

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

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES E
PLASMÁTICOS APÓS REALIZAÇÃO DE UM ESFORÇO
SUBMÁXIMO EM MULHERES COM HIPOTIREOIDISMO
SUBCLÍNICO TRATADAS COM L-TIROXINA SÓDICA**

ALUNO: Romeu Paulo Martins Silva Lamounier

ORIENTADOR: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

UBERLÂNDIA-MG

2007

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

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES E
PLASMÁTICOS APÓS REALIZAÇÃO DE UM ESFORÇO
SUBMÁXIMO EM MULHERES COM HIPOTIREOIDISMO
SUBCLÍNICO TRATADAS COM L-TIROXINA SÓDICA**

ALUNO: Romeu Paulo Martins Silva Lamounier

ORIENTADOR: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA-MG
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L236a Lamounier, Romeu Paulo Martins Silva, 1977-
Análise de biomarcadores salivares e plasmáticos após
realização de

um esforço submáximo em mulheres com hipotireoidismo
subclínico tratadas com L-tiroxina sódica / Romeu Paulo
Martins Silva Lamounier. - 2007.

82 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espindola.

Co-orientador : Elmiro Santos Resende.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Hipotireoidismo - Teses. 2. Tiroxina - Teses. I.
Espíndola, Foued
Salmen. II. Resende, Elmiro Santos. III. Universidade
Federal de Uber-
lândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Ti-
tulo.

CDU: 616.441-

008.64

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

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES E PLASMÁTICOS APÓS
REALIZAÇÃO DE UM ESFORÇO SUBMÁXIMO EM MULHERES COM
HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO TRATADAS COM L-TIROXINA SÓDICA**

ALUNO: Romeu Paulo Martins Silva Lamounier

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola – UFU

Examinadores: _____

Data da Defesa: ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB pra o
formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Uberlândia-MG, ____/____/____.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	05
CAPITULO I.....	07
RESUMO GERAL.....	08
INTRODUÇÃO.....	09
Hipotireoidismo ubclínico.....	09
Hipotireoidismo subclínico e implicações na tolerância ao esforço..	10
Lactato.....	11
Limiar anaeróbico.....	15
Saliva.....	16
Proteínas salivares.....	17
Mecanismo de Secreção Salivar.....	19
Mecanismos controladores da secreção saliva.....	19
Efeito do Exercício na Secreção e Composição Salivar.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULOII.....	31
Resumo.....	32
Introdução.....	34
Materiais e métodos.....	36
População e amostra.....	36
Métodos.....	36
Avaliação da tolerância ao esforço.....	36
Coleta e análise de sangue.....	37
Reposição hormonal com L-tiroxina sódica.....	37
Procedimentos de Re-Teste.....	39
Coleta da saliva e mensuração da saliva.....	39
Determinação do limiar anaeróbio.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
CT	Colesterol Total
DO	Densidade Óptica
FAEFI	Faculdade de Educação Física
FC	Frequência Cardíaca
FC _{MÁX}	Frequência Cardíaca Máxima
Fig	Figura
g	Gramas
Graf	Gráfico
H	Idosos Homens
H ₂ O ₂	Água Oxigenada
HC	Hospital de Clínicas
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IE	Elisa
IgA	Imunoglobulinas A
IMC	Índice de massa corporal
Kg	Kilogramas
LA	Limiar Anaeróbio
LAPEEFE	Laboratório de Pesquisa, Ensino e Extensão em Fisiologia do Exercício
FAEFIUFU	Faculdade de Educação Física da Universidade Federal de Uberlândia
LAS	Limiar Salivar
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LL	Limiar de Lactato
mg	Miligramas
microL	Microlitros
microM	Micromolar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm/Hg	Milímetros de Mercúrio

NA ⁺	Sódio
NEED	(1-Naphthyl) ethyl-ene diamine
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
OPD	Dicloridrato de Ortofenilenadamina
PQ	Ponto de Quebra
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
T4	Tetraiodotironina (L-tiroxina)
T3	Triiodotironina
TAG	Triglicérides
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
W	watts

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

Vários estudos associam o hipotireoidismo subclínico a fatores de risco para doença aterosclerótica, mas poucos correlacionam este distúrbio à diminuição da tolerância ao esforço físico e sua relação com os biomarcadores salivares. Neste contexto, a reposição hormonal com o emprego da L-tiroxina no tratamento destes pacientes permanece controversa. O exercício induz o aumento no recrutamento de unidades motoras e alterações bioquímicas nos sistemas corporais que modificam a composição de alguns componentes do sangue e saliva, entre outros fluidos corporais. Essas alterações podem ser usadas como indicadores da resposta fisiológica dos vários sistemas. A análise de componentes salivares, tais como, eletrólitos, proteína total e atividade da α -amilase para detectar o limiar salivar (LA_{sa}), e atividade elétrica do músculo para detectar o limiar eletromiográfico (EMG_{lan}) podem representar uma alternativa não invasiva na determinação da intensidade de exercício correspondente ao limiar anaeróbio (LAN).

