

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA
NORMOBÁRICA INTERMITENTE EM CAVALOS
NÃO TREINADOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eduardo Almeida da Silveira

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA
INTERMITENTE EM CAVALOS NÃO TREINADOS**

por

Eduardo Almeida da Silveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Profa. Dra. Karin Erica Brass

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA
INTERMITENTE EM CAVALOS NÃO TREINADOS**

elaborada por
Eduardo Almeida da Silveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Karin Erica Brass, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Luiz Osório Cruz Portela, Dr. (UFSM)

Adriano Bonfim Carregaro, Dr. (UFSM)

Santa Maria, maio de 2009

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Tadeu Rigon da Silveira e Eunice Almeida da Silveira, pelo apoio incondicional, financeiro, afetivo durante toda a minha vida. Obrigado pela confiança plena em meu potencial e por compartilharem e apoiarem meus sonhos. Obrigado por serem para mim um exemplo de dignidade e honestidade.

À minha irmã Luiza, meu cunhado Gilson e meus sobrinhos Iuri e Enzo por serem família mesmo à distância.

À minha namorada Kalyne Bertolin, pelo amor e companheirismo. Agradeço pela abdicação de compromissos, para estar ao meu lado durante os experimentos no final de semana. Pelo auxílio na realização desta dissertação. Pelo incentivo e cobranças, quando eu me acomodava. Obrigado por me amar e me deixar amar-la.

À minha orientadora Karin Erica Brass, pelo apoio desde o tempo de graduação. Obrigado pela confiança que depositaste em mim quando entrei para a Clínica de Equinos e para o mestrado. Espero não tê-la decepcionado.

Ao meu co-orientador Flávio De La Corte, pelo grande aprendizado proporcionado durante o tempo de Clínica de Equinos e durante as viagens pelo Estado. Agradeço pela oportunidade de fazer parte da “Equipe”.

Ao meu co-orientador Luís Osório Cruz Portela, pelo fornecimento dos equipamentos geradores de hipóxia e pelos conselhos úteis na hora da discussão.

Ao amigo Ricardo Pozzobon, um agradecimento especial pelo auxílio durante todo o período de “Clínica”, mas principalmente, pelo auxílio com a “Tal da estatística” e com a elaboração da dissertação.

A Rafael Figuera, pela avaliação das punções de medula e pela “chamada de atenção” que ajudou bastante durante a discussão do experimento.

À Brigada Militar, na figura do Médico Veterinário Carlos Flávio Krebs (Lavito), pelo fornecimento de parte dos animais utilizados experimentalmente.

Ao Laboratório Pasin e a todas as funcionárias pela gentileza e dedicação no atendimento e durante a realização dos exames hematológicos.

Ao LAC/HUSM, pela realização dos exames gasométricos.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Diego De Gasperi, Diego Silva, Henrique Abreu, Marcos “Kbça” e estagiários, pelo apoio durante os experimentos e por me “aturarem” no período de mestrado.

Aos amigos Henrique Loef, Luciano Melo e Roberto Vielmo, pela amizade.

Aos animais pela colaboração e paciência.

A Universidade Federal de Santa Maria por toda a minha formação profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA INTERMITENTE EM CAVALOS NÃO TREINADOS

AUTOR: EDUARDO ALMEIDA DA SILVEIRA

ORIENTADORA: KARIN ERICA BRASS

Santa Maria, 28 de maio de 2009.

Habitantes de regiões com altitude elevada apresentam adaptações fisiológicas, morfológicas e funcionais altamente compensatórias em resposta ao estímulo criado pela hipóxia. Seres humanos vêm sendo submetidos a tratamentos de hipóxia intermitente (IHT) na busca por melhor desempenho esportivo e como tratamento de doenças crônicas. Os benefícios do IHT têm sido atribuídos a alterações hematológicas, musculares, mitocondriais e no volume plasmático. Um modelo experimental de simulação de altitude foi usado em cavalos para avaliar as alterações de parâmetros clínicos, hematológicos e gasométricos frente à hipóxia intermitente. Sete animais foram submetidos a 30 sessões de uma hora de hipóxia durante 16 dias (D1-D16). A frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) foi aferida em todas as sessões, nos tempos T0 (normóxia) e após 15, 30, 45 e 60 minutos de hipóxia. Amostras de sangue para hemograma foram obtidas no D0 (normóxia), D8 (12% de O₂) e D16 (12% de O₂). Os gases sanguíneos foram avaliados em T0 e aos 30 e 60 minutos de hipóxia no D1 (17% de O₂), D6 (13% de O₂), D11 (12% de O₂) e D16 (12% de O₂). Punções da medula óssea foram realizadas para avaliação da eritropoiese no D0, D8, D16, D23 e D30 (normóxia pós-experimento). Os cavalos não treinados toleraram bem a hipóxia a 17% de O₂. A FC foi menor aos 14% de O₂ que aos 17% de O₂ (0, 15, 45 e 60 minutos de hipóxia) (p<0,001). A PaO₂ e a SaO₂ aos 30 (P<0,05 e P<0,01) e 60 minutos (P<0,01 e P<0,001) diminuiu entre 17% e 12% de O₂. A PaCO₂ aumentou em T0 (p<0,05) entre 17% e 13% de O₂ e entre 17% e 12% de O₂. A relação de células mielóides:eritróides diminuiu entre o D1 e o D23, e a FR e parâmetros hematológicos não variaram durante ou entre as sessões. Este modelo experimental de hipóxia intermitente pode ser utilizado e promove adaptações cárdio-circulatórias em cavalos.

Palavras-chave: hipóxia; cavalos; fisiologia do exercício; adaptação.

ABSTRACT

Masters Dissertation in Veterinary Medicine
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

EXPERIMENTAL MODEL OF NORMOBARIC INTERMITTENT HYPOXIA IN UNTRAINED HORSES

AUTHOR: EDUARDO ALMEIDA DA SILVEIRA

ADVISER: KARIN ERICA BRASS

Santa Maria, May 28, 2009.

People living at high altitudes present compensatory adjustments to the hypoxic stimulation, such as physiological, morphological and functional adaptations. Humans have been submitted to intermittent hypoxic training (IHT) to achieve better athletic performance and to treat chronic diseases. The benefits related to IHT have been attributed to hematological, muscular, mitochondrial and plasmatic changes. An experimental model of altitude simulation was used on horses to assess the response of clinical, hematological and blood gas parameters to intermittent hypoxia. Seven horses were submitted to 30 one hour long hypoxia treatment sessions during 16 days (D1-D16). Heart (HR) and respiratory (RR) rates were measured on all sessions at time T0 (normoxia) and after 15, 30, 45 and 60 minutes of hypoxia. Blood samples for hematological evaluation were obtained on D0 (normoxia), D8 (O₂ 12%), D16 (O₂ 12%), while animals were in normoxia. Arterial blood gases were measured at T0 and after 30 and 60 minutes of hypoxia on D1 (O₂ 17%), D6 (O₂ 13%), D11 (O₂ 12%) and D16 (O₂ 12%). Bone marrow aspiration was performed to evaluate erythropoiesis on D0, D8, D16, D23 (post-trial normoxia) and D30 (post-trial normoxia). Untrained horses tolerated hypoxia at 17% O₂. HR was lower at 14% O₂ compared to 17% O₂ (0, 15, 45 and 60 minutes) (p<0.001). PaO₂ and SaO₂ at 30 (P<0.05 and P<0.01) and 60 minutes (P<0.01 and P<0.001) decreased between 17% and 12% O₂. PaCO₂ increased at T0 (p<0.05) between 17% and 13% O₂ and 17% and 12% O₂. Myeloid:erythroid ratio decreased between D1 and D23, and RR and hematology values did not change during or along sessions. This experimental model successfully promoted cardio-circulatory adaptation in horses to hypoxia.

Key-words: hypoxia; horses; exercise physiology; adaptation.

