peroxidation decreases membrane fluidity and increases its permeability (Radak et al., 1999) in myocytes and in erythrocytes (Finaud et al., 2006; Tavazzi et al., 2000).

Indeed, both types of exercise increased the blood levels of CK or CK-MB, which are indicators of muscle damage, and of total LDH (**Table 3**), which indicate not only the existence of muscle damage but also of intravascular hemolysis (Baird, Graham, Baker, & Bickerstaff, 2012; Brancaccio, Maffulli, Buonauro, & Limongelli, 2008; Brancaccio et al., 2007; Kato et al., 2006; Myhre & Rasmussen, 1970; Myhre, Rasmussen, & Andersen, 1970). Although MICE has promoted a significant increase of total CK and HIIE has promoted a significant increase in CK-MB, total CK levels after HIIE has suffered an elevation with borderline significance ($0.05 < p < 0.10$), which has been harmed because the levels of this enzyme before HIIE were already high, probably due to muscle injury caused by MICE, which had been performed in the previous week (**Table 3**).

Thus, both types of exercise have favored the lysis of myocytes and erythrocytes. In addition to increased oxidative aggression, which should have occurred in both cell

types, particularly in the case of erythrocytes, lysis was also favored by an increase in shear stress (Senturk et al., 2005; Telford et al., 2003).

In spite of the increase in the *in vivo* hemolysis in both types of exercise, after MICE there was a moderate increase in the *in vitro* osmotic stability of the erythrocyte membrane. This condition should be the net result of different and antagonistic contributions.

The cells that had suffered *in vivo* hemolysis would be those weaker and less resistant to mechanical stress, so that only the most resistant and stable cells would have remained (Santos-Silva et al., 2001; Schmidt et al., 1988; Senturk et al., 2005). Indeed, the increased values of MCV observed in MICE (Table 2) suggests an increase in the population of young cells, which are larger (Spodaryk, Berger, & Hauke, 1990) and more resistant to hypotonic lysis (Marks & Johnson, 1958), which is consistent with the increased osmotic stability observed in this type of exercise.

The increased values of RBC, Hb and Ht after both types of exercise (Table 2), which constitutes a process of hemoconcentration (increased proportion of blood cells in relation to plasma volume) (Austin, Patterson, & von Kanel, 2011), would be due to splenocontraction and increased recruitment of erythrocytes to increase the oxygen supply during exercise (J. F. Brun, 2002; J. F. Brun et al., 1998; Yalcin et al., 2003). Although the change in the fluid status may occur due to loss of water through sweat and water input in muscle cells (J. F. Brun, Connes, P., Varlet-Marie, E., 2007), it may also be simply due to increased blood cell count. Anyway, regardless of its origin, the fluid status is the factor that most influences the rheology of erythrocytes during exercise, with stiffening of red blood cells, even 1 h after submaximal exercise (J. F. Brun, 2002; J. F. Brun et al., 1998).

In summary, the results of the study show that acute exercise is able to affect the osmotic stability of erythrocyte membrane. The erythrocyte stability decreased in high-intensity interval exercise, but increased in moderate-intensity continuous exercise. The origin of these effects is complex and should involve different aspects of the oxidation of constituents of the membrane and the set of factors associated with the different hematological and biochemical variables that are changed during the exercise session. Further research with a larger number of volunteers will enable the execution of

multivariate statistical analyses, and allow identification of the variables that have the greatest influence on the stability of human erythrocyte membrane after moderate and high-intensity exercise.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank FAPEMIG (CDS-APQ-01862-09, CDSAPQ-02025-10 and PPM-00485-12), CAPES (PE-NPD AUX 2718/2011) and CNPq (307705/2012-9) for the financial supports that have enable the development of this study.

CONFLICT

None of the authors have financial or non-financial competing interests in the work presented in this manuscript.

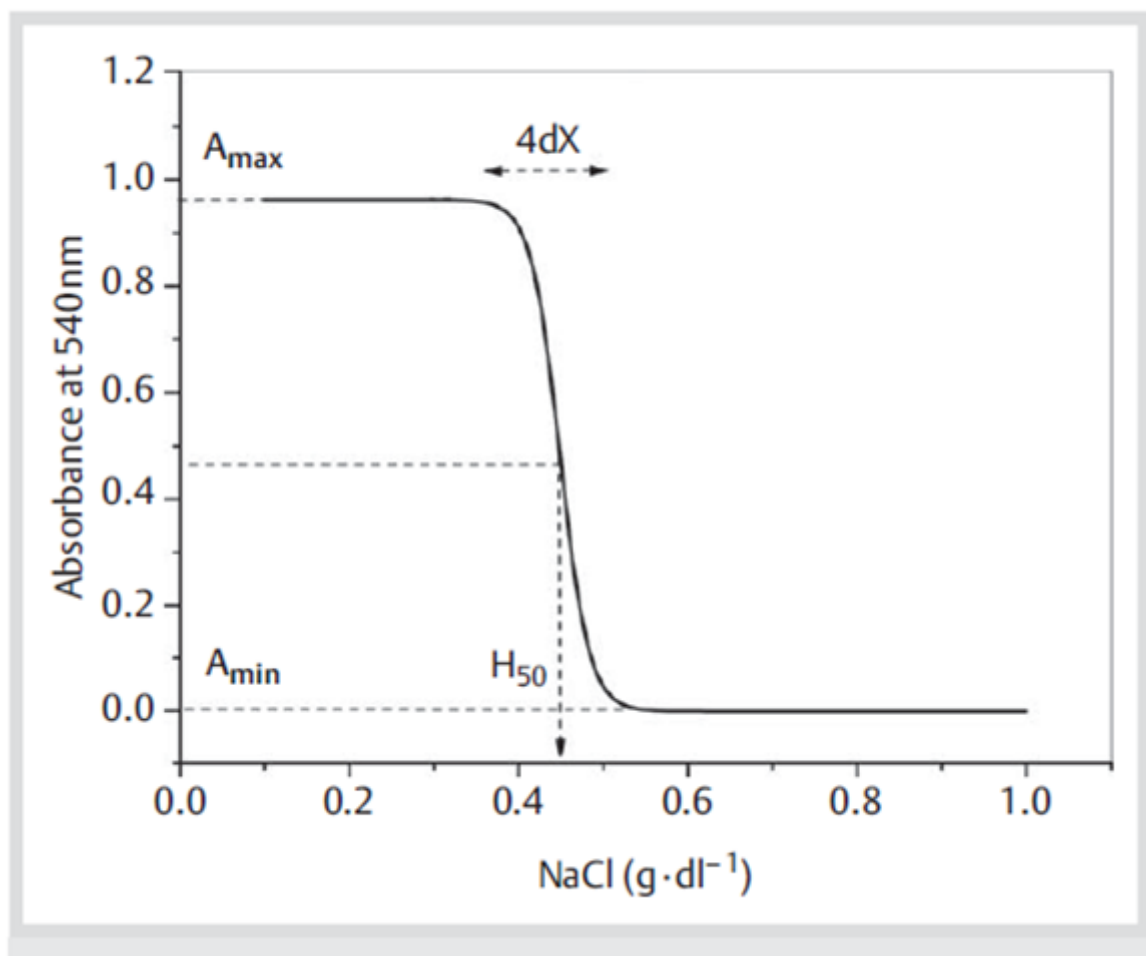


Figure 1. Sigmoidal fitting of a typical curve of hemolysis by NaCl. $1/H_{50}$ is the concentration of NaCl capable of promoting 50 % of hemolysis. dX represents the change in NaCl concentration responsible for the hemolysis transition. A_{\min} and A_{\max} represent the minimum and maximum average values of absorbance, respectively.