Introdução

Distúrbios da tireóide têm sido alvo de estudos das mais diversas áreas das ciências da saúde devido às suas conseqüências sobre os diversos sistemas do organismo humano. Dentre os distúrbios desta glândula podemos destacar o hipotireoidismo e o hipertireoidismo. O hipotireoidismo é caracterizado por diminuição dos níveis circulantes e teciduais dos hormônios tireoidianos (tiroxina e triiodotironina); pode ser classificado em primário, secundário ou terciário, se a doença que o causa se localizar na tireóide, hipófise ou hipotálamo, respectivamente. (CASTRO et.al., 2001)

A apresentação clínica do hipotireoidismo é variável. Nas formas sintomáticas ocorre redução do metabolismo tecidual com bradicardia, intolerância ao frio e apatia. O hipotireoidismo é classicamente vinculado à hipertensão arterial e as disfunções ventriculares esquerdas, apresentando-se como causa de cardiopatia dilatada e derrame pericárdico. Nestas situações ocorre redução do volume sistólico e, às vezes, restrição ao enchimento ventricular. Em situações avançadas, e particularmente frente a processos infecciosos, podem surgir alterações hemodinâmicas graves com hipotensão severa e de difícil tratamento. (BELL et.al., 1985; FORFAR, et.al., 1985; BIONDI et.al., 2002; BRENTA et.al, 2003). Em quadros mais avançados pode ocorrer o coma mixedematoso e, às vezes, morte do paciente. Quando a falência hormonal é apenas parcial, os sintomas estão praticamente ausentes e o diagnóstico da disfunção é laboratorial (CASTRO 12 et.al., 2001). Esta última forma caracteriza os quadros subclínicos que serão objeto de uma abordagem mais ampla em nosso estudo.

Hipotireoidismo subclínico

De acordo com Lerch, Meier, Staub (1999) de 7 a 8% das mulheres acima de 50 anos e 3% dos homens desenvolvem quadro de hipotireoidismo subclínico ao longo da vida. Como se trata de uma forma clínica praticamente assintomática permanece controvertido a necessidade de tratamento à base de reposição hormonal. É difícil também prever-se a evolução desta doença, pois podem existir formas transitórias em decorrência, por exemplo, de tireoidites

nem sempre diagnosticadas. Apesar destas dificuldades, outros aspectos importantes estão presentes e vinculados no paciente com hipotireoidismo subclínico. Vários estudos associaram esta condição a fatores de risco para desenvolvimento de doença aterosclerótica. (FORGA, et.al.,1998; VIERHAPPER et.al, 2000; KAHALY, 2000; CASTRO et.al., 2001; BIONDI et.al., 2002; SCHINDLER, 2003; CANTURK et.al, 2003; INECK, NG, 2003; KVETNY et.al, 2004). Foram descritas concentrações séricas elevadas de colesterol total, de LDLcolesterol e de triglicérides, com redução de HDL-colesterol. Além destes aspectos, a disfunção endotelial também foi relatada e sabe-se que ela pode estar envolvida na gênese da hipertensão arterial e da lesão aterosclerótica. Se tais fatores estão presentes no hipotireoidismo subclínico, muito pouco se sabe quanto a eventuais benefícios que poderiam advir se a reposição hormonal fosse feita nestas condições.

Hipotireoidismo subclínico e implicações na tolerância ao esforço

A diminuição da tolerância ao esforço físico devido ao acometimento dos sistema muscular que ocorrem no hipotireoidismo tem sido pouco analisada na literatura (EVERTS, 1996; KAHALLY et.al., 2000). Em casos de hipotireoidismo, em consequência à redução da atividade enzimática integrante do metabolismo aeróbio, ocorre diminuição da capacidade de trabalho do músculo esquelético e aumento da lactacidemia durante esforços. (KAMINSKY et.al. 1991; KAMINSKY et.al., 1992; ARGOV et.al.,2002)

Monzanni et.al. (1997) correlacionou a intolerância ao esforço em pacientes com hipotireoidismo subclínico e hipovasodilatação periférica. Neste estudo foi analisado o comportamento do lactato sangüíneo, durante esforço progressivo em exercício dinâmico para membros superiores, em 12 pacientes. Observou-se que o acúmulo desta substância foi significativamente maior nos pacientes quando comparados ao grupo controle. Tal estudo concluiu que a terapia com reposição de L-tiroxina precoce pode ser útil para melhorar estas alterações metabólicas e, assim, talvez, garantir maior tolerância ao esforço. Apesar destes relatos, o uso da L-tiroxina em pacientes com hipotireoidismo subclínico ainda permanece controverso, particularmente em pacientes com TSH menor

que 12mU/L (FORGA, 1998; LERCH, MEIER E STAUB, 1999; HUESTON, 2001). Deve-se lembrar também que a indicação da terapia hormonal depende, muitas vezes, da etiologia da disfunção tireoideana e das doenças concomitantes (doença coronariana, depressão, infertilidade).

Kahaly (2000) utilizou a ecodopplercardiografia e a ergoespirometria para avaliar a função cardiovascular e a tolerância ao esforço no hipotireoidismo subclínico. Foram estudados 20 pacientes em repouso, durante exercício praticado no limiar anaeróbio e no esforço máximo, antes e após reposição hormonal, comparando-se os resultados obtidos com os de um grupo controle composto por pacientes eutireoideos. Durante o repouso, a frequência cardíaca, o volume de ejeção e a taxa de enchimento ventricular dos pacientes com hipotireoidismo subclínico foram semelhantes aos dos eutireoideos. Quanto a influência do hipotireoidismo subclínico sobre a tolerância ao esforço, este estudo demonstrou menor consumo de oxigênio no limiar anaeróbio e no exercício máximo, quando comparados ao grupo controle. A taxa de esforço alcançada no limiar anaeróbio foi também significativamente menor no hipotireoidismo subclínico.

Lactato

O lactato vem sendo extensivamente usado como parâmetro para identificar o limiar anaeróbio e a exaustão física. Durante muito tempo ele foi designado como ácido láctico e, taxado como o principal vilão do exercício físico por ser considerado o responsável pela fadiga. Hoje, a existência fisiológica do ácido láctico é contestada, e o lactato, ao contrário do que se acreditou durante anos, pode ser um importante intermediário no processo de reparação e regeneração da acidose metabólica durante o exercício físico.