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 - Distribution of [O ₂], sample collection days and number of daily sessions during the experiment.....	36
---	----

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 - Cavalo submetido à hipóxia usando a máscara conectada à bolsa de Douglas.....	13
--	----

Capítulo 1

FIGURE 1 - Heart and respiratory rates (mean \pm SE) of 7 adult non-exercised horses submitted to 1-hour IHT sessions at 17%, 14%, 13% and 12% O ₂	37
---	----

FIGURE 2 – PCV, RBC and [Hb] (mean \pm SE) of 7 adult non-exercised horses submitted to 1- hour long hypoxia before and after 15 and 30 IHT sessions.....	38
---	----

FIGURE 3 – Myeloid:erythroid ratio (mean \pm SE) of bone marrow aspirates of 4 adult non-exercised horses before (0, normoxia [N]), on days 8 and 16 of IHT (12% O ₂) and 7 (23, N) and 14 (30, N) days after IHT.....	39
--	----

FIGURE 4 - PO ₂ , PCO ₂ and SO ₂ (mean \pm SE) of 7 adult non-exercised horses submitted to 60 minute IHT at 17%, 13% and 12% O ₂	40
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Produção da hipóxia	12
2.2 Alterações hematológicas	13
2.3 Alterações nos gases sanguíneos.....	15
2.4 Alterações cárdio-respiratórias	17
2.5 Alterações musculares	17
2.6 Desempenho atlético	18
3 CAPÍTULO 1	20
4 CONCLUSÕES.....	41
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

INTRODUÇÃO

Habitantes de regiões com altitude elevada apresentam modificações no seu sistema endócrino, devido ao estímulo causado pela hipóxia nos neurotransmissores cerebrais, que resultam na adaptação fisiológica ao meio hipóxico em que vivem (GONZALES, 2001). Frente ao estímulo agudo de hipóxia, o organismo responde tentando suprir a falta de oxigênio (O₂) tecidual através de aumento na ventilação e subsequente vaso-constricção pulmonar. Desta forma, ocorre um ajuste temporário da perfusão de O₂ nos pulmões e conseqüentemente aumento da oxigenação arterial (TOWNSEND et al., 2002). Com a persistência da hipóxia tecidual, sensores vasculares de O₂ ativam a expressão do fator de crescimento endotelial que inicia a angiogênese, principalmente no coração e provavelmente no cérebro (HOCHACHKA et al., 1998). Os sensores de O₂ nos rins e no fígado, por sua vez, estimulam a expressão da eritropoietina (EPO), dando início à reorganização metabólica. O aumento da EPO estimula a produção de reticulócitos e hemoglobina (Hb) elevando o hematócrito (Ht) (VOGT et al., 2001; BASSET et al. 2006).

Em eqüinos mantidos em altitudes elevadas ocorre um aumento no hematócrito e na concentração de Hb, que se mantém elevados após o retorno a baixa altitude. Outras alterações fisiológicas, como o aumento da capilaridade muscular e da capacidade metabólica da musculatura esquelética, também são adaptações a ambientes de hipóxia (WICKLER; ANDERSON, 2000).

A policitemia causada pela hipóxia ambiental crônica, pode se tornar um problema quando o indivíduo retorna para altitudes inferiores, por causar neocitólise. No retorno à normóxia ocorre supressão da EPO e estímulo à hemólise de hemácias jovens. Desta forma, observa-se uma diminuição de 10% nas hemácias totais na primeira semana em condições de normóxia, apesar de haver liberação de reticulócitos da medula por mais sete dias, em humanos (RICE; ALFREY, 2005). A exposição crônica à hipóxia ainda causa sintomas adversos como náuseas, cefaléia, anorexia, sonolência e deficiências na transcrição e síntese protéica em humanos (HOPPELER et al., 2003). Por estes motivos, o treinamento em hipóxia pelo método “morar alto, treinar baixo” (live high, train low) tem sido mais utilizado. O método de Tratamento Intermitente em Hipóxia (IHT) tem sido usado em atletas de nível olímpico por oferecer estímulo suficiente para melhorar o desempenho aeróbico e anaeróbico do indivíduo, sem que haja sinais clínicos de intolerância à altitude (BASSET et al., 2006).

O IHT vem sendo descrito há mais de 20 anos. Curtos períodos de exposição à hipóxia têm sido muito utilizados como alternativa para melhorar o desempenho atlético e tratar várias doenças. A utilização simultânea da hipóxia com o treinamento convencional melhora o aproveitamento tecidual de O₂ em mamíferos (HAHN; GORE, 2001). Assim como na exposição crônica à hipóxia, na hipóxia intermitente (HI) ocorre aumento progressivo da ventilação e adaptações fisiológicas que aumentam o aporte e a eficácia no consumo de O₂ tecidual (BURTSCHER et al., 2009). As curtas exposições à hipóxia estimulam os mecanismos de defesa do organismo e promovem inúmeras respostas fisiológicas benéficas a seu funcionamento (HAHN; GORE, 2001).

Em atletas humanos, o IHT aumenta o desempenho em competições em altitude e, eventualmente, também ao nível do mar. Na prática, atletas podem treinar em condições de hipóxia induzida usando um aparelho portátil de diluição de O₂, em altitude elevada ou em câmara despressurizada apenas durante o exercício (HOPPELER et al., 2003), com a vantagem de não perder tempo com viagens entre locais de diferentes altitudes (RICHALET; GORE, 2008). A técnica vem sendo utilizada no esporte, aviação, treinamento militar, bem como na prevenção, tratamento e reabilitação de doenças degenerativas (HAHN; GORE, 2001).

Há, entretanto, algumas diferenças entre a fisiologia respiratória humana e equina motivo pelo qual o ajuste dos protocolos de treinamento é essencial. Testes independentes sugerem que, assim como em humanos, os cavalos também apresentem efeitos benéficos com o IHT (KOLCHINSKAYA et al., 1999).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da hipóxia normobárica intermitente sobre parâmetros clínicos, hematológicos e de gases sanguíneos em cavalos não atletas, visando sua futura aplicação em medicina esportiva equina.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A hipóxia crônica promove adaptações cerebrais e cardíacas em moradores de altitudes elevadas. O cérebro de Quéchuas (habitantes da cordilheira dos Andes) metaboliza menos glicose que o de moradores de baixas altitudes, indicando manutenção da função cerebral com baixa demanda energética e de O₂. Já o coração dos Quéchuas utiliza mais glicose que o de moradores de baixas altitudes. Esta maior utilização de glicose como combustível de oxidação sugere maior eficiência na produção de energia e no consumo de O₂, pois a oxidação de ácidos graxos utiliza mais O₂ que a oxidação de glicose (SOMERO; SUAREZ, 2005).

Exposição à hipóxia de intensidade moderada promove adaptações teciduais, morfológicas e funcionais altamente compensatórias (GONCHAR; ROZOVA, 2007) como aumento na produção de EPO, eventual aumento no Ht, fortalecimento do sistema imunológico e estimulação do sistema simpático-adrenal. Também ocorrem adaptações cardiovasculares como vasodilatação, aumento na densidade de capilares sanguíneos, menor resistência periférica, diminuição da pressão arterial média e da frequência cardíaca (FC) e respiratória, maior facilidade na expansão pulmonar, melhor resposta ventilatória e aumento da capacidade pulmonar (HAHN; GORE, 2001).

Períodos de 30 minutos a duas horas de hipóxia são atualmente utilizados em atletas para estimular, no organismo destes, respostas hipóxia-dependentes como aumento na EPO circulante, no número de hemácias totais e adaptação da musculatura esquelética (HOPPELER et al., 2003). Um aumento na contagem de hemácias totais, concentração de Hb, Ht e EPO foi observado após a exposição à hipóxia normobárica em humanos (HOCHACHKA et al., 1998; BASSET et al., 2006). O aumento na concentração de Hb gera um aumento na disponibilidade de O₂ circulante e melhora o desempenho durante exercícios (VOGT et al., 2001). Após o exercício, o nível de O₂ arterial diminui quando o treinamento é realizado em condições de normóxia e se mantém quando é realizado em condições de hipóxia (BAILEY et al., 2001).

Humanos submetidos a treinamento em hipóxia, independente da intensidade do exercício, apresentam efeitos moleculares específicos em sua musculatura esquelética quando comparados a indivíduos treinados em normóxia. O treinamento em hipóxia normobárica induzida aumenta a densidade mitocondrial e capilar entre as fibras musculares (VOGT et al.,

2001). Ainda não se sabe exatamente qual a relação existente entre a disponibilidade de O₂ ambiental e a fosforilação mitocondrial oxidativa na musculatura esquelética. Acredita-se que a capacidade oxidativa dos músculos aumente para compensar a deficiência de O₂ na atmosfera (HOPPELER et al., 2003). O número de mitocôndrias totais aumenta com o treinamento, independente de alteração na concentração de O₂ ambiental. Porém, o número de mitocôndrias subsarcolemais, ou seja, próximas a capilares, aumenta apenas em indivíduos em hipóxia, independente do tipo de exercício (HOPPELER et al., 2003).

2.1 Produção da hipóxia

O IHT se baseia na inalação de ar com baixa concentração de O₂ em condições normais de pressão. Desenvolvido inicialmente por cientistas russos, este método vem sendo utilizado com êxito em treinamentos esportivos e no tratamento de doenças degenerativas (HAHN; GORE, 2001).

Existem diversos equipamentos de produção de hipóxia. O sistema de separação de ar mais comumente usado emprega membranas semipermeáveis (BIOMEDTECH, 2006). Sob pressão, gases tendem a ser atraídos por superfícies sólidas diversas. Dessa forma, quando o ar sob pressão passa por um tubo contendo uma câmara adsorvente de nitrogênio, este fica armazenado e o O₂ é liberado. Ao regular a velocidade de passagem do ar também se regula a pressão exercida por ele sobre as membranas. De acordo com a pressão empregada na passagem do ar, mais ou menos nitrogênio é retido e conseqüentemente diminui a concentração de O₂ (BIOMEDTECH, 2006).

O ar com baixa concentração de O₂ é disponibilizado através de uma máscara vedada que possui duas válvulas externas de fluxo único para liberação do gás expirado e dois tubos por onde o ar com baixa concentração de O₂ é fornecido. Através de um adaptador em “Y”, esses dois tubos são conectados a outro tubo de grande calibre que faz a ligação ao reservatório denominado bolsa de Douglas (Fig 1). Este reservatório é ligado à unidade de controle que consiste numa torre eletrônica que regula a velocidade de passagem do ar, regulando a concentração de O₂ fornecido. Através deste sistema se consegue ar com até 9% de O₂, o que seria equivalente ao disponível em uma altitude de 6500 metros (BIOMEDTECH, 2006).