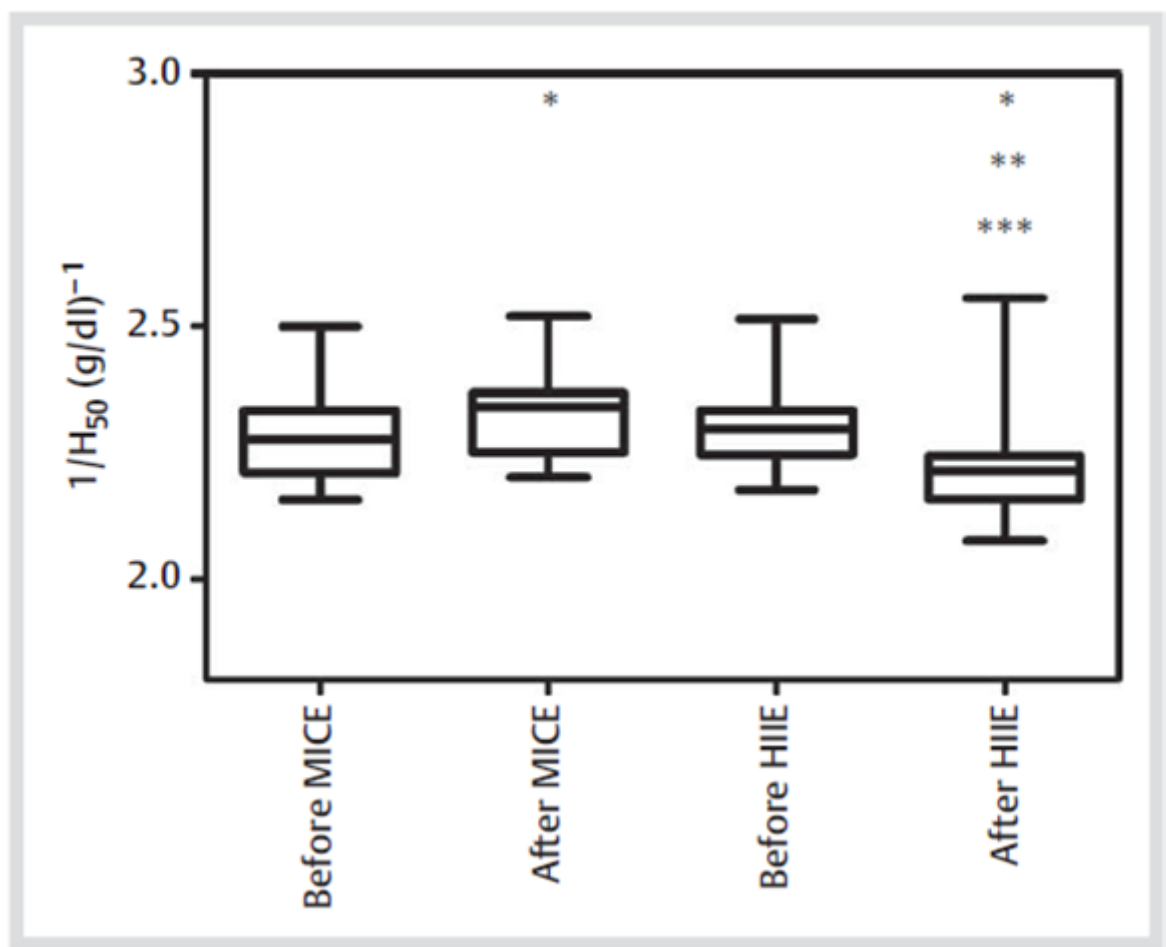


Figure 2. Comparison among the values of the osmotic stability parameter $1/H_{50}$ before and after the single sessions of moderate-intensity exercise (MICE) and high-intensity interval exercise (HIIE). *Statistically significant difference ($P \leq 0.01$) when compared with MICE baseline. **Statistically significant difference ($P \leq 0.00$) when compared with HIIE baseline. ***Statistically significant difference ($P < 0.00$) when compared with after MICE.

Table 1. Anthropometric characteristics and maximal aerobic speed of the study population (n = 20)

Characteristics	Mean	±	sd
Age (years)	24.3	±	3.2
Body Mass Index (kg/m ²)	23.7	±	2.1
Maximal Aerobic Speed (m/min)	261.8	±	17.3

Table 2. Hematological parameters (mean \pm sd) before and after the single sessions of moderate-intensity continuous exercise (MICE) and high-intense interval exercise (HIIE)

Variables	MICE		HIIE	
	Before (Baseline)	After	Before (Baseline)	After
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.44 \pm 0.53	5.63 \pm 0.52*	5.47 \pm 0.53	5.72 \pm 0.53 [#]
Hb (g%)	15.85 \pm 1.1	16.35 \pm 1.12*	15.81 \pm 1.12	16.49 \pm 1.21 [#]
Ht (%)	48.28 \pm 2.98	49.88 \pm 3.24*	48.29 \pm 3.2	51.23 \pm 3.71 [#]
MCV (fl)	88.61 \pm 4.95	89.83 \pm 4.99*	89.1 \pm 5.16	88.74 \pm 4.82
MCH (pg)	29.2 \pm 1.51	29.08 \pm 1.6	29.01 \pm 1.73	28.93 \pm 1.75
MCHC (g/dl)	32.8 \pm 0.78	32.8 \pm 0.76	32.74 \pm 0.78	32.21 \pm 1.06 ^{#,†}
RDW (%)	13.26 \pm 2.11	12.96 \pm 2.05	12.83 \pm 2.05	12.87 \pm 1.78
Leucocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	6.00 \pm 1.4	7.74 \pm 2.03*	6.42 \pm 1.6*	10.295 \pm 2.54 ^{#,†}
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	243.95 \pm 59.15	323.65 \pm 78.33*	245.95 \pm 54.1	312.9 \pm 74.76 [#]

*Statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to MICE baseline

[#]Statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to HIIE baseline

[†]Statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to MICE

Table 3. Comparison of biochemical variables before and after moderate-intensity continuous exercise (MICE) and high-intensity interval exercise (HIEE)

Variables	MICE		HIEE	
	Before (Baseline)	After	Before (Baseline)	After
HSA (g/dl)	4.44 ± 0.43	4.84 ± 0.24*	4.52 ± 0.2	4.94 ± 0.2 [#]
UA (mg/dl)	5.66 ± 0.67	6.21 ± 0.84*	5.6 ± 0.77	6.05 ± 0.80 [#]
GPx (U/l)	8018.5 ± 3250.1	7771.09 ± 4246.31	8556.3 ± 1725.9	10008.16 ± 2334.61 ^{#,†}
Glu(mg/dl)	76.25 ± 19.5	93.35 ± 12.73*	74.8 ± 12.9	114.8 ± 27.13 ^{#,†}
t-C (mg/dl)	156.1 ± 26.52	162.45 ± 25.93*	153.95 ± 22.84	164.95 ± 25.19 [#]
TG (mg/dl)	110.05 ± 66.02	122.2 ± 83.42	103.85 ± 53.08	116.7 ± 66.7
HDL-C (mg/dl)	49.85 ± 9.72	52.75 ± 10.88*	48.63 ± 7.48	52.8 ± 8.78 [#]
VLDL-C (mg/dl)	21.44 ± 12.84	21.4 ± 6.89	20.55 ± 10.51	23.34 ± 13.34 [#]
LDL-C (mg/dl)	83.31 ± 20.27	88.81 ± 20.09	84.77 ± 19.8	88.81 ± 21.94
LDH (U/l)	204.15 ± 53.37	239.8 ± 48.25*	211.65 ± 27.51	249.65 ± 44.55 [#]
CK (U/l)	258.4 ± 168.44	319.16 ± 196.21*	377.67 ± 259.8*	425.09 ± 303.71 [†]
CK-MB (U/l)	20.14 ± 7.46	21.96 ± 4.92	20.9 ± 5.65	25.03 ± 6.08 [#]
Fe (mg/dl)	118.79 ± 37.31	141.73 ± 42.54*	101.32 ± 35.46*	117.8 ± 43.9 ^{#,†}

*Statistically significant difference ($P \leq 0.05$) when compared to MICE baseline

[#]Statistically significant difference ($P \leq 0.05$) when compared to HIEE baseline