Pensava-se que o acúmulo de lactato no sangue refletia um momento durante o exercício no qual o fornecimento de oxigênio era inadequado para satisfazer as exigências de energia para a musculatura ativa (Myers e Ashley, 1997). Wasserman e McIlroy, (1964), explicitamente desenvolveram o conceito de que o limiar crítico existe quando: a) as necessidades metabólicas do músculo por oxigênio excedem a capacidade do sistema cardiopulmonar em supri-lo; b) há um aumento súbito no metabolismo

anaeróbio; c) o lactato é formado no músculo. Entretanto, estudos feitos nos últimos 15 anos usando tecnologias de isótopos traçados sugerem que o músculo pode liberar lactato mesmo quando o suprimento de oxigênio é mais que adequado (Brooks, 1991). Além disso, evidências que o músculo se torna anaeróbio a partir de uma dada intensidade de exercício, na qual os níveis de lactato no sangue aumentam precipitadamente, ainda permanece em debate (Brooks, 1991; Katz e SahliLn, 1990; Wasserman et al., 1990; Stainsby e BROOKS, 1990). A formação do lactato parece depender de vários fatores, incluindo mais não limitado á disponibilidade de oxigênio (Myers e Ashley, 1997).

Numerosos estudos apoiaram a ligação entre o fornecimento de oxigênio e a magnitude do aumento do lactato no sangue, embora sem evidências diretas de causa e efeito. Por exemplo, até que ponto o aumento do lactato no sangue durante exercício é reduzido com o treinamento e aumento da aptidão? (MacRae et al., 1992), e aumentado na presença de taxas cardíacas diminuídas (Myers e Froelicher, 1991) ou doenças na cadeia de transporte de elétrons? (). Diminuição na fração de oxigênio inspirado experimentalmente ou por exposição a altitudes leva ao aumento do lactato sanguíneo (Hughes et al.1968; Yoshida et al., 1989). Em indivíduos normais, a redução no volume sanguíneo causa aumento no nível de lactato durante o exercício (Fortney et al., 1982), enquanto paciente com falha cardíaca crônica, o aumento da taxa cardíaca com terapia inotrópica atenua o aumento do lactato sanguíneo também durante o exercício (Siskind et al., 1981).

Katz e SahliLn (1990) resumiram dados experimentais e razões teóricas que suportam a concepção que a produção de lactato seja dependente de O₂. Eles argumentam que quanto o fornecimento de oxigênio é limitado, a respiração mitocondrial é estimulada pelo aumento de adenosina difosfato (ADP), fosfato inorgânico (Pi), e pela forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Estes favorecem a estimulação da glicólise, a qual aumenta a formação de NADH citossólico, o qual modifica o ponto de equilíbrio da enzima lactato desidrogenase (LDH) levando a formação do lactato.

Segundo a hipótese do limiar anaeróbio de Wasserman et al., (1986), quando a intensidade de exercício aumenta e mais unidades motoras são recrutadas, o requerimento de oxigênio do músculo em contração aumenta. Numa intensidade submáxima de exercício, a qual varia de indivíduo para indivíduo, o requerimento de oxigênio excede o suprimento do mesmo para a célula. Como resultado, se instala a hipóxia muscular. O insuficiente aporte de oxigênio promove a inibição da cadeia de transporte de elétrons, que por sua vez diminui a formação aeróbica de ATP, acarretando num acúmulo da NADH mitocondrial. Este acúmulo inibe a lançadeira citoplasmática de NADH, aumentando sua concentração no citoplasma e diminuindo a concentração de NAD. O aumento da relação $[NADH]/[NAD]$ mitocondrial diminui a atividade do ciclo de Krebs, refletindo numa menor utilização de piruvato, e desta forma provocando acúmulo do mesmo na mitocôndria e posteriormente no citoplasma. No citoplasma, o piruvato torna-se o aceitador de H^+ da coenzima NADH, aumentando dessa forma a formação do lactato. Como a produção aeróbia de ATP está reduzida, ocorre grande acúmulo de ADP e P_i , vindos da degradação do próprio ATP e da CP. Tanto o ADP como o P_i são potentes estimuladores da via glicolítica, que por sua vez terá sua atividade aumentada acarretando maior produção do lactato. Esta maior produção levará ao acúmulo de lactato tanto na célula como no sangue.

Apesar dessas observações, a concepção de que a disponibilidade de oxigênio seja o único determinante na produção do lactato é altamente controverso. Estima-se que o lactato possa ser formado sob condição que são puramente aeróbias (Brooks, 1991; Connett et al., 1984), podendo estes achados negarem a concepção que a anaerobiose por si aumente a produção do lactato.

Connett et al., (1985) usando a técnica da mioglobina criomicrospectroscópica para obter a distribuição da pO_2 muscular em repouso e durante contrações musculares, obteve um nível crítico de pO_2 mitocondrial (pO_{2crit}) onde abaixo deste nível, o funcionamento do citocromo aa3 é reduzido; ou seja, a capacidade de gerar ATP pelo metabolismo oxidativo é reduzida. Em mitocôndrias isoladas, a pO_{2crit} tem sido estimada para ser entre 0,1 e 0,5 mmHg. Através de estimulação elétrica muscular, numa frequência de estimulação de 1/s e 4/s, não foi encontrada pO_2 mitocondrial

menor que dois mmHg durante o estado estável ou na transição do repouso para o exercício. Essas freqüências de contrações musculares requisitaram de 10 a 70% do consumo máximo de oxigênio respectivamente. A concentração de lactato aumentou de 1mM/L em repouso para 2 mM/L na freqüência de 1/s e para 6 mM/L na freqüência de 4/s. Baseados nesses dados pode-se sugerir que a concentração de lactato aumenta, mesmo com suprimento adequado de O₂ à mitocôndria. Dessa forma, o acúmulo de lactato pode ser causado por outros fatores que não a limitação de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons.