FIGURA 1 – Cavalo submetido à hipóxia usando a máscara conectada à bolsa de Douglas.

2.2 Alterações hematológicas

Parâmetros hematológicos normais são mantidos pelo equilíbrio entre os processos de produção e destruição de hemácias. Indivíduos que moram em altitudes elevadas apresentam policitemia acentuada, atribuída a uma maior atividade eritropoiética do organismo. A hiperatividade eritropoiética provocada pela hipóxia em altitude elevada afeta tanto pessoas aclimatadas como pessoas recém expostas (MERINO, 1950).

Em atletas humanos pode ocorrer um aumento na massa de eritrócitos, devido a exercícios físicos sem a utilização de hipóxia. Tanto hipóxia como exercício forçado podem estimular a produção e liberação de EPO devido à diminuição da saturação arterial de oxigênio (SaO_2). O aumento nos índices de EPO está relacionado com a diminuição da pressão de oxigênio (PaO_2) do sangue arterial. Em condições de hipóxia, a pressão alveolar de O_2 (PAO_2) e conseqüentemente a SaO_2 estão diminuídas, estimulando a eritropoiese (BAILEY, 2004).

KNAUPP et al. (1992) afirmam que seres humanos expostos a ar contendo 10,5% de O₂ por 120 minutos, de forma contínua, ou 240 minutos, de forma intermitente, apresentam aumento de 50% nos níveis de EPO. STRAY-GUNDERSEN e LEVINE (2008) afirmam que são necessárias 36 horas de exposição à altitude de 2500 metros para se obter aumento nas concentrações plasmáticas de EPO.

O aumento ou diminuição do volume sanguíneo total é devido exclusivamente a modificações na massa eritrocitária. Estudos citológicos na medula óssea de seres humanos expostos à hipóxia ou morando permanentemente em altitudes elevadas apresentam hiperplasia medular e aumento na absorção de ferro (REYNAFARJE et al., 1959). Através de exame direto da medula óssea, GORE e HOPKINS (2005) observaram um aumento no número de células eritróides em indivíduos expostos a altitude elevada.

O aumento na absorção de ferro ocorre em indivíduos que vivem no nível do mar e são submetidos à ambiente hipóxico em altitude elevada (GORE; HOPKINS, 2005). Após 48 horas de exposição ao meio hipóxico, a absorção de ferro pelo organismo destes pode ser três vezes maior que a observada em habitantes do nível do mar e de altitudes elevadas, que não são submetidos à alteração de ambiente (REYNAFARJE et al., 1959). Atletas que apresentam baixos níveis séricos de ferritina não apresentam aumento na massa eritrocitária quando expostos à altitude elevada (STRAY-GUNDERSEN; LEVINE, 2008).

Um aumento na quantidade de eritrócitos e Hb são observados após três semanas de HI (BURTSCHER et al., 2004), um mês a 1200 metros (KOLCHINSKAYA et al., 1999) e a 2500 metros de altitude (GORE; HOPKINS, 2005). O mesmo ocorre em indivíduos que moram ao nível do mar e treinam em altitude elevada e em indivíduos que moram e treinam em altitudes elevadas (STRAY-GUNDERSEN; LEVINE, 2008; RICHALET; GORE, 2008).

As alterações hematológicas dependem da exposição à hipóxia (RICHALET; GORE, 2008). A exposição diária por 16 horas, a altitude elevada, durante um período de quatro semanas produz um aumento de 5% na massa de eritrócitos. Dez horas foram insuficientes para produzir este aumento (CHAPMAN; LEVINE, 2007). Em outro estudo, atletas de elite apresentaram aumento nos parâmetros hematológicos com exposição de 24 horas diárias por quatro semanas (GORE; HOPKINS, 2005).

Para GORE e HOPKINS (2005), exposições de curta duração a altitudes extremas não são suficientes para aumentar a massa de eritrócitos. O IHT aumenta os níveis séricos de EPO, mas não altera os parâmetros hematológicos ou de desempenho (CHAPMAN; LEVINE, 2007). Já BURTSCHER et al. (2004), observaram aumento no número de eritrócitos e na concentração de Hb ao usar um protocolo de HI.

O aumento na concentração de Hb resulta em aumento proporcional na quantidade de O₂ transportado e distribuído aos músculos em exercício (BAILEY, 2004). GORE et al. (2007), porém, observaram melhora no desempenho de atletas submetidos à hipóxia, sem que houvesse elevação nos parâmetros hematológicos.

Um aumento nos parâmetros hematológicos é mais evidente em atletas que apresentam índices baixos de Ht e Hb. A elevação no Ht sem aumento equivalente do volume plasmático aumenta a viscosidade sanguínea, dificultando a oxigenação tecidual e aumentando o consumo de energia devido à maior resistência vascular. Por este motivo, atletas de enduro apresentam níveis totais de Hb 50% maiores que não atletas, mas com concentração de Hb semelhante devido ao aumento no volume plasmático (BAILEY, 2004).

O aumento no número de eritrócitos circulantes em resposta à exposição à altitude é bem documentado em seres humanos, mas em cavalos os achados são contraditórios. Esta contradição ocorre, principalmente, devido à impossibilidade de controlar a contração esplênica. Cavalos podem armazenar mais de 50 % do seu volume total de eritrócitos no baço, e liberá-lo mediante estresse (WICKLER; ANDERSON, 2000).

2.3 Alterações nos gases sanguíneos

A análise de gases no sangue arterial é um exame invasivo que mensura a concentração de O₂, a ventilação e o equilíbrio ácido-base do sangue arterial. Alterações na ventilação e na pressão ambiental de O₂ (PEO₂) influenciam diretamente a análise de gases sanguíneos de um indivíduo.

Em altitude elevada, a PEO₂ está diminuída, podendo causar dificuldade respiratória ou prejudicar o fornecimento de O₂ para os músculos durante exercícios forçados (WEIBEL, 1999). Durante exercícios intensos, a diferença entre a PAO₂ e a PaO₂ aumenta e isto se reflete no desequilíbrio entre ventilação e perfusão e na dificuldade de difusão do O₂ (NIELSEN et al., 1998).

O tempo gasto na troca gasosa entre alvéolo e capilar pulmonar é de extrema importância para o transporte de O₂. Se a troca for mais lenta que a passagem do eritrócito pelo capilar, pequena quantidade de O₂ é dissolvida no plasma. Quando isto acontece durante baixa PAO₂ ocorre vasoconstrição da circulação pulmonar para compensar a pequena diferença na taxa ventilação/perfusão (NIELSEN et al., 1998).

Em altitude elevada a PAO_2 pode estar reduzida pela metade (MOU et al., 1995), dificultando a difusão de O_2 e reduzindo, conseqüentemente, a PaO_2 . Quando isto ocorre a resposta ventilatória aumenta para compensar esta deficiência na troca gasosa e manter ou elevar a SaO_2 (KATAYAMA et al., 2001; BURTSCHER, 2008). A exposição aguda à hipóxia e a baixa PAO_2 de altitudes elevadas causa diminuição da SaO_2 e da oxigenação muscular e aumento na ventilação e na FC como resposta compensatória imediata (GORE et al., 2008). Indivíduos com grande capacidade anaeróbica tendem a apresentar SaO_2 menor (NIELSEN et al., 1998). Em se tratando de animais, espécies atléticas (cães, cavalos) são menos tolerantes ao ar hipóxico que espécies mais sedentárias. Cavalos Puro Sangue de Corrida não atingem o equilíbrio completo de oxigenação sanguínea durante uma corrida de alta intensidade, resultando em PaO_2 diminuída, mesmo em condições de normóxia. Neste caso, os pulmões podem ser um fator limitante para a absorção do volume máximo de oxigênio (VO_{2max}) (WEIBEL, 1999).

Três semanas de HI são suficientes para causar diminuição da FC, pressão sistólica, lactato sanguíneo e exaustão e ainda aumentar a SaO_2 e o conteúdo arterial de O_2 (BURTSCHER et al., 2004). KATAYAMA et al. (2001) observaram aumento na ventilação e SaO_2 com apenas uma semana de HI. Essa resposta ventilatória e dos gases sanguíneos se manteve durante exposições subseqüentes à hipóxia, em repouso ou durante exercício submáximo, provavelmente devido ao aumento da sensibilidade de quimiorreceptores periféricos (BURTSCHER, 2008) frente à baixa PAO_2 (KATAYAMA et al., 2001).

O fluxo sanguíneo e o débito cardíaco diminuem quando o O_2 arterial supre o consumo de O_2 devido à estreita relação existente entre a oxigenação arterial sistêmica e o consumo de O_2 . Portanto, a diminuição da FC após exposição à HI, pode ser explicada pelo aumento do conteúdo arterial de O_2 (BURTSCHER et al., 2004). A exposição à HI promove um pequeno, mas significativo aumento na SaO_2 em repouso e em exercícios submáximos mesmo que não haja aumento da ventilação por minuto. Isto se deve ao aumento da capacidade de difusão pulmonar do monóxido de carbono (BURTSCHER et al., 2009) que não produz aumento no desempenho aeróbico, mas aumenta a tolerância à hipóxia (WEIBEL, 1999).