[†]Statistically significant difference ($P \leq 0.05$) when compared to MICE

5- REFERENCES

- Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, 25(2), 218-224.
- An, W. S., Lee, S. M., Son, Y. K., Kim, S. E., Kim, K. H., Han, J. Y., Bae, H.R., Park, Y. (2012). Effect of omega-3 fatty acids on the modification of erythrocyte membrane fatty acid content including oleic acid in peritoneal dialysis patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 86(1-2), 29-34. doi: 10.1016/j.plefa.2011.10.009
- Austin, A. W., Patterson, S. M., & von Kanel, R. (2011). Hemoconcentration and Hemostasis During Acute Stress: Interacting and Independent Effects. *Ann Behav Med*, 42(2), 153-173. doi: DOI 10.1007/s12160-011-9274-0.
- Baird, M. F., Graham, S. M., Baker, J. S., & Bickerstaff, G. F. (2012). Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J Nutr Metab*, 2012, 1-13. doi: 10.1155/2012/960363.
- Berlin, E., Bhathena, S. J., Judd, J. T., Nair, P. P., Peters, R. C., Bhagavan, H. N., Ballardbarash, R., Taylor, P. R. (1992). Effects of Omega-3-Fatty-Acid and Vitamin-E Supplementation on Erythrocyte-Membrane Fluidity, Tocopherols, Insulin Binding, and Lipid-Composition in Adult Men. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 3(8), 392-400. doi: Doi 10.1016/0955-2863(92)90013-9.
- Berthon, P., Fellmann, N., Bedu, M., Beaune, B., Dabonneville, M., Coudert, J., & Chamoux, A. (1997). A 5-min running field test as a measurement of maximal aerobic velocity. *Eur J Appl Physiol*, 75(3), 233-238. doi: 10.1007/s004210050153.
- Berzosa, C., Gomez-Trullen, E. M., Piedrafita, E., Cebrian, I., Martinez-Ballarín, E., Miana-Mena, F. J., Fuentes-Broto, L., Garcia, J. J. (2011). Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*, 111(6), 1127-1133. doi: 10.1007/s00421-010-1738-6.
- Brancaccio, P., Maffulli, N., Buonauro, R., & Limongelli, F. M. (2008). Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med*, 27(1), 1-18. doi: 10.1016/j.csm.2007.09.005.
- Brancaccio, P., Maffulli, N., & Limongelli, F. M. (2007). Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull*, 81-82, 209-230. doi: 10.1093/bmb/ldm014.

- Brites, F. D., Evelson, P. A., Christiansen, M. G., Nicol, M. F., Basilio, M. J., Wikinski, R. W., & Llesuy, S. F. (1999). Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci (Lond)*, *96*(4), 381-385. doi: 10.1042/CS19980269.
- Brun, J.F., Connes, P., Varlet-Marie, E. (2007). Alterations of blood rheology during and after exercise are both consequences and modifiers of body's adaptation to muscular activity. *Science & Sports*, *22*, 251-266. doi: 10.1016/j.scispo.2007.09.010.
- Brun, J. F. (2002). Exercise hemorheology as a three acts play with metabolic actors: Is it clinical relevance? *Clinical hemorheology and Microcirculation* *26*, 155-174.
- Brun, J. F., Khaled, S., Raynaud, E., Bouix, D., Micallef, J. P., & Orsetti, A. (1998). The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology? *Clin Hemorheol Microcirc*, *19*(2), 89-104.
- Brzeszczynska, J., Pieniazek, A., Gwozdzinski, L., Gwozdzinski, K., & Jegier, A. (2008). Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*, *33*(6), 1223-1231. doi: 10.1139/H08-125.
- Cartwright, I. J., Pockley, A. G., Galloway, J. H., Greaves, M., & Preston, F. E. (1985). The effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on erythrocyte membrane phospholipids, erythrocyte deformability and blood viscosity in healthy volunteers. *Atherosclerosis*, *55*(3), 267-281. doi: 10.1016/0021-9150(85)90106-6.
- Cazzola, R., Russo-Volpe, S., Cervato, G., & Cestaro, B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest*, *33*(10), 924-930. doi: 10.1046/j.1365-2362.2003.01227.x.
- Cunha, C. C., Arvelos, L. R., Costa, J. O., & Penha-Silva, N. (2007). Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr*, *39*(4), 341-347. doi: 10.1007/s10863-007-9092-z.
- de Arvelos, L. R., Rocha, V. C., Felix, G. P., da Cunha, C. C., Bernardino Neto, M., Garrote-Filho, M. S., de Fatima Pinheiro, C., Resende, E.S., Penha-Silva, N. (2013). Bivariate

- and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. *J Membr Biol*, 246(3), 231-242. doi: 10.1007/s00232-013-9524-0.
- de Freitas, M. V., de Oliveira, M. R., dos Santos, D. F., de Cassia Mascarenhas Netto, R., Fenelon, S. B., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J Membr Biol*, 233(1-3), 127-134. doi: 10.1007/s00232-010-9232-y.
- de Freitas, M. V., Netto Rde, C., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., Costa, J. O., Firmino, C. B., & Penha-Silva, N. (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol In Vitro*, 22(1), 219-224. doi: 10.1016/j.tiv.2007.07.010.
- De Moffarts, B., Portier, K., Kirschvink, N., Coudert, J., Fellmann, N., van Erck, E., Letellier, C., Motta, C., Pimcemail, J., Art, T., Lekeux, P. (2007). Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *Vet J*, 174(1), 113-121. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.06.001.
- Derby, M.C., & Gleeson, P.A. (2007). New insights into membrane trafficking and protein sorting. *Int Rev Cytol*, 261, 47-116. doi: 10.1016/S0074-7696(07)61002-X.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36(4), 327-358. doi: 10.1155/2015/28392.
- Fonseca, L. C., Arvelos, L. R., Netto, R. C., Lins, A. B., Garrote-Filho, M. S., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. *J Bioenerg Biomembr*, 42(5), 413-418. doi: 10.1007/s10863-010-9310-y.
- Garcia, J. J., Martinez-Ballarín, E., Millan-Plano, S., Allue, J. L., Albendea, C., Fuentes, L., & Escanero, J. F. (2005). Effects of trace elements on membrane fluidity. *J Trace Elem Med Biol*, 19(1), 19-22. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.07.007.
- Garcia, J. J., Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Escames, G., Yu, B. P., Oh, C.S., & Munoz-Hoyos, A. (1997). Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett*, 408(3), 297-300.

- Gonsette, R.E. (2008). Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci*, 274(1-2), 48-53. doi: 10.1016/j.jns.2008.06.029.
- Harriss, D. J., & Atkinson, G. (2011). Update--Ethical standards in sport and exercise science research. *Int J Sports Med*, 32(11), 819-821. doi: 10.1055/s-0031-1287829.
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., & Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 28(10), 1456-1462. doi:10.1016/S0891-5849(00)00252-5.
- Kamada, T., Tokuda, S., Aozaki, S., & Otsuji, S. (1993). Higher levels of erythrocyte membrane fluidity in sprinters and long-distance runners. *J Appl Physiol*, 74(1), 354-358.
- Kato, G. J., McGowan, V., Machado, R. F., Little, J. A., Taylor, J. th, Morris, C. R., Nichols, J.S., Wang, X., Poljakovic, M., Morris, S. M. J., Gladwin, M. T. (2006). Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, 107(6), 2279-2285. doi: 10.1182/blood-2005-06-2373.
- Lemos, G. S. D., Marquez-Bernardes, L. F., Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., & Penha-Silva, N. (2011). Influence of Glucose Concentration on the Membrane Stability of Human Erythrocytes. *Cell Biochem Biophys*, 61(3), 531-537. doi: DOI 10.1007/s12013-011-9235-z.
- Li, J.X., Tong, C.W., Xu, D.Q., & Chan, K.M. (1999). Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats. *Eur J Appl Physiol* 80(2), 113-117. doi: 10.1007/s004210050566.
- Marks, P. A., & Johnson, A. B. (1958). Relationship between the Age of Human Erythrocytes and Their Osmotic Resistance - Basis for Separating Young and Old Erythrocytes. *J Clin Invest*, 37(11), 1542-1548. doi: Doi 10.1172/Jci103746.
- Myhre, E., & Rasmussen, K. (1970). Serum-lactic-dehydrogenase activity and intravascular haemolysis. *Lancet*, 1(7642), 355. doi:10.1016/S0140-6736(70)90727-0.
- Myhre, E., Rasmussen, K., & Andersen, A. (1970). Serum lactic dehydrogenase activity in patients with prosthetic heart valves: a parameter of intravascular hemolysis. *Am Heart J*, 80(4), 463-468. doi:10.1016/0002-8703(70)90192-4.