A produção muscular de lactato depende do mecanismo competitivo, pela lei de ação das massas por piruvato e a NADH+H⁺ entre a enzima LDH (lactato desidrogenase) por um lado, a lançadeira de NADH+H⁺, e o transportador mitocondrial de piruvato por outro. A LDH está bem situada para competir favoravelmente por piruvato e NADH+H⁺ porque é catalisada numa reação próxima do equilíbrio e está localizada no citoplasma, onde possui fácil acesso para seus substratos. Quando a intensidade do exercício aumenta, a atividade glicolítica é aumentada devido à ativação de enzimas regulatórias chaves desta via, como a fosfofrutoquinase (PFK), enzima esta que acelera a formação de piruvato e NADH+H⁺. A aumentada formação dos substratos da LDH, juntamente com sua presença no citoplasma aumenta a formação de lactato (Devlin, 1997).

Vários fatores contribuem para maior atividade da via glicolítica: maior [Pi,ADP]; ativação da PFK por regulação alostérica; fosforilação de enzimas; ligação à calmodulina (Katz e Sahlin, 1990; Hargreaves., 1995). Entretanto, o rápido aumento da utilização do glicogênio muscular (glicogenólise) por ativação do glicogênio fosforilase (PHOS) e da fosfofrutoquinase (PFK) é devido a 3 fatores: locais (maiores concentrações de Ca⁺⁺, ADP, AMP, IMP e Pi) (DEVLIN, 1997), Quantidade do glicogênio armazenado (maior quantidade de glicogênio armazenado resulta numa maior utilização do mesmo) (Weltman et al.,1995; Hargreaves,1995) e regulação hormonal (catecolaminas ativam a enzima glicogênio fosforilase de sua forma inativa “b” para sua forma ativa “a”). (Stainsby e Brooks, 1990; Hargreaves, 1995; Devlin, 1997).

Apesar de muita controvérsia sobre as causas do acúmulo de lactato durante o exercício, existe consenso na literatura de que a partir de determinada intensidade do exercício crescente, o mesmo começa a acumular-se, chegando a provocar exaustão caso atinja concentrações elevadas. Entretanto, a intensidade na qual começa a ocorrer o acúmulo de lactato denota grande controvérsia, seja em relação à nomenclatura do fenômeno ou a sua metodologia de avaliação (Weltman et al., 1994).

Limiar anaeróbico

O limiar anaeróbico (AT) foi definido por Wasserman (1986) como sendo o ponto no qual há um aumento não linear tendendo a exponencial na concentração de lactato sanguíneo. Existem diversos métodos de determinação do AT utilizando-se o este biomarcador, dentre os quais está o "Limiar Anaeróbio Individual" (IAT) (STEGMANN, KINDERMANN E SCHNABEL, 1981), o lacmin e o Vel4mM. O IAT é determinado em testes de cargas progressivas com estágios de três minutos de duração e dosagem de lactato sanguíneo, onde o AT é determinado de acordo com a cinética do lactato durante o exercício e a recuperação (STEGMANN, KINDERMANN E SCHNABEL, 1981); o Lacmin é determinado considerando-se a intensidade do exercício correspondente ao menor valor de lactato, durante teste progressivo realizado após indução da "acidose láctica" (TEGTBUR et al., 1993); e o Vel4mM, onde o indivíduo avaliado é submetido a um teste de cargas progressivas, composto no mínimo de dois estágios de pelo menos 4 minutos cada, e a velocidade correspondente à concentração fixa de 4mmol.l^{-1} de lactato é determinada por interpolação entre a velocidade de corrida e a concentração de lactato sanguíneo ao final de cada estágio (CHICHARRO E ARCE, 1991). Simões et al (1998), comparou esses três métodos de determinação do limiar anaeróbico, citados a cima, em fundistas; e tentou correlacioná-los ao limiar de glicose. Neste estudo conclui-se que todos os três métodos eram capazes de predizer com confiança o limiar anaeróbico; e que somente o Vel4mM não foi correlacionando com o limiar a partir da glicose.

A correlação do limiar anaeróbico do lactato sanguíneo, com outras substâncias tem sido muito estudada. Limiares anaeróbicos salivares (CHICHARRO et al,1994; CALVO et al.,1997) vem sendo propostos nos últimos anos. Calvo e cols (1997) detectaram que o limiar salivar poderia também ser analisado a partir da concentração de amilase, sendo este definido como o ponto no qual o primeiro aumento contínuo na concentração de amilase salivar ocorreria durante o exercício. Esses autores apontaram que o limiar anaeróbico (AT) e o salivar sofrem aumentos tendendo a exponencial no mesmo ponto. Os dois limiares podem se correlacionar, já que o limiar anaeróbico pode ser avaliado através da concentração de amilase salivar e eletrólitos, na saliva total, durante o esforço físico (CALVO et al.,1997).

Saliva

Saliva é um fluido complexo produzido por várias glândulas especializadas que descarregam na cavidade oral dos mamíferos vertebrados. A maior quantidade de saliva é produzida pelas glândulas salivares principais (parótida, submandibular, e sublingual), mas existe uma contribuição pequena que é feita pelas numerosas glândulas labiais, bucais e palatais pequenas que encontram-se na boca (Vining et al., 1983).

Várias funções são atribuídas as secreções salivares, entre elas: a) Umedecer as membranas mucosas da área de aerodigestiva superior, b) facilitar a fala e controlar a flora bacteriana da boca, c) Prover enzimas destinadas no preparo da comida para digestão; d) Produzir hormônios e outras combinações farmacologicamente ativas; e) Molhar a pele de animais como resposta a tensão de calor, obtendo a mesma possibilidade refrescante pela transpiração; f) Defesa e matança (Martinez-Madrigal e Micheau, 1989).

A saliva é normalmente incolor, um fluido diluído com densidade que percorre de 1002 para 1012. Seu pH usualmente se aproxima de 6.64, mais varia dependendo do nível de CO₂ no sangue. Quando o nível de CO₂ no sangue está elevado, uma alta proporção de CO₂ é transferida do sangue para a saliva e o pH salivar diminui (Chicharro et al., 1998).