2.4 Alterações cárdio-respiratórias

Hiper-ventilação e estímulo da atividade simpática, com aumento na FC e débito cardíaco melhoram a distribuição de O_2 para os tecidos em resposta a hipóxia tecidual (BURTCHER et al., 2008). Após leve aumento nos primeiros dias de exposição à hipóxia, a FC de eqüinos diminui em seis a oito batimentos por minuto após 30 dias de hipóxia (KOLCHINSKAYA et al., 1999).

Em eqüinos a FC, FR, débito cardíaco e ventilação pulmonar aumentam gradativamente na medida em que diminuiu a concentração de O_2 em HI (KOLCHINSKAYA et al., 1999). A adaptação de cavalos à PEO_2 também é acompanhada por alterações na contratilidade e no desempenho do miocárdio. Além disso, ocorre alteração na duração da atividade elétrica sistólica e diastólica da contração (KOLCHINSKAYA et al., 1999). Dificuldade ventilatória em altitudes elevadas sobrecarrega o coração e as mitocôndrias de células musculares, durante exercícios de resistência, na tentativa de compensar a diminuição da oxigenação tecidual (WEIBEL, 1999).

A utilização da HI na adaptação respiratória a altitudes elevadas foi demonstrada por BURTSCHER et al. (2004), quando três indivíduos submetidos à hipóxia e dois indivíduos controle interromperam exercícios pré-teste por dispnéia. Após as seções de HI, apenas os dois indivíduos controle voltaram a apresentar sinais de dispnéia durante exercício.

Curtos períodos de IHT são suficientes para desenvolver sensibilidade quimioreflexiva, aumento na eritropoiese e redução potencial dos efeitos indesejáveis da hipóxia sobre o sistema nervoso autônomo. Eles, porém, não alteram os parâmetros respiratórios (BERNARDI et al., 2001). Em seres humanos, a diminuição da pressão arterial média também foi observada após HI. A diminuição da FC e da pressão sistólica em exercícios submáximos indica diminuição no consumo de O_2 pelo miocárdio (BURTSCHER et al., 2004).

2.5 Alterações musculares

A exposição prolongada a altitudes elevadas causa diminuição do volume muscular, do conteúdo mitocondrial e da capacidade oxidativa das fibras musculares. A densidade

capilar do tecido muscular aumenta, não porque haja formação de novos vasos, mas devido à redução na área transversal da fibra muscular (DESPLANCHES et al., 1996; BERNARDI et al., 2001; HOPPELER; VOGT, 2001; HOPPELER et al., 2003). A densidade capilar aumenta somente após exercícios de alta intensidade em hipóxia (VOGT et al., 2001).

O suprimento de O₂ para as células musculares é limitado pela diminuição da difusão pulmonar (WEIBEL, 1999). Treinamento intenso em hipóxia no nível do mar provoca alterações moleculares e estruturais que compensam a baixa disponibilidade de O₂ provocada pela dificuldade de transporte e utilização deste no músculo em exercício (VOGT et al., 2001; HOPPELER et al., 2003). A melhora de desempenho ao nível do mar é atribuída ao aumento na capacidade de tamponamento muscular e maior economia de O₂, após várias modalidades de treinamento em altitude (STRAY-GUNDERSEN; LEVINE, 2008). A hipóxia induz, também, mecanismos que favorecem a utilização da glicose em células musculares (HOPPELER et al., 2003).

O consumo de O₂ pela mitocôndria não se altera e um aumento na demanda energética, induzido pelo treinamento, promove o aumento no número de mitocôndrias nos músculos exercitados, enquanto ocorre diminuição nos músculos não treinados (HOPPELER; WEIBEL, 2000). O aumento da atividade da enzima citrato-sintetase, durante treinamento em hipóxia, indica aumento na capacidade oxidativa e na densidade mitocondrial dos músculos (HOPPELER et al., 2003). A densidade total de mitocôndrias aumenta após treinamento em hipóxia. A densidade interfibrilar aumenta após treinamento de baixa intensidade em hipóxia e a fração mitocondrial subsarcolemal aumenta independente da intensidade de treinamento.

2.6 Desempenho atlético

Alterações no tempo de tolerância ao exercício, após IHT, estão positivamente relacionadas a alterações na massa total de Hb, no tempo de limiar anaeróbico e na capacidade de difusão pulmonar (BURTSCHER et al., 2009). O aumento na tolerância ao exercício está associado com maior distribuição de O₂ aos tecidos e maior resistência ao estresse da hipóxia (BURTSCHER et al., 2004). O aumento da massa eritrocitária, com conseqüente aumento no volume máximo de O₂ absorvido (VO₂) e a manutenção da velocidade e do fluxo de O₂, em treinamento de alta intensidade, também está associado à melhora de desempenho atlético (STRAY-GUNDERSEN; LEVINE, 2008).

O aumento no VO_{2max} , resultante de IHT, em provas de resistência pode ser decorrente de alterações cardiovasculares que aumentam o fluxo sanguíneo no músculo durante exercícios intensos e não de aumento de parâmetros hematológicos (GORE; HOPKINS, 2005). Da mesma forma, fatores como angiogênese, melhora no transporte e utilização de glicose, regulação do pH e maior eficiência muscular devido à menor produção de ácido láctico, podem estar relacionados com um melhor desempenho atlético (GORE et al., 2007).

O VO_{2max} aumenta devido ao aumento no volume sanguíneo, mas não se sabe se esta é a causa da melhora de desempenho. A mudança para um modo mais econômico de utilização de O_2 durante exercícios é uma adaptação à falta de O_2 tecidual e um sistema que envolve várias alterações intracelulares. Dessa forma, atletas submetidos à IHT utilizam menos O_2 para completar seu treinamento, quando comparados à mesma situação em normóxia (GORE; HOPKINS, 2005).

O treinamento ao nível do mar é fundamental para manutenção da oxigenação tecidual adequada e da velocidade máxima de treinamento, para que ocorra a melhora de desempenho. Assim, a combinação de morar em altitude elevada e treinar em baixa altitude pode melhorar o desempenho em competições de resistência, ao nível do mar (STRAY-GUNDERSEN; LEVINE, 2008). Cavalos trotadores, submetidos à HI, diminuiram seus tempos de conclusão das provas com FC máxima menor (KOLCHINSKAYA et al., 1999).

CAPÍTULO 1

EXPERIMENTAL MODEL OF NORMOBARIC INTERMITTENT HYPOXIA IN UNTRAINED HORSES

**Artigo a ser submetido para publicação na Canadian Journal of Veterinary Research
em junho de 2009**

Experimental model of normobaric intermittent hypoxia in untrained horses

Eduardo A. da Silveira, Karin E. Brass, Flávio D. De La Corte, Luiz O. C. Portela, Ricardo Pozzobon, Rafael Fighera, Diego De Gasperi, Henrique C. de Abreu

Department of Large Animal Clinics (Silveira, Brass, De La Corte, Pozzobon, De Gasperi, Abreu), Pathology Department (Fighera) and Team Sports Department (Portela), Federal University of Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900.

Address all correspondence to Dr. Karin Erica Brass; telephone: +55 (55) 3220-8036; fax: +55 (55) 3220-8036; e-mail: kbrass@terra.com.br

ABSTRACT

An experimental model of altitude simulation was used in seven adult healthy horses submitted to 30 (1-hour long) hypoxia sessions during 16 days (D1-D16) to assess the clinical, hematological and blood gas response to intermittent hypoxia. Heart (HR) and respiratory (RR) rates were measured in all sessions at normoxia (0), 15, 30, 45 and 60 minutes of hypoxia. Blood samples for hematological evaluation were obtained at D0 (normoxia), D8 (12% O₂) and D16 (12% O₂), while the animals were in normoxia. Arterial blood gases were measured at 0, 30 and 60 minutes on D1 (17% O₂), D6 (13% O₂), D11 (12% O₂) and D16 (12% O₂). Erythropoiesis was evaluated through bone marrow aspiration on D0, D8, D16, D23 and D30 (both post-trial normoxia). Untrained horses tolerated hypoxia at 17% O₂. HR was lower at 14% O₂ compared to 17% O₂ (0, 15, 45 and 60 minutes) (p<0.001). PaO₂ and SaO₂ at 30 (P<0.05 and P<0.01) and 60 minutes (P<0.01 and P<0.001) decreased between 17% and 12% O₂. PaCO₂ increased at T0 (p<0.05) between 17% and 13% O₂ and 17% and 12% O₂. Myeloid:erythroid ratio decreased between D1 and D23, and RR and

hematology values did not change during or along sessions. This experimental model successfully promoted cardio-circulatory adaptation in horses to hypoxia.

Key-words: hypoxia; horses; exercise physiology; adaptation.