- Penha-Silva, N., Arvelos, L. R., Cunha, C. C., Aversi-Ferreira, T. A., Gouvea-e-Silva, L. F., Garrote-Filho, M. S., Finotti, C.J., Bernardino-Neto, M., de Freitas Reis, F.G. (2008). Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry*, 73(1), 23-29. doi: 10.1016/j.bioelechem.2008.04.002.
- Penha-Silva, N., Firmino, C. B., de Freitas Reis, F. G., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., de Freitas, M. V., & Netto, R. C. (2007). Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*, 128(7-8), 444-449. doi: 10.1016/j.mad.2007.06.007.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., Nyakas, C., Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, 27(1-2), 69-74.
- Santos-Silva, A., Rebelo, M. I., Castro, E. M., Belo, L., Guerra, A., Rego, C., & Quintanilha, A. (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin Chim Acta*, 306(1-2), 119-126. doi: 10.1016/S0009-8981(01)00406-5.
- Schmidt, W., Maassen, N., Trost, F., & Boning, D. (1988). Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J Appl Physiol* 57(4), 490-498.
- Senturk, U. K., Gunduz, F., Kuru, O., Kocer, G., Ozkaya, Y. G., Yesilkaya, A., Bor-Kucukatay, M., Uyklu, M., Yalcin, O., Baskurt, O. K. (2005). Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol*, 99(4), 1434-1441. doi: 10.1152/jappphysiol.01392.2004.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation - A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(2), 522-525.
- Soffler, C. (2007). Oxidative stress. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 23(1), 135-157. doi: 10.1016/j.cveq.2006.11.004.

- Spodaryk, K., Berger, L., & Hauke, S. (1990). Influences of physical training on the functional changes of young and old red blood cells. *Mech Ageing Dev*, 55(2), 199-206. doi: 10.1016/0047-6374(90)90027-D.
- Steck, T. L. (1974). The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol*, 62(1), 1-19.
- Stubbs, C.D., & Smith, A.D. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta*, 779(1), 89-137. doi: 10.1016/0304-4157(84)90005-4.
- Tavazzi, B., Di Pierro, D., Amorini, A. M., Fazzina, G., Tuttobene, M., Giardina, B., & Lazzarino, G. (2000). Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem*, 267(3), 684-689. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01042.x.
- Telford, R. D., Sly, G. J., Hahn, A. G., Cunningham, R. B., Bryant, C., & Smith, J. A. (2003). Footstrike is the major cause of hemolysis during running. *J Appl Physiol (1985)*, 94(1), 38-42. doi: 10.1152/jappphysiol.00631.2001.
- Tsuda, K., Yoshikawa, A., Kimura, K., & Nishio, I. (2003). Effects of mild aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(5-6), 382-386. doi: 10.1046/j.1440-1681.2003.03846.x.
- Yalcin, O., Erman, A., Muratli, S., Bor-Kucukatay, M., & Baskurt, O. K. (2003). Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained human subjects. *J Appl Physiol (1985)*, 94(3), 997-1002. doi: 10.1152/jappphysiol.00368.2002.
- Yatvin, M. B. (1977). The influence of membrane lipid composition and procaine on hyperthermic death of cells. *Int J Radiat Biol*, 32(6), 513-521. doi: 10.1080/09553007714551301.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO E CRÔNICO NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DE COMPETIÇÃO

EFFECTS OF ACUTE AND CHRONIC EXERCISE ON THE STABILITY OF ERYTHROCYTE MEMBRANE OF COMPETITIVE SWIMMERS

Este capítulo foi redigido de acordo com os padrões da revista *Plos One*.

Effects of acute and chronic exercise on the stability of erythrocyte membrane of competitive swimmers

Exercise effects on the osmotic stability of the erythrocyte membrane

Lara Ferreira Paraiso¹, Ana Flávia Mayrink Gonçalves-e-Oliveira², Lucas Moreira Cunha¹, Omar Pereira de Almeida Neto², Adriana Garcia Pacheco¹, Karinne Beatriz Gonçalves Araújo¹, Mário da Silva Garrote-Filho¹, Morun Bernardino Neto³, Nilson Penha-Silva¹

¹Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil;

²Faculty of Medicine, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil,

³University of São Paulo, Department of Basic and Environmental Sciences, Lorena, SP, Brazil

RESUMO

Objetivo Este estudo teve por objetivo avaliar a influência de exercício agudo e crônico sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos e vários índices sanguíneos em uma população constituída por 5 atletas do sexo masculino de nível nacional na modalidade natação, ao longo de 18 semanas de treinamento. **Método** As avaliações foram feitas ao início e final da 1ª, 7ª, 13ª e 18ª semanas, quando foram feitas alterações no volume e intensidade de treinamento. Os efeitos manifestados no início daquelas semanas foram considerados decorrentes de adaptações crônicas, enquanto os efeitos observados ao final das semanas foram considerados decorrentes de manifestações agudas da carga de exercício daquela semana. **Resultados** As alterações agudas decorrentes do exercício compreenderam aumento na atividade da creatina quinase (CK) e na quantidade de leucócitos (Leu), e diminuição no hematócrito (Ht) e volume corpuscular médio (MCV), ao final da primeira semana; aumento nas atividades da CK e da lactato desidrogenase (LDH) e nas concentrações de ácido úrico (UA) e Leu, ao final da sétima semana; aumento nos valores de CK, LDH e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), ao final da 13ª semana; e diminuição dos valores do índice de estabilidade osmótica de eritrócitos $1/H_{50}$ e aumento na atividade da CK e na concentração de plaquetas (Plt), ao final da 18ª semana. As alterações crônicas decorrentes do treinamento compreenderam aumento dos valores de $1/H_{50}$, CK, LDH, colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), ferro sérico (Fe), MCV e Plt. **Conclusão** Apesar de o treinamento agudo ter resultado em diminuição na estabilidade osmótica de eritrócitos, provavelmente associada à exacerbação de processos oxidativos durante o exercício intenso, o treinamento crônico ao longo das 18 semanas, resultou em aumento na estabilidade osmótica de eritrócitos, provavelmente pela modulação do teor de colesterol de membrana pelas lipoproteínas de baixa e alta densidade.

Palavras chave: eritrócitos, membrana, estabilidade osmótica, exercício físico

ABSTRACT

Objective This study aimed to evaluate the influence of acute and chronic exercise on erythrocyte membrane stability and various blood indices in a population consisting of five national-level male swimmers, over 18 weeks of training. **Method** The evaluations were made at the beginning and end of the 1st, 7th, 13th and 18th weeks, when volume and training intensity have changed. The effects manifested at the beginning of those weeks were considered due to chronic adaptations, while the effects observed at the end of the weeks were considered due to acute manifestations of the exercise load of that week. **Results** Acute changes resulting from the exercise comprised increases in creatine kinase activity (CK) and leukocyte count (Leu), and decrease in hematocrit (Ht) and mean corpuscular volume (MCV), at the end of the first week; increase in the activities of CK and lactate dehydrogenase (LDH), in the uric acid (UA) concentration and Leu count, at the end of the seventh week; increases in CK and LDH activities and in the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), at the end of the 13th week; and decrease in the value of the osmotic stability index $1/H_{50}$ and increases in the CK activity and platelets (Plt) count, at the end of the 18th week. Chronic changes due to training comprised increase in the values of $1/H_{50}$, CK, LDH, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), serum iron (Fe), MCV and Plt. **Conclusion** Although acute training have resulted in decrease in the osmotic stability of erythrocytes, probably associated with exacerbation of the oxidative processes during intense exercise, chronic training over 18 weeks resulted in increased osmotic stability of erythrocytes, probably by modulation in the membrane cholesterol content by low and high density lipoproteins.

Keywords: erythrocyte membrane, osmotic stability, exercise

1- INTRODUCTION

Physical exercise increases oxygen (O₂) consumption by the body, mainly in the muscle tissues (1, 2). In the case of athletes, a good oxygen uptake is extremely important for tolerance to severe exercise (3, 4). Red blood cells (RBC) should be efficient in O₂ uptake and delivery to meet the high demand of tissues (5). The structure of the membranes of these cells plays an important role in maintaining its functionality; an imbalance in the physicochemical properties of the membrane can make the cell to become dysfunctional, hindering tissue oxygenation (6, 7).

It is known that in athletes regular training is able to make changes and adaptations in the blood rheology, including changes in hematological and biochemical parameters (8-12). These changes can affect membrane properties, such as its stability. The stability can be defined as the membrane's ability to resist lysis against many harmful agents. Many factors that affect the stability of the membrane are well known; among them are diet, age, temperature, use of drugs and some physiological and pathological conditions (13-17).

The osmotic fragility test is a valuable tool to assess the sensitivity of the red cells to osmotic changes in the environment. It is widely used to elucidate the mechanisms affecting the properties of the membrane of erythrocytes (18-20). The analysis of membrane properties using erythrocytes as a model has the advantages of simplicity of the cell, and the easiness in monitoring their lysis by spectrophotometric measurement of the amount of hemoglobin released into the medium (16, 21, 22).