Embora componentes variados estejam sempre presentes na saliva, os níveis totais de constituintes orgânicos e inorgânicos são geralmente baixos

quando comparados com o soro; normalmente 90% da saliva é composta de água. Dos constituintes inorgânicos, o Na^+ e o K^+ (e talvez o Ca^{++}) são os principais cátions de importância osmótica na saliva, e os principais ânions osmoticamente ativos são o Cl^- e HCO_3^- . Apesar da porcentagem de proteínas totais na saliva serem menores em comparação com o soro, proteínas específicas como a α -amilase podem estar presentes na saliva em níveis que excedam aquela do soro (Schneyer, 1962). Outros componentes orgânicos da saliva incluem a maltose soro albumina, uréia, ácido úrico, creatinina, mucina, ácido ascórbico (vitamina C), vários aminoácidos, lactato, alguns hormônios tais como testosterona e cortisol. Alguns gases como CO_2 , O_2 , N_2 e imunoglobulinas como IgA, IgG e IgM também estão presentes na saliva (Bartual, 1980). Os níveis salivares de K^+ , Ca^{++} uréia, ácido úrico e aldosterona são altamente correlacionados com aqueles existentes no plasma (Dawes, 1974). A significância de alguns constituintes salivares como minerais traçados, fatores de crescimento epidermal, fatores de crescimento neural, várias enzimas e algumas proteínas (kalicreína e calmodulina), ainda permanecem desconhecidas. (Olmez, et al., 1988).

Proteínas salivares

Essas proteínas têm se mostrado aderir fortemente e inibir a formação da hidroxiapatita (Hay, 1975; Oppenheim et al., 1986). Elas aumentam a atividade glicolítica dos micro-organismos salivares (Holbrook e Molan, 1975) e apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (MacKay et al., 1984).

A alfa-amilase humana (α 1,4-glucagon-4-glucano hidrolase, EC 3.2.1.1) catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas internas no amido, provenientes da alimentação, transformando em pequenas unidades que podem ser assimiladas pelo organismo (RAMASUBBU et al., 2003; LE BERRE et al., 2000). Duas famílias podem ser distinguidas: família A é glicosilada e tem um peso molecular de 62Kd, ao passo que a família B não é glicosilada e tem um peso molecular de 56Kd (Kauffman et al., 1970; Keller et al., 1971 APUD Minaguchi e Bennick, 1989).

A amilase não é sintetizada somente por glândulas salivares, mas também pelas células do pâncreas. As duas amilases têm composições

químicas muito similares e são imunologicamente indistinguíveis (Stiefel e Keller, 1973 APUD Minaguchi e Bennick, 1989), mas tem diferentes pontos isoelétricos, pesos moleculares e propriedades catalíticas (Stiefel e Keller, 1973, 1975 APUD Minaguchi e Bennick, 1989). Lenander-Lumikari et al., (2000) mencionam que a amilase é sintetizada primariamente em célula acinar e menos consistentemente na célula proximal dos ductos intercalados.

Peroxidase salivar catalisa a oxidação de tiocianeto (SCN⁻) pela degradação de H₂O₂ para gerar um íon hipotiocianeto (OSCN) e íons hipotiocianos (HOSCN), os quais funcionam como agentes microbianos (Iwamoto e Matsumura, 1966; Iwamoto et al., 1967; Slowey et al., 1968). Existem na saliva total humana, dois grupos diferentes de peroxidases, um ácido e outro básico (Tenovu, 1981). A enzima cujo ponto isoelétrico é alcalino é derivada das glândulas salivares e são encontradas em formas múltiplas e com diferentes pontos isoelétricos e pesos moleculares (Iwamoto et al., 1967).

As glicoproteínas tipo mucinas são complexos de carboidratos de alto peso molecular que oferece propriedades viscosas para secreção salivar. Elas são sintetizadas principalmente pelas glândulas submandibular/sublingual e glândulas salivares menores e tem sido purificada pela saliva total, saliva glandular e na própria glândula salivar (Schrager e Oates, 1971; Prakobphol et al., 1982).

Cistatinas são pequenas proteínas que tem sido identificadas em vários tecidos e organismos. Eles inibem a cistatinas proteases tais como ficína e papaína. (Anastasi et al., 1983; Abrahamson et al., 1986). Shomers et al., (1982) identificou a família de cisteína contendo fosfoproteínas e caracterizou três grupos desta proteína.

Estaterina é uma fosfoproteína com 43 resíduos a qual inibe a precipitação espontânea e o crescimento secundário de sais de cálcio e fosfato. A proteína pode assim, prevenir a precipitação da saliva, a qual é normalmente supersaturada com cálcio e fosfato, ajudando a manter a estabilidade dos dentes no meio (Hay, 1973).

Mecanismo de Secreção Salivar

Tanto a síntese quanto à secreção de constituintes salivares orgânicos na região acinar, de um lado, quanto o fluxo de eletrólitos ao longo do ducto, por outro, são mecanismos ativos os quais utilizam energia derivada de reações metabólicas da célula (Schneyer et al., 1972).

O modelo descrito por Thaysen e seus co-autores para descrever a secreção salivar são divididos em dois estágios: no primeiro estágio, as células acinares produzem uma secreção primária isotônica, no segundo, a secreção primária é modificada durante sua passagem através do ducto. O ducto excretório modifica a secreção primária pela extração de Na^+ e Cl^- e adição de K^+ e HCO_3^- na saliva (Schneyer et al., 1972, Nauntofte., 1992). Como a saliva flui através do sistema de ductos esta se torna mais hipotônica, pois o ducto epitelial é relativamente impermeável à água (Nauntofte., 1992, Martinez., 1987). O resultado final é uma saliva altamente hipotônica (25mEq/L NaCl) que entra na cavidade oral (Thaysen et al., 1954).

Mecanismos controladores da secreção salivar

A quantidade e a qualidade da saliva secretada dependem de processos sistêmicos e locais. O tipo de receptor autonômico que é ativado, a taxa de fluxo salivar, a intensidade e duração da estimulação da glândula podem influenciar na composição salivar (Enberg et al., 2001).