INTRODUCTION

People living at high altitudes are exposed to chronic hypoxia, which results in physiologic adaptation to the environment they live (1). Under acute hypoxia the body increases ventilation with subsequent vasoconstriction, adjusting temporarily O₂ perfusion in the lungs and increasing arterial O₂ content (2). If tissue hypoxia persists, O₂ sensors stimulate erythropoietin (EPO) expression which increases reticulocyte production and hemoglobin concentration ([Hb]), elevating the packed cell volume (PCV) (3, 4). EPO suppression, at the return to normoxia, stimulates hemolysis in young red blood cells (RBC) (5). In man, chronic hypoxia causes nausea, headache, anorexia, somnolence and protein transcription and synthesis deficiencies (6). The method of “live high, train low” has been adapted by human athletes believing that it improves aerobic and anaerobic performance without clinical signs of altitude intolerance (4).

Normobaric hypoxia in humans increases RBC count, PCV, [Hb] and EPO concentration (3, 4). The higher [Hb] increases availability of circulating O₂ and improves exercise performance (7). Thirty minutes to 2 hours of hypoxia have been used in athletes to stimulate hypoxia dependant responses like increased circulating EPO and RBC, and skeletal muscle adaptations (6). After exercise, arterial O₂ is lower if training is performed at normoxia, and is maintained when performed at hypoxia (8).

Individuals that live at sea level and train under hypoxia experience muscle changes that compensate the low O₂ availability. Also there is an increase in mitochondrial density and oxidative capacity of the muscles over time (6).

In man hypoxia improves athletic performance, either by an increased RBC production or muscle adaptation. In horses, there are few studies about the effects of hypoxia. The aim of this study was to validate an experimental model of normobaric intermittent hypoxia treatment (IHT) and evaluate its effects on clinical, hematological, and blood gas parameters in untrained horses.

MATERIAL AND METHODS

Seven healthy adult untrained horses (5 mares and 2 geldings), 10±6 years of age, underwent 30 (1-hour) sessions of normobaric hypoxia during a 16 day period (Tab. 1). Hypoxia was produced by a compressor connected to a computerized module that regulates O₂ removal according to the altitude to be simulated (Biomedtech Australia Pty. Ltd. 17 Roberna Street Moorabbin, 3189, Victoria, Melbourne, Australia). The horses received low-O₂ air through a mask (Biomedtech Australia Pty. Ltd. 17 Roberna Street Moorabbin, 3189, Victoria, Melbourne, Australia) with 2 unidirectional valves to eliminate CO₂. After an adaptation period to the mask, the experiment started with an O₂ concentration ([O₂]) at 17% during the first 3 sessions (Days [D] 1 and 2), followed by a 1% decrease each day (2 sessions) until reaching 13% [O₂]. The next 4 hypoxia sessions were performed at 13% O₂ (D6 and D7) before reaching the lowest [O₂] used (12%) that was maintained for the next 17 sessions (D8 to D16). To eliminate the effect of the mask on the RR, data collection started 15 minutes after it was put on the horses (T0). T0 corresponded to normoxia and the beginning of the hypoxia session. From T0 on, data were collected every 15 minutes until completing 60

minutes of hypoxia. HR and RR were monitored at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes on all sessions.

On D0, D8 and D16, venous blood samples were collected from the jugular vein in EDTA tubes. RBC, PCV and [Hb] were evaluated using an automated cell counter (Diamond Diagnostics. USA 333 Fiske Street Holliston, MA 01746).

For blood gas analysis arterial blood samples were obtained from the external carotid artery at 0, 30 and 60 minutes on the first hypoxia session of D1 (17%), D6 (13%), D11 (12%) and D16 (12%). PaO₂ and PaCO₂, SaO₂ and pH were determined using a pH and blood gas analyzer (HOCHÉ Diagnostics. LaborSys: Rua da Várzea, 126, Porto Alegre, RS, Brazil) within 1.5 hours after collection.

Bone marrow was obtained only from 4 horses on D0 (normoxia), D8 (12%), D16 (12%), D23 and D30 (post experiment normoxia). Horses were sedated with 10% xylazine (Sedazine – Fort Dodge: Rua Luiz Fernando Rodrigues, 1701, Campinas, SP) (0.5 mg/kg). After local aseptic preparation and local anesthetic block with 2% lidocaine (Xylestesin - Cristalia: Av. Paoletti, 363, Itapira, SP) was made at the ventral midline of the sternum between the forelegs, a 16G, 20cm long spinal needle was inserted in the sternum until a bone marrow aspirate was obtained with a 5 ml syringe containing EDTA (9).

HR and RR data obtained at hypoxia sessions with the same [O₂] were submitted to analysis of variance of repetitive measures (RM-ANOVA). Statistic analysis of PCV, RBC and [Hb] was made by Student's t test whereas bone marrow cytology and blood gas data were analyzed by RM-ANOVA followed by Tuckey test, at a 5% significance level. This experiment was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil (# 20/2009).

RESULTS

No horse showed any signs of intolerance to the induced hypoxia during the experiment period (16 days). The mean HR at 17% O₂ was 44.5±0.4bpm and did not change during 60 minutes of hypoxia. A slight drop in HR was seen at 15% [O₂] (39.6±0.3bpm). However, at 14% O₂ HR reached the lowest values during 60 minutes hypoxia (37.8±0.5bpm) (p<0.01). At the lower [O₂] of 13% and 12% HR differed only at 0 (P<0.001) and 45 minutes (P<0.05) and at T0 (P<0.05), respectively. HR at that [O₂] were 37.4±1.6, 39.7±0.9 (13%, 0 and 45 minutes) and 39.4±2.1 (12%, 0 minutes) bpm. Interesting, at T0 the HR was lower in the presence of lower [O₂] (P<0.0327) (Fig. 1). Although the mean RR was lower at all time points no difference was observed between the different evaluations of each session.

PCV (33.9±1.1 x 30.2±1.5%; P=0.04) and RBC (6.8±0.2, 5.9±0.4 x10⁶/μl; P=0.007) differed after the first 15 IHT sessions (P= 0.04 and P=0.007). Thirty sessions of decreasing [O₂] to intensify hypoxia did not result in changes in the RBC count, PCV and [Hb] (P>0.05) (Fig. 2). The myeloid:erythroid ratio decreased between D0 and D23 (at normoxia) (1.2±0.05 and 0.8±0.06, respectively) (P<0.05)(Fig. 3).

PaO₂ at 17% [O₂] was 85.8±6.7 and 92.2±7.3 mmHg, at 13% O₂ 72.0±3.3 and 75.8±9.9 mmHg and at 12% O₂ 63.5±5.6 and 61.6±3.2 mmHg 30 and 60 minutes, respectively (P<0.05). SaO₂ at 17% O₂ was 95.3±1.4 and 96.4±0.8 %, at 13% O₂ 94.2±0.6 and 93.3±1.4 % and at 12% O₂ 89.5±1.9 and 89.9±1.5 % at 30 and 60 minutes. PaO₂ (P<0.05, P<0.01) and SaO₂ (P<0.01, P<0.001) changed significantly between 17% and 12% O₂ at 30 and 60 minutes of hypoxia. When blood gases on D1 (17%), D6 (13%), D11 (12%) and D16 (12%) are evaluated, PaO₂ decreased between 0 and 30 (P<0.001) and 0 and 60 (P<0.05) minutes on all days (Fig. 4). SaO₂ only decreased on D11 and D16 (P<0.001). On D1 PaO₂ is higher than on D11, at 60 minutes (P<0.01) and than on D16 at 30 (P<0.05) and 60 (P<0.01) minutes. The difference of PaCO₂ only was significant at T0 between 17% (39.8±1.3 mmHg)

and 13% O₂ (44.8±1.1 mmHg) and 17% and 12% O₂ (45.0±1.5 mmHg). No difference was observed between the sample collection times at the same day. pH also did not change during and among sessions.

DISCUSSION

Based on a pilot study, the [O₂] at 17% was chosen to avoid stress signs during IHT. According to DESPLANCHES et al. (10) human athletes show no complications at 12.7% [O₂]. According to a study with trotters, horses seem to be more susceptible to hypoxic environments than human athletes (11). This apparent higher susceptibility of horses may be associated to the use of the whole length of the pulmonary capillary to complete gas exchange when other species use only two thirds of this length (12). Also, there is less vasoconstriction of pulmonary capillaries in horses because in hypoxia the blood vessel muscle layer is thinner (13). So a decrease in environmental O₂ tension reduces pulmonary diffusion and also vasoconstriction more remarkably in horses than in other species (12).

During the first 7 IHT sessions (D1: 17% O₂ to D4: 15% O₂) HR decreased significantly, similar to human beings adapted to chronic hypoxia at 2700m altitude (14) and to athletes after 3 weeks of intermittent hypoxia (15). The drop in HR observed between D1 (17 % O₂) and D5 (14% O₂) and the increase in HR observed as [O₂] was lowered to 13% (D6) and further to 12% (D8) (Fig. 1), indicates a fast response to the challenge in horses as KOLCHINSKAYA et al. (11) reported a 48.6% HR increase and a 136.6% RR increase after exposing trotters to 12% O₂. The fact that there was no difference between the HR at D1 and D8 suggests that the [O₂] (12%) was too low as the lowest HR occurred at D5 (14% O₂). It is possible that horses need a longer adaptation at 14% and at 13% [O₂] before this concentration is further reduced to 12%.