The number of studies involving exercise and membrane stability is scarce (4, 17, 23, 24). Little is known about the role that exercise plays in the erythrocyte membrane. It was in this context that the present study aimed to evaluate the acute and chronic changes in the erythrocyte membrane stability and in hematologic and biochemical indices of professional swimmers engaged in an 18-week pre-competition training program.

2- MATERIAL AND METHODS

2.1 Population

This study was approved by the Committee of Ethics and Human Research of the Federal University of Uberlândia (337/11). Each volunteer involved in the research signed a free and informed consent term. The study included five national level male swimmers (average age of 24 ± 2.3 years; average body mass index of 24.5 ± 1.6 kg/m²). All participants were healthy and did not have any injury or damage to health that could influence the practice of physical exercise. They were non-smokers and non-consumers of alcohol, abuse drugs and long-term prescription medications.

2.2 Protocols of training and blood collection

The athletes were studied since the beginning of the training period that preceded the main competition from which they were going to participate, totaling 18 weeks of training. The evaluations were made at the beginning and end of the 1st, 7th, 13th and 18th weeks, when volume and training intensity have changed (Table 1). The effects manifested the beginning of those weeks were considered due to chronic adaptations, while the effects observed at the end of the week were considered due to acute manifestations of the exercise load of that week.

Blood samples were collected before the athletes perform any physical effort by venipuncture, always in evacuated tubes (Vacutainer; Becton Dickinson, Juiz de Fora, Brazil) containing EDTA as an anticoagulant for determination of erythrogram and evaluation of the erythrocyte membrane stability, and in tubes without anticoagulant, for biochemical assays.

2.3 Determination of hematologic and biochemical variables

The erythrogram (automated Cell-Dyn 3700, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) and biochemical tests (automated analyzer Architect C 8000, Abbott Diagnostics) were carried out in the Clinical Analysis Laboratory of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia. The osmotic fragility test used to evaluate the stability of erythrocytes was conducted at the Laboratory of Biophysical Chemistry of the Federal University of Uberlândia.

The analyzed hematological variables and their reference values were: erythrocytes (RBC), 4.3-5.7 millions/mm³; hemoglobin (Hb), 13.0-17.5%; hematocrit (Ht), 39-50%; mean corpuscular volume (MCV), 81.0-95.1 fl; mean corpuscular hemoglobin (MCH), 26-34 pg; mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), 31-36 g/dl; red-cell distribution width (RDW), 12-15%; leucocytes (Leu), 3.5-10.5 mil/mm³; platelets (Pt), 150-450 mil/mm³; uric acid (UA), 3.5-7.2 mg/dl; creatine kinase (CK), 30-200 U/l; lactate dehydrogenase (LDH), 100-190 U/l; serum iron (Fe), 50-160 µg/dl; total cholesterol (t-C), <170 (optimum) and ≥240 mg/dl (high); high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), ≥40 mg/dl (ideal); low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), <130 (optimum) e ≥160 mg/dl (high); very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), <40 mg/dl; and triglycerides (TGC), <150 (optimum) e ≥200 mg/dl (high).

2.4 Evaluation of the osmotic stability of the erythrocyte membrane

The NaCl solutions (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) were prepared using high purity reagent (99%) in ultrapure water (Millipore Corporation, São Paulo, Brazil). The mass measurements were made using analytical balance (Shimadzu, AW220 model, Japan). Volume measurements were made using automatic pipettes (Labsystems, Helsinki, Finland). Incubations were performed in a thermostatic bath (model 184 MA; Marconi, Piracicaba, Brazil). The absorbance readings were made in a digital spectrophotometer (model UV-1650; Shimadzu, Tokyo, Japan). Centrifugations were performed in a refrigerated centrifuge (model II CF15RX; Hitachi Koki, Hitachinaka, Japan).

The osmotic fragility test was conducted in a duplicate series of microtubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) containing 1.5 ml of NaCl at concentrations ranging from 0.1 a 0.9 g/dl. Initially, the tubes were pre-incubated for 10 minutes at 37 °C in the thermostated bath. After pre-incubation, 10 µl of blood were added to each microtube. After homogenization, the microtubes were incubated for 30 min at 37 °C. Then the microtubes were centrifuged at 1600 x g for 10 minutes at 37 °C and their supernatants were subjected to absorbance readings at 540 nm.

The graphs of absorbance at 540 nm (A_{540}) as a function of the NaCl concentration (X) were fitted to sigmoidal regression lines (Figure 1) according with the Boltzmann equation:

$$A_{540} = \frac{A_{\min} - A_{\max}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\max} \quad (1),$$

where A_{\min} (absorbance units) and A_{\max} (absorbance units) represent respectively the mean values of A_{540} at the minimum and maximum plateaus, H_{50} (g/dl NaCl) is the NaCl concentration capable of promoting 50% hemolysis, and dX (g/dl NaCl) is the variation in the salt concentration that is responsible for the complete hemolysis transition. The parameters dX and $1/H_{50}$ were used to evaluate the osmotic stability of the erythrocyte membrane, since they present same direction associations (17, 25).

2.5 Statistical analyzes

All statistical tests were done using the software Bioestat 5.3 (Mamirauá, Belém, PA, Brazil).

The D'Agostino-Pearson test was used to investigate the existence of normality in the obtained data. The results that were obtained for some variables were not normally distributed. For this reason, comparisons were performed using a non-parametric test for small samples, Wilcoxon Signed Rank Test, which use median values to make comparisons by ranks.

The Wilcoxon Signed Rank Test was used to compare pre-training with post-training times in each of the four collections and to compare the pre-training of first week with the pre-training the 18th week, which allows to investigate the chronic effect of exercise on the analyzed variables. The significance value used in this test was $p \leq 0.063$.

3- RESULTS

Figure 1 shows a typical curve of dependency of the amount of released hemoglobin, given the absorbance at 540 nm, in function of the NaCl concentration in the medium.

Table 1 shows the characterization of the training sessions.

Table 2 shows the median and interquartile deviations (IQR) obtained for each of the variables at the beginning and end of each of the four weeks considered in the study, as well as the results of comparisons made by using the Wilcoxon Signed Rank Test. As previously mentioned, the effects manifested after the end of each week of training were

considered to be due to acute manifestations of that week exercise load. At the end of the 1st week the parameters that have undergone significant acute changes were CK and Leu, which increased, and Ht and MCV, which reduced. At the end of the 7th week, the values of parameters CK, LDH, UA and Leu increased significantly. At the end of the 13th week there were significant increases in A_{max} , CK, MCH and MCHC. At the end of the 18th week there were significant increases in CK and Plt, and a significant decrease in $1/H_{50}$.

As also previously mentioned, the effects that have persisted at the beginning of each week were considered to be due to chronic adaptations of the exercise program. Since $1/H_{50}$ increased in the last week of training in relation to the first week (Table 2), this should mean that the chronic training increased significantly the stability of the RBC membrane. There were also increases in CK, LDH, HDL-C, LDL-C, Fe and Plt, and a significant decrease in the hematological index MCV at the end of the training program (Table 2).

4- DISCUSSION

The major finding of our research was that the training, both acute and chronic, has affected the osmotic stability of erythrocytes, as well as the values of various other parameters studied here. The body of the athletes was affected in some way in every training session, even in the first training, which was a light training, in which neither the intensity nor the volume of exercise were high.

The reduction of $1/H_{50}$ after the acute training with the highest intensity among all (18th week) means that there was a decrease in osmotic stability after this training session. This finding is in agreement with the results found by Paraiso et al., who reported a significant reduction in the value of $1/H_{50}$ when participants performed a high intensity training (17).

In addition to this decline in $1/H_{50}$, at the end of 18th week, the serum levels of CK and the Plt counts also have changed, however they had suffered significant increases. In fact, increases in the values of these parameters have often been described in high-intensity exercise (8, 26). Elevation in platelet count is indicative of oxidative stress and inflammation as a result of performing physical exercise (27-31).

Although this study has not assessed oxidative markers, the relation between exercise and production of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) has been reported by several authors (4, 23, 32-38). Overproduction of RONS is a result of a variety of stressors such as exposure to pollutants (39), excessive intake of energetic nutrients (40), and physical exercise (41). Any situation that induces an abrupt increase in oxygen consumption may result in an acute state of oxidative stress (34). The production of RONS depends on the type (aerobic or anaerobic), intensity (29, 42-44) and duration of the physical exercise (34, 45-47).