A secreção salivar está predominantemente sob o controle do sistema nervoso autonômico (Garret e Kidd, 1976; Baum, 1987). Apesar de não haver evidencia de que o fluxo salivar seja modificado por homônimos, as catecolaminas poderiam estar envolvidas no controle dos níveis de proteínas e eletrólitos na saliva (Anderson et al., 1984). Tanto a produção quanto à composição da saliva depende da atividade do sistema nervoso autônomo, e qualquer modificação desta atividade pode ser observada indiretamente por alterações na secreção salivar (Denniss et al., 1978).

Embora a secreção salivar normal seja dependente da cooperação entre os nervos simpáticos e parassimpáticos, o controle nervoso da secreção salivar não é idêntico para todas as glândulas salivares. As secreções salivares das

glândulas sublinguais e mucosas secundárias são principalmente extraídas em resposta á estimulação colinérgica, considerando que as secreções das outras glândulas são evocadas pela inervação adrenérgica. Sabe se que o impulso nervoso parassimpático cria o principal estímulo para a secreção salivar em geral (Schneyer et al., 1972). A estimulação parassimpático resulta em um fluxo de saliva que contem baixos níveis de componentes orgânicos e inorgânicos (Baum, 1987; Asking e Emmelin, 1985). Por outro lado, a estimulação simpática produz saliva com baixo volume, mas com altos níveis de proteínas e K^+ (Baum, 1987; Pilardeau et al., 1990). Além disso, a saliva evocada pela ação de mediadores adrenérgicos geralmente tem um alto conteúdo orgânico e certo nível de sal inorgânico também é maior que o da saliva evocada pela estimulação colinérgica (Schneyer et al., 1972; Baum, 1987). O alto conteúdo orgânico da saliva evocada pela estimulação adrenérgica pela atividade do adenilado ciclase inclui a elevação do nível de proteína total, e especialmente a enzima digestiva α -amilase (Speirs et al., 1974). Os níveis de componentes inorgânicos Ca^{++} K^+ ou KCO_3 , são usualmente alto na saliva evocada pela estimulação simpática (Schneyer et al., 1972).

As secreções celulares não são os únicos elementos glandulares que respondem á estimulação pela inervação simpática. As células mioepiteliais e os vasos sanguíneos das glândulas também respondem a tais inervações, e suas respostas podem modificar a quantidade e composição da saliva elaborada (Garret e Emmelin, 1979). Isso mostra, por exemplo, que a estimulação simpática dos vasos sanguíneos pode produzir uma marcada vasoconstrição. Essa vasoconstrição pode limitar o suprimento sanguíneo da glândula tal que a taxa de secreção salivar também pode ser reduzida (Suddick e Dowd, 1986).

A composição da saliva muda consideravelmente com a duração da estimulação da glândula salivar. Os níveis de proteínas totais, Ca^{++} e HCO_3 e pH aumentam com a duração do estímulo, considerando que os níveis de cloro diminuem (Dawes, 1974). A alteração na composição da saliva coletada depois da mudança na intensidade ou duração da estimulação parece ser causada por mudanças na permeabilidade da membrana das células secretoras. A mudança

na permeabilidade altera a taxa na qual os eletrólitos são liberados destas células (Schneyer et al, 1972).

Efeito do Exercício na Secreção e Composição Salivar

Estudos em atletas de elite e de alta performance geralmente indicam que exercícios intensos de endurance resultam em baixo nível de IgA salivar nas amostras de saliva coletadas imediatamente após o treino. A diminuição na concentração absoluta de IgA salivar tem sido mostrado em esquiadores de elite (Steerenberg et al., 1997), nadadores (Tharp e Barnes, 1990; Gleeson et al., 1995), maratonistas (Cameron et al., 1990) e ciclistas (MACKINNON et al., 1989; Gleeson et al., 2000).

Exercícios de intensidade máxima provocam uma diminuição pós exercício na concentração de IgA em ciclistas e em grupos de atletas recreacionais (MCDowell et al., 1992; MACKINNON et al., 1993)

Vários estudos têm investigado o efeito do exercício de intensidade moderada em atletas recreacionais (indivíduos moderadamente treinados em lugar de atletas altamente treinados) usando esteira ou cicloergômetro em laboratório. Essa linha de investigação é significativa, dado as implicações potenciais para a prescrição de programas de exercício moderados na comunidade geral. Vários estudos têm mostrado que exercícios de intensidade moderada não levam a mudanças significativas nas concentrações de IgA salivar pós-exercício (Blannin et al., 1998, MACKINNON e hooper, 1994; Bratthall e widerstrom, 1985; McDowell et al., 1991).

Coletivamente, os resultados desses estudos sugerem que o exercício moderado não provoca nenhuma mudança significativa na concentração de imunoglobulina salivar em atletas recreacionais, com efeitos variáveis vistos depois de turnos de exercício exaustivo por atletas de elite altamente treinados.

Em contraste com a IgA salivar, as outras classes de imunoglobulinas na saliva tem recebido muito pouca atenção. Concentração de IgG salivar são inalterados pelo exercício em ciclistas (Mackinnon e hooper, 1994), nadadores de elite (Gleeson et al., 1995) e em voluntários saudáveis em ciclismo exaustivo (MACKINNON et al., 1993). As concentrações de IgM salivar diminuíram após o exercício na maioria dos estudos e paralelo a diminuição na

concentração de IgA salivar. A concentração de IgM salivar tem mostrado diminuir após sessões de treinamento em nadadores de elite (Gleeson et al., 1995) e pós duas horas de ciclismo exaustivo em ciclistas de competição (MACKINNON et al., 1989). A concentração de IgM foi também menor no time de jogadores hockey feminino durante a competição comparado com sessões de treinamento (MACKINNON e JENKINS et al., 1993). A taxa de secreção de IgM na saliva foi inalterada após treinamento em Kayakers de elite, mas diminuiu no grupo de atletas recreacionais após ciclismo supramáximo (MACKINNON et al., 1993).