The absence of variations in the hematologic parameters (Fig. 2) may be associated to different factors. The stimulation of erythropoiesis induced by hypoxia may be suppressed by longer periods of normoxia (16). This may explain the absence of RBC and [Hb] changes (17) during short time normobaric (18) or hypobaric hypoxia (19). It is possible that the time of hypoxia exposure was insufficient since horses were exposed 2 times a day to one hour of hypoxia. On the other side, RODRIGUEZ et al. (20) reported increased RBC count, [Hb] and EPO secretion after 90 minutes of hypobaric IHT in human beings. Human athletes with low serum ferritin do not show RBC increase even when exposed to high altitude (21). This, however, cannot be discarded as serum iron was not measured.

The unpredictable RBC release by splenic contraction and absence of young RBC (reticulocytes) release from the bone marrow to circulation in horses (22), make the evaluation of RBC production through the complete blood count (CBC) difficult. In man, the presence of blood reticulocytes in athletes after hypoxia treatment is an indication of increased RBC production (19, 23, 24). As the CBC is not reliable to evaluate RBC production, the best way to evaluate an increased blood volume in horses is by the Evan's blue dye method (25). This requires induction of splenic contraction through epinephrin administration and/or intense exercise making its routine use in veterinary practice difficult (24). Therefore, erythropoiesis is more commonly evaluated by bone marrow aspiration (27). A significant difference in the myeloid:erytroid cell ratio was observed between the samples obtained at D1 and at D23 in our study (Fig. 3). A decrease in that ratio would be expected in case of increased RBC production so that hypoxia seems to have stimulated erythropoiesis in our horses. D23 corresponds to 7 days after finishing hypoxia sessions. At that time no blood samples were taken anymore so that a possible effect on PCV, RBC and [Hb] could not be appreciated. It also suggests that more hypoxia sessions may be needed to observe a change in hematologic values.

Maintenance of SaO₂ and PaO₂ at 0 minutes (normoxia) with low HR is in accordance with BURTSCHER et al. (15), who observed that hypoxia improves tissue utilization of O₂ in human athletes. Thoroughbred horses, even in normoxia, do not complete blood-O₂ changes during high intensity races (12). Adaptation to low [O₂] by IHT could condition these horses to tolerate better the tissue hypoxia that occurs during intense exercise. When O₂ content in blood matches the one used by the body, cardiac output and HR decrease. So, the decrease in HR after IHT can be attributed to an increase in arterial O₂ content (15).

Tissue hypoxia causes periferic vasodilatation followed by a fall in arterial blood pressure. To compensate low arterial pressure, HR and contractility increase (13). A gradual reduction in the [O₂] at IHT allowed exposure of horses to 12% O₂, without showing common clinical signs present at tissue hypoxia. This may be attributable to a higher, compensatory, tissue oxygenation as a result of an increased RBC number (28), changes at the muscular or mitochondrial level (29, 30), or plasma volume (8).

The significant decrease of PaO₂ between 0 and 30 minutes and 0 and 60 minutes at all evaluations, and of SaO₂ at the same times on the last two evaluations occurred due to the fact that the horses were first evaluated at normoxia (T0) and at 30 and 60 minutes they were under hypoxia (Fig. 4). No difference was observed on PaO₂ and SaO₂ between 30 and 60 minutes, indicating that a drop can occur even before 30 minutes of hypoxia and is maintained through the end. Splenic contraction, mediated by the stress of approximately 30 minutes of hypoxia could explain this persistent level of PaO₂/SaO₂. The complete mobilization of the splenic RBC reserve can increase the PCV from 30-40% to 60-70% and circulating [Hb] from 150 to 220g/L (31) which can compensate circulating O₂ deficiency. If there is an increased number of RBC and [Hb] to bind to O₂ molecules at gas exchange in the lungs, SaO₂ should increase (13). As the venous blood samples were not collected during the hypoxia sessions, no PCV and [Hb] changes were observed. Acute hypoxia may have stimulated RBC release from

the spleen, but did not produce any response of HR and RR. It is possible that circulating O₂ decreases in association with periferic vasodilatation without occurring tissue hypoxia. Tissues would have to be sufficiently adapted to low [O₂] in order to avoid a local vascular reaction (13).

PaO₂ decreased during 12% hypoxia to less than 65-70 mmHg (equivalent to 2500-3000m). PaO₂ must reach these low values in order to stimulate erythropoiesis (32). Since they were exposed to 17 sessions of 12% O₂ this might explain the lack of RBC, PCV an Hb change. As environmental [O₂] is reduced, alveolar O₂ tension also decreases. Pulmonary O₂ diffusion is compromised and PaO₂ falls (13). When PaO₂ decreases, Hb cannot bind the same amount of O₂ and SaO₂ also decreases (33). This way, the significant reduction of PaO₂ and SaO₂ observed during the hypoxia sessions (especially at 12% O₂) is directly related to the decreasing [O₂] inspired.

PaCO₂ increase observed at T0 between the first hypoxia sessions (17%) compared to the other ones strongly indicates the adaptation of the horse's body to low oxygen tension. PaCO₂ increase usually is not observed as low blood O₂ tension stimulates lung ventilation and consequent CO₂ release (13). When O₂ consumption matches tissue oxygen tension, SaO₂ is maintained with less cardio-respiratory work. Then, individuals submitted to IHT reduce tissue O₂ consumption and subsequently ventilation (15). As ventilation and oxygenation decrease PaCO₂ increases as a result of higher tissue CO₂ release and less diffusion of this gas in the environment (34). Arterial and alveolar CO₂ tensions tend to be the same owing to the great pulmonary diffusion capacity of CO₂. PaCO₂ changes according to modifications in blood pH or pulmonary ventilation. When tissue O₂ tension decreases the body can show a ventilatory response, eliminating excessive CO₂ and reducing PaCO₂ (13).

Variation in the individual response to hypoxia is a limiting factor in research (28, 32) and may have influenced the results in this study as the number of evaluated animal was reduced.

CONCLUSION

The experimental model of normobaric IHT can be used in horses and induces physiological adaptations to hypoxia.

Hypoxia promotes cardio-circulatory adaptation in untrained horses characterized by maintenance of HR and RR during sessions and a decrease in HR between sessions. However, 30 hypoxia sessions did not induce PCV, RBC and [Hb] changes but induced a decrease in the myeloid:erythroid ratio in evaluated horses.

REFERENCES

- 1 Gonzales GF. Metabolismo en las grandes alturas. *Acta Andina* 2001; 9:31-42.
- 2 Townsend NE, Gore CJ, Hahn AG, McKenna MJ, Aughey RJ, Clark SA, Tahnee Kinsman T, Hawley JA, Chow C-M. Living high-training low increases hypoxic ventilatory response of well-trained endurance athletes. *J Appl Physiol* 2002; 93:1498-1505.
- 3 Hochachka PW, Gunga HC, Kirsch K. Our ancestral physiological phenotype: An adaptation for hypoxia tolerance and for endurance performance? *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:1915-1920.

- 4 Basset FA, Joanisse DR, Boivin F, St-Onge J, Billaut F, Doré J, Chouinard R, Falgairette G, Richard D, Boulay MR. Effects of short-term normobaric hypoxia on hematology, muscle phenotypes and physical performance in highly trained athletes. *Exp Physiol* 2006; 91:391-402.
- 5 Rice L, Alfrey CP. The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15:245-250.
- 6 Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, Fluck M. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol* 2003; 88:109-119.
- 7 Vogt M, Puntchart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 2001; 91:173-182.
- 8 Bailey DM, Davies B, Young IS. Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clin Sci* 2001; 101:465-475.
- 9 Sellon DC. Disorders of the hematopoietic system. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, eds. *Equine Internal Medicine*. 2nd ed. Saint Louis: WB Saunders, 2004:721-768.
- 10 Desplanches D, Hoppeler H, Linossier MT, Denis C, Claassen H, Dormois D, Lacour JR, Geysant A. Effects of training in normoxia and normobaric hypoxia on human muscle ultra structure. *Pflügers Arch* 1993; 425:263-267.

11 Kolchinskaya AZ, Kozlov AS, Tsyganova TN. Utilization of hypoxic adaptation in the course of normobaric interval hypoxic training for the enhancement of aerobic performance and working capacity of trotters (extract). Letters of Academy Hypoxia Problems of Russian Federation. Moscow, 1999.

12 Weibel ER. Understanding the limitation of O₂ supply through comparative physiology. *Respir Physiol* 1999; 118:85-93.

13 Cunningham JG. Textbook of Veterinary Physiology. Philadelphia: WB Saunders, 1992:656.

14 Levine BD, Stray-Gundersen J. “Living high-training low”: Effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol* 1997; 83:102-112.

15 Burtscher M, Pachinger O, Ehrenbourg I, Mitterbauer G, Faulhaber M, Púhringer R, Tkatchouk E. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease. *Intern J Card* 2004; 96:247-254.

16 Stray-Gundersen J, Levine BD. “Living high and training low” can improve sea level performance in endurance athletes. *Br J Sports Med* 1999; 33:150–154.