Ciancarelli-Tozzi et al. suggested in their study that oxidative stress associated with strenuous exercise produces activation of platelets and causes a reduction in membrane fluidity of these cells. Platelet activation process is mediated by the production of oxidized LDL molecules that inhibit nitric oxide production, an important component of the activation and inhibitor of platelet aggregation (29).

Oxidative stress is also an important factor associated with the reduction in membrane stability, since it is capable of destabilizing the plasma membrane (17), increasing its permeability (48) and reducing its fluidity (29, 49, 50). It is possible that the decrease in the osmotic stability of erythrocytes observed *in vitro* after intense training in this study is directly related to oxidation processes promoted by this specific type of training, which would have destabilized *in vivo* the membrane of those cells.

Oppositely to the acute effects, the chronic effects of training, measured at the beginning of each week considered in the present study, comprised an increase in $1/H_{50}$ and consequently in the membrane stability over time. Few studies have evaluated the chronic effect of exercise on the properties of the RBC membrane (51, 52).

Some studies have used athletes in this type of research (1, 3, 4, 24), but no studies have evaluated the cumulative effect of training athletes in the osmotic membrane stability. The studies found did not evaluate athletes before and after the training period, but just compared the individuals already in training with sedentary individuals in relation to the erythrocyte stability (1, 53). A key differentiator of this study was the use of the athlete himself, before being submitted to the training period, as a control, to investigate the influence of exercise, what was possible because the assessed athletes were coming from a vacation period in which they do not trained.

Kamada et al. evaluated the membrane fluidity of red cells from runner athletes, cyclists and sedentary individuals. The athletes presented higher membrane fluidity compared to sedentary individuals. The authors attributed this increased membrane fluidity in athletes to the occurrence of changes in the lipid composition of the membrane in order to improve the efficiency of oxygen delivery by microcirculation, helping athletes to tolerate the stress of severe exercise (3). Cazzola et al. also found a greater fluidity of erythrocyte membrane in soccer players when compared to sedentary individuals. They associated the greater fluidity to better antioxidant status and also the characteristics of hematological indices of footballers. The volunteers in this group had higher values of MCV, MCHC and Ht, compared with the group of sedentary individuals (1).

In this study, some hematologic indices suffered changes from the first to the last week of training. The results suggest that training has promoted a change in the characteristics of red blood cells, with a predominance of smaller erythrocytes at the 18th week, since there was a significant decrease in MCV. This may be due to the development of a nutritional deficiency frame during the training period, since selective nutritional deficiencies associated with training can affect erythropoiesis. Indeed, Shiraki et al. reported a decrease in the number of erythrocytes over a period of 21 days of training in active individuals with a low protein diet when compared to subjects with medium and high intake of protein. Despite the reduction in the number of red blood cells observed in these subjects, there was a higher production of reticulocytes during the training period, especially in the group with higher protein intake. These changes were reflected in the osmotic fragility, since the regular training was associated with an increase in the osmotic stability of erythrocytes. In this study, the authors were able to conclude that exercise activates erythropoiesis, but the red blood cell production is closely related to nutritional status, especially with the protein status of the individual (52).

Furthermore, the decrease in osmotic fragility is also related to acceleration of the turnover (54) and increase in the number of young erythrocytes, since they are more resistant to lysis in hypotonic saline solutions (55, 56). Unfortunately the present study did not assess the nutritional status of individuals, but only the levels of serum iron, which remained within the reference range. The significant increase in this parameter at the end of the 18 training weeks may be an indication of increased cell turnover as an adaptive

response to exercise, because iron is essential for the RBC production and, consequently, to the transport O₂ and CO₂ through the body (57). The increase in cell turnover due to chronic training is a process shown by many authors as being an adaptive response of the body to remove old cells, which exhibit alterations in their structure and rheology, for young cells, which are more stable and more efficient in performing their transport functions (58).

Another factor that is also involved in the process of acceleration of cell turnover caused by exercise is the increased intravascular lysis of erythrocytes during physical effort (59, 60). Spodaryk stated that the training of swimmers stimulates erythropoiesis and that old cells are eliminated faster due to increased intravascular hemolysis that occurs during the course of exercising (61).

Over the weeks of training there were significant elevations in serum levels of HDL-C and LDL-C, but still staying within the reference range. These elevations may be related to modulation of the membrane fluidity to enhance its functionality, since the content of cholesterol in erythrocyte membrane reflects the blood cholesterol levels of high and low density lipoproteins (62, 63). The increase in the cholesterol content until a critical level allows the membrane to become more stable and have the critical fluidity which is necessary to perform its functions. Beyond this critical level, the increase in the cholesterol content leads to decrease in membrane fluidity and impairment of its functions (64). HDL plays a major role throughout the body by removing excess cholesterol from a membrane, so that it can congregate greater stability with the critical flow necessary to perform their functions. The increase in HDL-C levels shown in this paper indicates the occurrence of an increase in the efficiency of the mechanisms of excess cholesterol removal from the membranes of extra-hepatic tissues and cells to ensure the critical membrane fluidity and promote the so-called reverse transport of cholesterol to the liver.

Despite the small sample size, a common limitation in studies involving high-level athletes, significant results were found in this study. Although acute exercise have led to the decrease in osmotic stability of erythrocytes, chronic training for 18 weeks has led to an increase in the osmotic stability of erythrocytes, probably by the modulation of the membrane cholesterol content by the low and high density lipoproteins.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank FAPEMIG (PPM-00485-12), CAPES (PE-PNPD AUX2718/2011) and CNPq (307705/2012-9 and 306608/2015-4) for the financial support that enabled the development of this study.

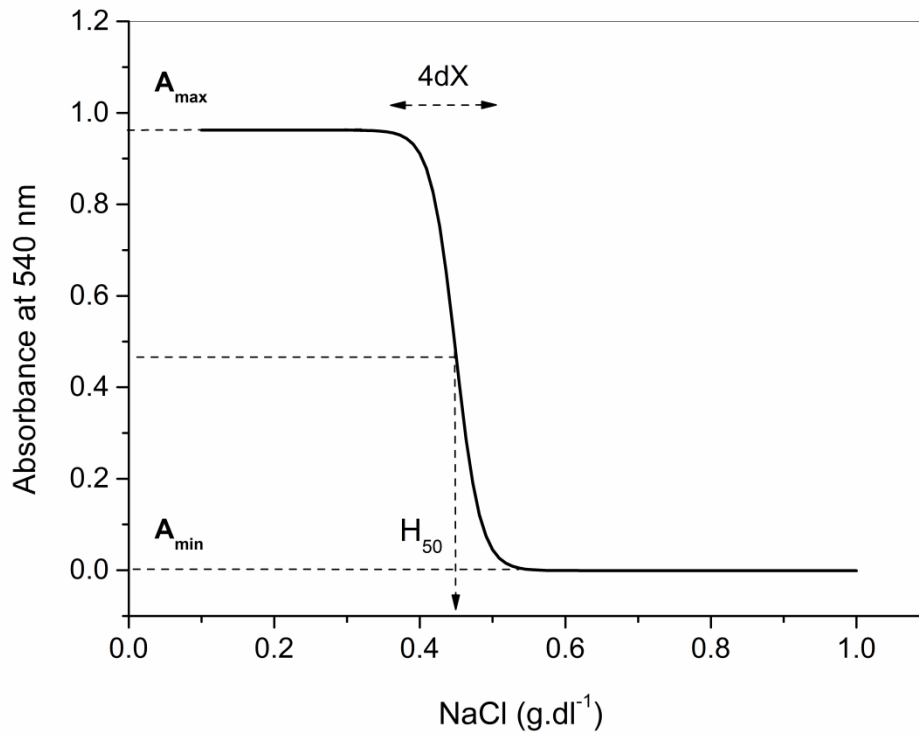


Figure 1. Typical curve of erythrocytes lysis curve by decrease in the NaCl concentration. Data were adjusted by sigmoidal regression. H_{50} is the salt concentration needed to promote 50% hemolysis and $4dX$ is the variation in salt concentration needed to promote 100% hemolysis associated with the transition from the minimum residual value (A_{min}) to the maximum value of absorbance (A_{max}). As dX and H_{50} have direct and reverse associations with the osmotic stability of erythrocytes, values of $1/H_{50}$ and dX were always used in this study in order to deal just with variables directly proportional to osmotic stability.