Durante o exercício, os níveis salivares de proteína total podem estar aumentados desde que a secreção salivar seja então evocada principalmente pela ativação de mediadores adrenérgicos. Sabe-se que o exercício aumenta a atividade simpática e, realmente, os altos níveis de proteínas na saliva após exercício pode ser devido ao aumento da atividade simpática nas glândulas salivares (Dawes, 1981). Os níveis elevados de proteínas salivares como as alfa-amilases podem também ser causadas pelo aumento das catecolaminas plasmáticas associado com o exercício (Dawes, 1981; Bardon et al., 1983; Calvo et al., 1997).

Referências Bibliográficas

Abrahamson, M.; Barrett, A.J.; Salvesen, G.; Grubb, A. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem.* v. 25, nº 24, p. 11282-9, Aug, 1986.

Anastasi, A.; Brown, M.A.; Kembhavi, A.A.; Nicklin, M.J.; Sayers, C.A.; Sunter, D.C.; Barrett, A.J. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem. J.* v. 211, nº 1, p.129-38, Apr, 1983.

ANDERSON, L.C.; GARRETT, J.R.; JOHNSON, D.A.; KAUGGMSN, D.L.; KELLER, P.J.; THULIN, A. Influence of circulating catecholamines on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation. *J. Physiol,* v.352, p.163–171, 1984.

BARDON, A.; CEDER, O.; KOLLBERG, H. Cystic fibrosis-like changes in saliva of healthy persons subjected to anaerobic exercise. *Clin Chim Acta.* v. 133, nº3, p. 311-316, Oct, 1983.

Bartual, J. Fisiología Y fisiopatología parotídea. In: Clemente M, editor. *Patología de La parótida.* Balencia : Fundacioón García Muñoz, 1980: 27-40.

BASMAJIAN, J.V.; De LUCA, C.J. *Muscles Alevel: their function.* Baltimore. 276-278, 1985.

BAUM, B.J. Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.* v. 66, p. 628-632, 1987.

BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; WSLSH, N.P.; CLARK, A.M.; GLENNON, L.; GLEESON, M. The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immol/Lunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. *Int J Sports Med.* v. 19, nº8, p. 547-552, Nov, 1998.

BRATTHALL, D.; WIDERSTROM, L. Ups and downs for salivary IgA. *Scand J Dent Res.* v. 93, nº2, p.128-34, Apr, 1985.

- BROOKS, G. A. Current concepts in lactate exchange. *Med Sci Sports Exerc.* v. 23, p. 895-906, 1991.
- CALVO, F.; CHICHARRO, J.L.; BANDRÉS, F.; LUCIA, A.; PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L.L.; VAQUERO, A.F.; LEGIDO, J.C. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. *Can. J. Appl. Physiol.* v. 22, nº 6, p. 553-561, 1997.
- CAMERON, W.R.; JOHANSSON, L.; TENNVALL, J. Small cell carcinoma of the parotid. Fine needle aspiration and immunochemical findings in a case. *Acta Cytol.* v. 34, nº6, p. 837-41, Nov-Dec, 1990.
- CHICHARRO, J. L.; LEGIDO, J. C.; ALVARES, J.; SERRATOSA, L.; BANDRES, F.; GAMELLA, C). Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic threshold determination. *Kur- J. Appl Phys*, 68: 214-218, 1994.
- CHICARRO, J.L; ARCE, J.C.L Umbral anaerobio bases fisiologicas y aplicacion. Madrid, interamericana, 1991.
- CHICHARRO, J.L.; LUCIA, A.; PÉREZ, M.; VAQUERO, A.F.; Urena, R. Saliva composition and exercise. *Sports Méd.* v.26, p. 17-27, 1998.
- CONNETT, R.J.; GAYESKI, T.E.J.; HONING, C.R. Energy sources in fully aerobic rest-work transitions: a new role for glycolysis. *Am. J. Physiol.* p. H922-H29, 1985.
- CONNETT, R.J.; GAYESKI, T.E.J.; HONING, C.R. Lactate accumulation in fully aerobic, working dog gracilis muscle. *Am J Physiol.* v. 246, p. h120-128, 1984.
- DAWES, C. The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. *J Physiol.* v. 320, p. 139-48, Nov, 1981.
- DAWES, C. Rhythms in salivary flow rate and composition. *Int J Chronobiol.* v. 2, p. 253-279, 1974.
- Denniss, A.R.; Schneyer, L.H.; Sucanthapree, C.; Young, J.A. Actions of adrenergic agonists on isolated excretory ducts of submandibular glands. *Am J Physiol.* v. 235, nº 6, p. 548-56, Dec, 1978.
- DEVLIN, T.M. *Textbook of Biochemistry*, Wiley-Liss ed. 4^a ed, 1997.

Enberg, N.; Alho, H.; Loimaranta, V.; Lenander-Lumikari, M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 92, n°3, p. 292-8, Sep, 2001.

FORTNEY, S. M., NADEL, E.R., WENGER, C.B., et al. Effect of blood volume on sweating rate and body fluids in exercising humans. *J Appl Physiol.* v. 51, p. 1594- 1600, 1982.

GARRET, J.R.; KIDD, A. Effects of autonomic nerve stimulation on submandibular acini and saliva in cats [proceedings]. *J Physiol.* v. 263, n°1, p. 198P-199P, Dec, 1976.

Gleeson, M.; Cripps, A.W.; Clancy, R.L. Modifiers of the human mucosal immune system. *Immunol Cell Biol.* v. 73, n°5, p. 397-404, Oct, 1995.