17 Levine BD, Stray-Gundersen J. Dose-response of altitude training: how much altitude is enough? *Adv Exp Med Biol* 2006; 588:233-247.

18 Julian CG, Gore CJ, Wilber RL, Daniels JT, Fredericson M, Stray-Gundersen J, Hahn AG, Parisotto R, Levine BD. Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners. *J Appl Physio* 2004; 96:1800-1807.

19 Gore CJ, et al. Increased serum erythropoietin but not red cell production after 4 weeks of intermittent hypobaric hypoxia (4,000 –5,500 m). *J Appl Physio* 2006; 101:1386-1393.

20 Rodriguez FA, Ventura JL, Casas M, Casas H, Pagés T, Rama R, Ricart A, Palacios L, Viscor G. Erythropoietin acute reaction and hematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 2000; 82:170-177.

21 Stray-Gundersen J, Levine BD. Live high, train low at natural altitude. *Scand J Med Sci Sports* 2008; 18:21-28.

22 Figuera RA. Anemia em medicina veterinária. Santa Maria: Palloti, 2001:43.

23 Merino CF. Studies on blood formation and destruction in the polycythemia of high altitude. *Blood J* 1950; 5:1-31.

24 Faura J, Ramos J, Reynafarje C, English E, Finne P, Finch CA. Effect of altitude on erythropoiesis. *Blood J* 1969; 33:668-676.

25 Newman EV, Merrell M, Genecin A, Monge C, Milnor WR, McKeever WP. The dye dilution method for describing the central circulation: an analysis of factors shaping the time concentrations curves. *Circulation* 1951; 4:735-746.

26 Evans D. Exercise testing in the field. In: Hinchcliff KW, Geor RJ, Kaneps AJ, eds. Equine exercise physiology: the science of exercise in the athletic horse. Philadelphia: WB Saunders, 2008:12-27.

27 Lassen ED, Swardson CJ. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 1995; 11:351-389.

28 Levine BD, Stray-Gundersen J. Point: positive effects of intermittent hypoxia (live high:train low) on exercise performance are mediated primarily by augmented red cell volume. J Appl Physiol 2005; 99:2053-2055.

29 Hoppeler H, Weibel ER. Limits for oxygen and substrate transport in mammals. J Exp Biol 1998; 201:1051-1064.

30 Hoppeler H, Weibel ER. Structural and functional limits for oxygen supply to muscle. Acta Physiol Scand 2000; 168:445-456.

31 Marlin D, Nankervis K. Equine exercise physiology. Ames: Blackwell, 2002:113-126.

32 Ri-Li Ge S, Witkowski S, Zhang Y, Alfrey C, Sivieri M, Karlsen T, Resaland GK, Harber M, Stray-Gundersen J, Levine BD. Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia. J Appl Physiol 2002; 92:2361-2367.

33 Weil JV, Jamieson G, Brown DW, Grover RF. The red cell mass-arterial oxygen relationship in normal man: application to patients with chronic obstructive airway disease. *J Clin Invest* 1968; 47:1627-1639.

34 Kingston JK, Bayly WM. Effect of exercise on acid-base status of horses. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1998; 14:61-73.

Table 1 – Distribution of [O₂], sample collection days and number of daily sessions during the experiment.

Day	0	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	23	30	
Sessions/day		1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1			
[O ₂] (%)	N	17	17	16	15	14	13	13	12	12	12	12	12	12	12	12	12	N	N	
Venous blood	C								C									C		
Arterial blood		C					C				C							C		
Bone marrow	C								C									C	C	C

N: normoxia
C: sample collection



Figure 1 - Heart and respiratory rates (mean \pm SE) of 7 adult non-exercised horses submitted to 1-hour IHT sessions at 17%, 14%, 13% and 12% O₂.

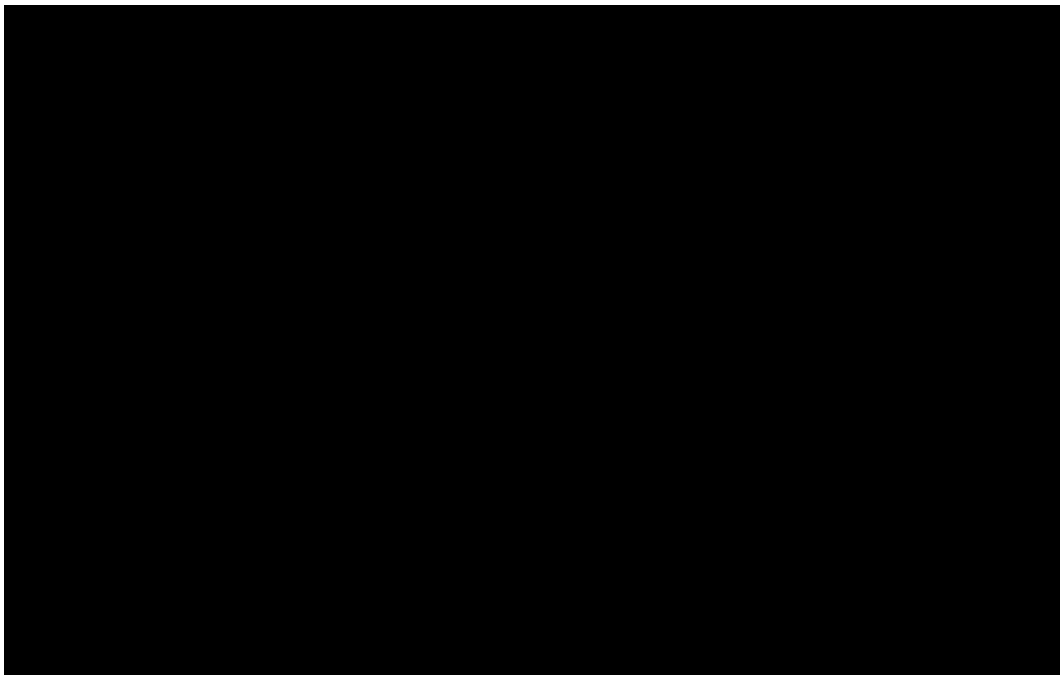


Figure 2 - PCV, RBC and [Hb] (mean \pm SE) of 7 adult non-exercised horses submitted to 1-hour long hypoxia before and after 15 and 30 IHT sessions.

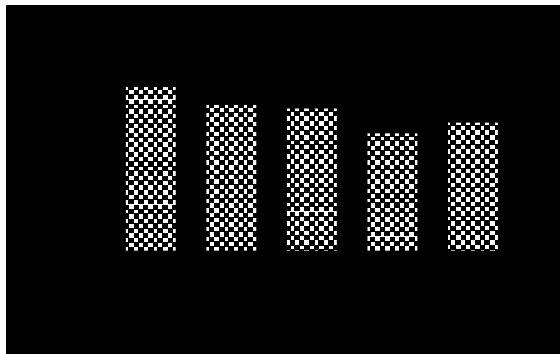


Figure 3 – Myeloid:erythroid ratio (mean \pm SE) of bone marrow aspirates of 4 adult non-exercised horses before (0, normoxia [N]), on days 8 and 16 of IHT (12% O₂) and 7 (23, N) and 14 (30, N) days after IHT.



Figure 4 - PO_2 , PCO_2 and SO_2 (mean \pm SE) of 7 adult non-exercised horses submitted to 60 minute IHT at 17%, 13% and 12% O_2 .

CONCLUSÕES

O modelo experimental de hipóxia normobárica intermitente pode ser utilizado em eqüinos e promove adaptações fisiológicas decorrentes da hipóxia.

A hipóxia promove adaptação cardio-circulatória em cavalos não treinados, caracterizada pela manutenção da FC e da FR durante as sessões e a diminuição da FC entre as sessões, no decorrer do experimento.

Trinta sessões de hipóxia não promoveram alterações no hematócrito, contagem de eritrócitos e concentração de hemoglobina, mas resultaram em diminuição da relação células mielóides: células eritróides nos cavalos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, C. M. Cycling Performance following intermittent hypoxic training using an hypoxicator. 2004. 150 f. **Thesis (Degree of Master Science)** – University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.

BAILEY, D. M.; DAVIES, B. Physiological implications of altitude training or endurance performance at sea level: a review. **British Journal of Sports Medicine**, London, v. 31, n. 3, p. 183-190, Sept. 1997.

BAILEY, D. M. et al. Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. **Clinical Science**, London, v. 101, n. 5, p. 465-475, Nov. 2001.

BASSET, F. A. et al. Effects of short-term normobaric hypoxia on haematology, muscle phenotypes and physical performance in highly trained athletes. **Experimental Physiology**, London, v. 91, n. 2, p. 391-402, Mar. 2006.

BERNARDI, L. et al. Respiratory and cardiovascular adaptations to progressive hypoxia. Effect of interval hypoxic training. **European Heart Journal**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 879-886, May. 2001.

BIOMEDTECH – BIOMEDICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT. **GO₂ Altitude Equine One Hypoxicator System**: Operators Manual, 1999-2006. p. 34, Melbourne, 2006.

BURTSCHER, M. et al. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 247-254, Sept. 2004.