Table 1. Characterization of training sessions

Week	Volume*	Intensity**
1	1	1
7	4	2
13	3	3
18	2	4

* The volume was represented by the distance in kilometers that the athlete swam weekly (1 = 18 km/week; 2 = 30 km/week; 3 = 40 km/week and 4 = 50 km/week). ** The intensity was related to the swimming time in relation to individual values obtained in previous competitions for each athlete. The closer each athlete was in relation to his maximum swimming time, the greater the intensity of his training. The intensities were classified as: 1 (50-70%); 2 (72-82%); 3 (85-90%) and 4 (88-100%).

Table 2. Comparison between the values of variables before (pre-training) and after (post-training) each training session

Variables		Weeks of regular training			
		1st	7th	13th	18th
		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)
A _{max} (AU)	Pre-training	0.89 (0.05)	0.96 (0.07)	0.90 (0.01)	0.91 (0.05)
	Post-training	0.88 (0.04)	0.96 (0.13)	1.01 (0.06) ^c	0.90 (0.03)
A _{min} (AU)	Pre-training	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)
	Post-training	0.00 (0.00)	0.01 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.00)
1/H ₅₀ ((g/dl) ⁻¹ NaCl)	Pre-training	2.17 (0.06)	2.26 (0.04)	2.25 (0.03)	2.44 (0.1) ^a
	Post-training	2.19 (0.09)	2.29 (0.04)	2.31 (0.03)	2.25 (0.05) ^d
dX (g/dl NaCl)	Pre-training	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	0.01 (0.01)
	Post-training	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)
UA (mg/dl)	Pre-training	4.46 (0.68)	5.42 (0.87)	5.04 (0.14)	5.4 (0.2)
	Post-training	4.58 (0.59)	7.43 (0.83) ^b	5.36 (0.15)	5.7 (0.9)
RBC (10 ⁶ /mm ³)	Pre-training	5.34 (0.43)	5.45 (0.36)	5.5 (0.28)	5.42 (0.81)
	Post-training	5.19 (0.43)	5.19 (0.47)	5.38 (0.13)	5.03 (0.16)
Hb (g%)	Pre-training	15.8 (0.4)	16.1 (0.5)	15.7 (0.6)	15.6 (0.6)
	Post-training	15.6 (0.7)	15.3 (0.6)	15.3 (1.2)	15.5 (0.2)
Ht (%)	Pre-training	48.7 (2.3)	49.7 (2.1)	49 (1.2)	48.1 (4.1)
	Post-training	47 (1.8) ^a	47 (3.4)	46.4 (2.6)	45.2 (0.4)
MCV (fl)	Pre-training	91.7 (3.4)	91.5 (2.5)	89.1 (3.1)	90.6 (4.2) ^a
	Post-training	91 (1.8) ^a	91.4 (2.3)	86.9 (2.5)	90.3 (2.3)
MCH (pg)	Pre-training	29.7 (0.7)	29.8 (0.9)	28.4 (1.4)	30.6 (1.4)
	Post-training	29.9 (1)	29.8 (0.8)	28.7 (1.4) ^c	31.1 (1.1)
MCHC (g/dl)	Pre-training	32.4 (0.1)	32.3 (0.5)	31.8 (0.4)	33.2 (0.7)
	Post-training	32.9 (0)	32.3 (0.3)	32.7 (0.7) ^c	34.4 (0.7)
RDW (%)	Pre-training	14.8 (0.2)	15.5 (1.3)	12 (1)	14.6 (0.6)
	Post-training	14.6 (0.9)	15.4 (0.9)	11 (1)	15.1 (0.4)
Leu (10 ³ /mm ³)	Pre-training	6.4 (1.4)	5.9 (1.4)	6 (2.2)	6 (0.4)
	Post-training	8.4 (1.7) ^a	10.1 (4.4) ^b	8.8 (2.8)	8.6 (4.4)
Plt (10 ³ /mm ³)	Pre-training	232 (27)	236 (17)	252 (41)	256 (9) ^a
	Post-training	247 (31)	249 (36)	262 (25)	288 (25) ^c
Fe (µg/dl)	Pre-training	58 (0.8)	89.6 (11.8)	88.9 (41.3)	106.5 (32.8) ^a
	Post-training	52.6 (9.2)	76.6 (24.6)	87.4 (24.9)	99.7 (35.4)

CK (U/l)	Pre-training	183 (93)	183 (108)	180 (61)	360 (49) ^a
	Post-training	230 (97) ^a	389 (68) ^b	301 (104) ^c	496 (69) ^c
LDH (U/l)	Pre-training	144 (26)	180 (15)	211 (17)	255 (76) ^a
	Post-training	164 (20)	241 (22) ^b	201 (29)	249 (6)
t-C (mg/dl)	Pre-training	163 (22)	222 (36)	190 (56)	198 (32)
	Post-training	143 (28)	210 (52)	195 (9)	203 (26)
TGC (mg/dl)	Pre-training	127 (71)	116 (20)	117 (6)	107 (49)
	Post-training	163 (67)	100 (14)	98 (28)	182 (25)
HDL-C (mg/dl)	Pre-training	40.5 (2.4)	59.5 (11.3)	60.3 (13.4)	58.4 (4.2) ^a
	Post-training	40 (2.7)	58.7 (5.1)	57.5 (16.6)	58.5 (4.2)
VLDL-C (mg/dl)	Pre-training	23 (24.4)	20.6 (3.4)	23.4 (1.8)	21.4 (9.8)
	Post-training	28 (13.6)	20.8 (3.8)	19.6 (5.6)	36.4 (5)
LDL-C (mg/dl)	Pre-training	76.7 (12.3)	142.7 (43.4)	102 (38.1)	119.6 (6.5) ^a
	Post-training	82.1 (33.7)	137.1 (38.1)	101.5 (30.6)	104.5 (29.9)

^ap<0.063 indicates a statistically significant difference in relation to pre-training of the first training session; ^bp<0.063 indicates a statistically significant difference in relation to pre-training of the second training session; ^cp<0.063 indicates a statistically significant difference in relation to pre-training of the third training session; ^dp<0.063 indicates a statistically significant difference in relation to pre-training of the fourth training session.

5- REFERENCES

1. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *European Journal of Clinical Investigation*. 2003 Oct;33(10):924-30. PubMed PMID: WOS:000185445800014. English.
2. Brun JF, Connes P, Varlet-Marie E. Alterations of blood rheology during and after exercise are both consequences and modifiers of body's adaptation to muscular activity. *Science & Sports*. 2007 Dec;22(6):251-66. PubMed PMID: WOS:000251829100001. English.
3. Kamada T, Tokuda S, Aozaki S, Otsuji S. Higher Levels of Erythrocyte-Membrane Fluidity in Sprinters and Long-Distance Runners. *Journal of Applied Physiology*. 1993 Jan;74(1):354-8. PubMed PMID: WOS:A1993KJ48000049. English.
4. Smith JA, Kolbuch-Braddon M, Gillam I, Telford RD, Weidemann MJ. Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995;70(5):427-36. PubMed PMID: 7671878.
5. Jensen FB. The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow. *J Exp Biol*. 2009 Nov;212(Pt 21):3387-93. PubMed PMID: 19837879.
6. Shiga T, Maeda N, Kon K. Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1990;10(1):9-48. PubMed PMID: 2183812.
7. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):3939-48. PubMed PMID: WOS:000260691300010. English.
8. El-Sayed MS, Ali N, Ali ZES. Haemorheology in exercise and training. *Sports Medicine*. 2005;35(8):649-70. PubMed PMID: WOS:000231487900001. English.
9. Kayatekin BM, Ozcaldiran B, Aksu I, Topcu A, Ustuntas AE, Acikgoz O, et al. Effects of Swimming on Erythrocyte Rheological Properties. *Biology of Sport*. 2010;27(2):99-103. PubMed PMID: WOS:000279499200005. English.