BURTSCHER, M. Arterial oxygen saturation during ascending to altitude under various conditions: Lesson from the field. **Journal of Science and Medicine in Sports**, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 535-537, Nov. 2008.

BURTSCHER, M. et al. Preacclimatization in simulated altitudes. **Sleep and Breathing Journal**, Heidelberg, v. 12, n. 2, p. 109-114, May. 2008.

BURTSCHER, M. et al. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in patients at risk for or with mild COPD. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 97-103, Jan. 2009.

CHAPMAN, R; LEVINE, B. D. Altitude training for the marathon. **Sports Medicine**, Tattenhall, v. 37, n. 4-5, p. 392-395, Apr. 2007.

CUNNINGHAM, J.G. **Textbook of Veterinary Physiology**. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 656.

DESPLANCHES, D. et al. Effects of training in normoxia and normobaric hypoxia on human muscle ultra structure. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, Heidelberg, v. 425, n. 3-4, p. 263-267, Nov. 1993.

DESPLANCHES, D. et al. Muscle tissue adaptations of high altitude natives to training in chronic hypoxia or acute normoxia. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 81, n. 5, p. 1946-1951, Nov. 1996.

EVANS, D. Exercise testing in the field. In: HINCHCLIFF, et al. **Equine exercise physiology: The science of exercise in the athletic horse**. Philadelphia: Saunders, 2008. Cap. 1.2, p. 12-27

FAURA, J. et al. Effect of altitude on erythropoiesis. **Blood Journal**, Washington, v. 33, n. 5, p. 668-676, May. 1969.

FIGHERA, R. A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria: Palloti, 2001. Cap. 2, p. 43.

GONCHAR, O. A.; ROZOVA, E. V. Effects of different modes of interval hypoxic training on morphological characteristics and antioxidant status of heart and lung tissues. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 144 n. 2, p. 249-252, Aug. 2007.

GONZALES, G. F. Metabolismo en las grandes alturas. **Acta Andina**, Lima, v. 9, n. 1-2, p. 31-42, 2001.

GORE, C. J. et al. Increased serum erythropoietin but not red cell production after 4 wk of intermittent hypobaric hypoxia (4,000 –5,500 m). **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 101, n. 5, p. 1386-1393, Nov. 2006.

GORE, C. J. et al. Nonhematological mechanisms of improved sea level performance after hypoxic exposure. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Philadelphia, v. 39, n. 9, p. 1600-1609, Sept. 2007.

GORE, C. J. et al. Preparation for football competition at moderate to high altitude. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Hoboken, v. 18, n. 1, p. 85-95, Feb. 2008.

GORE, C. J.; HOPKINS, W. G. Positive effects of intermittent hypoxia (live high: train low) on exercise performance are mediated primarily by augmented red cell volume. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 99, n. 5, p. 2053-2058, Nov. 2005.

HAHN, A. G.; GORE, C. J. The effect of altitude on cycling performance: A Challenge to Traditional Concepts. **Sports Medicine**, Auckland, v. 31, n. 7, p. 533-557, Jul. 2001.

HOCHACHKA, P. W. et al. Our ancestral physiological phenotype: An adaptation for hypoxia tolerance and for endurance performance? **Proceedings of The National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 4, p. 1915-1920, Feb. 1998.

HOPPELER, H. et al. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. **Experimental Physiology**, London, v. 88, n. 1, p. 109-119, Jan. 2003.

HOPPELER, H.; VOGT, M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 204, n. 18, p. 3133-3139, Sept. 2001.

HOPPELER, H.; WEIBEL, E. R. Limits for oxygen and substrate transport in mammals. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 201, n. 8, p. 1051-1064, Apr. 1998.

HOPPELER, H.; WEIBEL, E. R. Structural and functional limits for oxygen supply to muscle. **Acta Physiologica Scandinavica Journal**, Hoboken, v. 168, n. 4, p. 445-456, Apr. 2000

JULIAN, C. G. et al. Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 96, n. 5, p. 1800-1807, May. 2004.

KATAYAMA, K. et al. Intermittent hypoxia increases ventilation and SaO₂ during hypoxic exercise and hypoxic chemosensitivity. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 90, n. 4, p. 1431-1440, Apr. 2001.

KINGSTON, J. K; BAYLY, W. M., Effect of exercise on acid-base status of horses. In: HINCHCLIFF, K. W., **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. Philadelphia: Saunders, 1998. v. 14, n. 1, p. 61-73.

KNAUPP, W. et al. Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 73, n. 3, p. 837-840, Sept. 1992.

KOLCHINSKAYA, A. Z. et al. Utilization of hypoxic adaptation in the course of normobaric interval hypoxic training for the enhancement of aerobic performance and working capacity of trotters (extract). **Letters of Academy Hypoxia Problems of Russian Federation**. Moscow, 1999.

LASSEN, E. D.; SWARDSON, C.J. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. In: MESSER, N. T. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. Philadelphia: Saunders, 1995. v. 11, n. 3, p. 351-389.

LEVINE, B. D.; STRAY-GUNDERSEN, J. "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 83, n. 1, p. 102-112, Jul. 1997.

LEVINE, B. D.; STRAY-GUNDERSEN, J. Point: positive effects of intermittent hypoxia (live high:train low) on exercise performance are mediated primarily by augmented red cell volume. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 99, n. 5, p. 2053-2055, Nov. 2005.

LEVINE, B. D.; STRAY-GUNDERSEN, J. Dose-response of altitude training: how much altitude is enough? **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 588, n. 8, p. 233-247, Apr. 2006.

MARLIN, D.; NANKERVIS, K. **Equine exercise physiology**. Malden: Blackwell, 2002. Cap. 10, p. 113-126.

MERINO, C. F. Studies on blood formation and destruction in the polycythemia of high altitude. **Blood Journal**, Washington, v. 5, n. 1, p. 1-31, Jan. 1950.

MOU, X. B. et al. A protocol for determining the shape of the ventilatory response to hypoxia in humans. **Respiration Physiology**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 139-143, Aug. 1995.

NEWMAN, E. V. et al. The dye dilution method for describing the central circulation: An analysis of factors shaping the time concentrations curves. **Journal of the American Heart Association**, Philadelphia, v. 4, n. 5, p. 735-746, Nov. 1951.

NIELSEN, H. B. et al. The influence of PaO₂, pH and SaO₂ on maximal oxygen uptake. **Acta Physiologica Scandinavica**, Hoboken, v. 164, n. 1, p. 89-97, Sept. 1998.

REYNAFARJE, C. et al. The polycythemia of high altitudes: iron metabolism and related aspects. **Blood Journal**, Washington, v. 14, n. 4, p. 433-455, Apr. 1959.

RICE, L.; ALFREY, C. P. The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Baltimore, v. 15, n. 6, p. 245-250, Dec. 2005.

RICHALET, J. P.; GORE, C. J. Live and/or sleep high: train low, using normobaric hypoxia. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Hoboken, v. 18, n. 1, p. 29-37, Aug. 2008.

RI-LI GE, S. et al. Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 92, n. 6, p. 2361–2367, Jun. 2002.

RODRIGUEZ, F. A. et al. Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. **European Journal of Applied Physiology**, Heidelberg, v. 82, n. 3, p. 170-177, Jun. 2000.

SELLON, D. C. Disorders of the hematopoietic system. In: REED, S.M. et al. **Equine Internal Medicine**. Saint Louis: Saunders, 2004. 2nd ed., Cap. 12, p. 721-768.

SEREBROVSKAYA, T. V. Intermittent hypoxia research in the former soviet union and the commonwealth of independent states: history and review of the concept and selected applications. **High Altitude Medicine & Biology**, New Rochelle, v. 3, n. 2, p. 205-221, Jun. 2002.

SOMERO, G. N.; SUAREZ, R. K. Peter Hochachka. Adventures in biochemical adaptation. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 67, p. 25-37, Mar. 2005.

STRAY-GUNDERSEN, J.; LEVINE, B. D. “Living high and training low” can improve sea level performance in endurance athletes. **British Journal of Sports Medicine**, London, v. 33, n. 3, p. 150–154, Jun. 1999.

STRAY-GUNDERSEN, J.; LEVINE, B. D. Live high, train low at natural altitude. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Hoboken, v. 18, n. 1, p. 21-28, Aug. 2008.

TOWNSEND, N. E. et al. Living high-training low increases hypoxic ventilatory response of well-trained endurance athletes. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 93, n. 4, p. 1498–1505, Oct. 2002.

VOGT, M. et al. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. **Journal of Applied Physiology**, Stanford, v. 91, n. 1, p. 173-182, Jul. 2001.

WEIBEL, E. R. Understanding the limitation of O₂ supply through comparative physiology. **Respiration Physiology**, Amsterdam, v. 118, n. 2-3, p. 85-93, Sept. 1999.

WEIL, J. V. et al. The red cell mass-arterial oxygen relationship in normal man: application to patients with chronic obstructive airway disease. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 47, n. 7, p. 1627-1639, Jul. 1968.

WICKLER, S. J.; ANDERSON, T. P. Hematological changes and athletic performance in horses in response to high altitude (3800 m). **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. R1176-1181, Oct. 2000.