10. Brun JF, Connes, P., Varlet-Marie, E. Alterations of blood rheology during and after exercise are both consequences and modifiers of body's adaptation to muscular activity. *Science & Sports*. 2007;22:251–66.
11. Brun JF. Exercise hemorheology as a three acts play with metabolic actors: Is it of clinical relevance? *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2002;26(3):155-74. PubMed PMID: WOS:000176489700003. English.
12. Brun JF, Khaled S, Raynaud E, Bouix D, Micallef JP, Orsetti A. The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology? *Clin Hemorheol Microcirc*. 1998 Oct;19(2):89-104. PubMed PMID: 9849922.
13. Bernardino Neto M, de Avelar EB, Jr., Arantes TS, Jordao IA, da Costa Huss JC, de Souza TM, et al. Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*. 2013;50(5-6):305-20. PubMed PMID: 24398611.
14. de Arvelos LR, Rocha VC, Felix GP, da Cunha CC, Bernardino Neto M, da Silva Garrote Filho M, et al. Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. *J Membr Biol*. 2013 Mar;246(3):231-42. PubMed PMID: 23344659.
15. de Freitas MV, Marquez-Bernardes LF, de Arvelos LR, Paraiso LF, Goncalves EOAF, Mascarenhas Netto Rde C, et al. Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*. 2014 Oct;19(7):424-30. PubMed PMID: 24290772.
16. Lemos GS, Marquez-Bernardes LF, Arvelos LR, Paraiso LF, Penha-Silva N. Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell Biochem Biophys*. 2011 Dec;61(3):531-7. PubMed PMID: 21735128.
17. Paraiso LF, de Freitas MV, Goncalves EOAF, de Almeida Neto OP, Pereira EA, Mascarenhas Netto RC, et al. Influence of acute exercise on the osmotic stability of the human erythrocyte membrane. *Int J Sports Med*. 2014 Dec;35(13):1072-7. PubMed PMID: 25144434.

18. Walski T, Chludzinska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:162102. PubMed PMID: 24527436. Pubmed Central PMCID: 3909971.
19. Massaldi HA, Richieri GV, Mel HC. Osmotic fragility model for red cell populations. *Biophys J.* 1988 Aug;54(2):301-8. PubMed PMID: 3207827. Pubmed Central PMCID: 1330297.
20. Nagasawa T, Sudo K, Nishi N, Sarashi A, Kimura E. Graphic analysis of osmotic fragility of erythrocytes. *Tohoku J Exp Med.* 1976 Nov;120(3):277-85. PubMed PMID: 996851.
21. Steck TL. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol.* 1974 Jul;62(1):1-19. PubMed PMID: 4600883. Pubmed Central PMCID: 2109190.
22. de Freitas MV, Netto Rde C, da Costa Huss JC, de Souza TM, Costa JO, Firmino CB, et al. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol In Vitro.* 2008 Feb;22(1):219-24. PubMed PMID: 17855047.
23. Brzeszczynska J, Pieniazek A, Gwozdziński L, Gwozdziński K, Jegier A. Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme.* 2008 Dec;33(6):1223-31. PubMed PMID: WOS:000261809300019. English.
24. Spodaryk K, Berger L, Hauke S. Influences of physical training on the functional changes of young and old red blood cells. *Mech Ageing Dev.* 1990 Aug;55(2):199-206. PubMed PMID: 2232912.
25. Mascarenhas Netto Rde C, Fabbri C, de Freitas MV, Bernardino Neto M, Garrote-Filho MS, Lacerda MV, et al. Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res.* 2014 Mar;113(3):863-74. PubMed PMID: 24322291.
26. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull.* 2007;81-82:209-30. PubMed PMID: 17569697.

27. Kayashima S, Ohno H, Fujioka T, Taniguchi N, Nagata N. Leucocytosis as a marker of organ damage induced by chronic strenuous physical exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995;70(5):413-20. PubMed PMID: 7671876.
28. McCarthy DA, Dale MM. The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med*. 1988 Dec;6(6):333-63. PubMed PMID: 3068772.
29. Tozzi-Ciancarelli MG, Penco M, Di Massimo C. Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol*. 2002 Jan;86(3):266-72. PubMed PMID: 11990737.
30. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;28(3):s11-6. PubMed PMID: 18174453.
31. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, et al. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Oct;99(4):1434-41. PubMed PMID: 15976356.
32. Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*. 2001;7:90-107. PubMed PMID: 11579750.
33. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med*. 2008 Sep;5(3):218-28. PubMed PMID: 18727988.
34. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009;8:1. PubMed PMID: 19144121. Pubmed Central PMCID: 2642810.
35. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, Young IS, Jackson SK, Davies B, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998 May;77(6):498-502. PubMed PMID: 9650733.
36. Sjodin B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*. 1990 Oct;10(4):236-54. PubMed PMID: 2247725.
37. Aguilo A, Tauler P, Gimeno I, Fuentespina E, Pons A. Changes in erythrocyte antioxidant enzymes during prolonged submaximal exercise. *Biofactors*. 2000;11(1-2):27-30. PubMed PMID: 10705953.

38. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95. PubMed PMID: 11773609.
39. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):14S-22S. PubMed PMID: 1928205.
40. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005 May;135(5):969-72. PubMed PMID: 15867266.
41. Volvaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.* 2005;35(12):1045-62. PubMed PMID: 16336008.
42. Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, et al. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation.* 2003 Aug 5;108(5):530-5. PubMed PMID: 12874192.
43. Goto C, Nishioka K, Umemura T, Jitsuiki D, Sakagutchi A, Kawamura M, et al. Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *Am J Hypertens.* 2007 Aug;20(8):825-30. PubMed PMID: 17679027.
44. Knez WL, Jenkins DG, Coombes JS. Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Feb;39(2):283-8. PubMed PMID: 17277592.
45. Bloomer RJ, Davis PG, Consitt LA, Wideman L. Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *Int J Sports Med.* 2007 Jan;28(1):21-5. PubMed PMID: 17024638.
46. Gwozdziński K, Pieniązek A, Brzeszczynska J, Tabaczar S, Jegier A. Alterations in red blood cells and plasma properties after acute single bout of exercise. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:168376. PubMed PMID: 24453803. Pubmed Central PMCID: 3881673.
47. Jackson MJ. Exercise and oxygen radical production by muscle. In: Sen CKPLH, O., editor. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise.* Elsevier Science ed. Amsterdam 2000. p. 57-68.
48. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal

- muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jul;27(1-2):69-74. PubMed PMID: 10443921.
49. Li JX, Tong CW, Xu DQ, Chan KM. Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1999 Jul;80(2):113-7. PubMed PMID: 10408321.
50. Berzosa C, Gomez-Trullen EM, Piedrafita E, Cebrian I, Martinez-Ballarín E, Miana-Mena FJ, et al. Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. *European Journal of Applied Physiology*. 2011 Jun;111(6):1127-33. PubMed PMID: WOS:000290539100024. English.
51. Tsuda K, Yoshikawa A, Kimura K, Nishio I. Effects of mild aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003 May-Jun;30(5-6):382-6. PubMed PMID: 12859430.
52. Shiraki K, Yamada T, Yoshimura H. Relation of protein nutrition to the reduction of red blood cells induced by physical training. *Jpn J Physiol*. 1977;27(4):413-21. PubMed PMID: 599737.
53. Kamada T, Tokuda S, Aozaki S, Otsuji S. Higher levels of erythrocyte membrane fluidity in sprinters and long-distance runners. *Journal of applied physiology*. 1993 Jan;74(1):354-8. PubMed PMID: 8444714.
54. Smith JA. Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med*. 1995 Jan;19(1):9-31. PubMed PMID: 7740249.
55. Jain NC. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. *Cornell Vet*. 1973 Jul;63(3):411-23. PubMed PMID: 4782558.
56. Bishop C. In the red blood cell. Press A, editor. New York 1964.
57. Peter Klinken S. Red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Dec;34(12):1513-8. PubMed PMID: 12379271.
58. Santos-Silva A, Rebelo MI, Castro EMB, Belo L, Guerra A, Rego C, et al. Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clinica Chimica Acta*. 2001 Apr;306(1-2):119-26. PubMed PMID: WOS:000168137600014. English.

59. Balaban EP. Sports anemia. *Clin Sports Med.* 1992 Apr;11(2):313-25. PubMed PMID: 1591788.
60. Robinson Y, Cristancho E, Boning D. Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Mar;38(3):480-3. PubMed PMID: 16540835.
61. Spodaryk K. Iron metabolism in boys involved in intensive physical training. *Physiol Behav.* 2002 Feb 1-15;75(1-2):201-6. PubMed PMID: 11890969.
62. Cooper RA. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct.* 1978;8(4):413-30. PubMed PMID: 723275.
63. Koter M, Franiak I, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jeziarska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;36(2):205-15. PubMed PMID: 14643886.
64. de Freitas MV, de Oliveira MR, dos Santos DF, de Cassia Mascarenhas Netto R, Fenelon SB, Penha-Silva N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J Membr Biol.* 2010 Feb;233(1-3):127-34. PubMed PMID: 20146058.