Gleeson, M.; McDonald, W.A.; Pyne, D.B.; Clancy, R.L.; Cripps, A.W.; Francis, J.L.; Fricker, P.A. Immune status and respiratory illness for elite swimmers during a 12-week training cycle. *Int J Sports Med.* v. 21, n°4, p.302-7, May, 2000.

HARGREAVES, J.A. Discussion: diet and nutrition in dental health and disease *Am J Clin Nutr.* v. 61, n°2, p. 447S-448S, Feb, 1995.

HAY, D.L., The isolation from Human Parotid Saliva of a Tyrosine-rich Acidic Peptide which Exhibits High Affinity for Hydroxyapatite Surfaces, *Arch Oral Biol.* v.18, p. 1531-1541, 1973.

HAY, D.I. Fractionation of Human Parotid Salivary Proteins and the Isolation of an Histidine-rich Acidic Peptide Which show high Affinity for Hydroxyapatite Surfaces, *Arch Oral Biol.* v. 20, p. 553-558, 1975.

Holbrook, I.B.; Molan, P.C. The identification of a peptide in human parotid saliva particularly active in enhancing the glycolytic activity of the salivary micro-organisms. *Biochem J.* v.149, n°2, p.489-92, Aug, 1975.

HUGHES, R.L.; CLODE, M.; EDWARDS, R.H.T.; et al. Effect of inspired O₂ on cardiopulmonary and metabolic exercise responses in man. *J Appl Physiol.* v. 24, p. 336-347, 1968.

IWAMOTO, Y.; INQUE, m., TSUNEMITSU, A, MATSUMURA T. Some Properties of the Salivary Antibacterial Factors (SA Factor), Arch Oral Biol. v. 12, p. 1009-1012, 1967.

IWAMOTO, Y.; MATSUMURA, T. Purification and Characterization of the Salivary Antibacterial Factor (AS Factor), Arch Oral Biol. v. 12, p. 667-676, 1966.

KATZ, A.; SAHLILN, K. Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. In: Pandeolf KBHJ. Ed. Exercise and sport sciences reviews. Baltimore: Williams e Wilkins. 1990; 1-28.

Kauffman, D.L.; Zager, N.I.; Cohen, E.; Keller, P.J. The isoenzymes of human parotid amylase. Arch Biochem Biophys. v.37, n°2, p.325-39, 1970.

LENANDER-LUMIKARI, M.; IHALIN, R.; LAHTEENOJA, H. Changes in whole saliva in patients with coeliac disease. Arch Oral Biol. v. 45, n°5, p. 347-54, May, 2000.

MacRae, H.S.; Dennis, S.C.; Bosch, A.N.; Noakes, T.D. Effects of training on lactate production and removal during progressive exercise in humans. J Appl Physiol. v.73, n°5, p. 2205-7,1992.

MACKAY, B. J., Pollock, J. J., Iacono, V. J., Baum, B. J. Isolation of Milligram Quantities of a Group of Histidine-rich Polypeptides from human Parotid Saliva, Infect Immun. v. 44, p. 688-694, 1984.

MacKinnon, L.T.; CHICK, T.W.; VAN As A, et al. Decreases secretory immunoglobulins following intense endurance exercise. Sports Train Med Rehab. v. 1, p. 209-218, 1989.

MacKinnon, L.T.; HOOPER, S. Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during over training. Int J Sports Med. v. 15, p. S179-193, 1994.

MacKinnon, L.T.; GINN, E.; SEYMOUR, G.J. Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite Kayakers. Eur J Appl Physiol. v. 67, p. 180-4, 1993.

MARTINEZ, J.R. Ion transport and water movement. J dent Res. v. 66 special issue: 638-647, 1987.

Martinez-Madrigal, F.; Micheau, C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol.* v. 13, nº10, p. 879-99, Oct, 1989.

MCDOWELL, S.L.; HUGHES, R.A.; HUGHES, T.J.; et al. the effect of exercise training on salivary immunoglobulin A and cortisol responses to maximal exercise. *Int J Sports Med.* v. 13, p. 577-580, 1992.

MINAGUCHI, K., BENNICK, Genetics of human salivary proteins. *J. Dent. Res.* v. 68, p. 2-15, 1989.

MYERS, J.; FROELICHER, V.F. Hemodynamic determinants of exercise capacity in chronic heart failure. *Ann Intern Med.* v. 115, p. 377- 386, 1991.

MYERS, J.; ASHLEY, E. Dangerous Curves: A perspective on exercise, lactate and the anaerobic threshold. *Chest.* v. 111, p. 787-795, 1997.

Nauntofte, B. Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am J Physiol.* v. 263(6 Pt 1), p. G823-37, Dec, 1992.

OLMEZ, I.; GULOVALI, M.C.; GORDON, G.E.; HENKIN, R.I. Trace elements in human parotid saliva. *Biol Trace Elem Res.* v. 17, p. 259-70, Sep-Dec, 1988.

PILARDEAU, P.; RICHALET, J.P.; BOUISSOU, P.; VAYSSE, J.; LARMIGNAT, P.; BOOM, A. Saliva flow and composition in humans exposed to acute altitude hypoxia. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* v. 59, nº 6, p. 450-3, 1990.

PRAKOBPHOL, A.; LEVINE, M.J.; TABAK, L.A.; Reddy, M.S. Purification of a Low-Molecular-Weight Mucin-Type Glycoprotein from Human submandibular Sublingual Saliva. *Carbohydrate Res.* v. 108, p. 111-122, 1982.

RAMASUBBU K, SCHOENHAGEM P, BALGHITH MA, BRECHTKEN J, ZIABA KM, KAPADIA SR, HOBBS RE, RINCON G, NISSEN SE, TUZCU EM. Repeated intravascular ultrasound imaging in cardiac transplant recipients does not accelerate transplant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* v. 41, nº 10, p. 1739-43, May, 2003.

SCHNEYER, C.A. Salivary gland changes after isoproterenol induced enlargement. *Am J Physiol.* v. 203, p. 232-236, 1962.

SCHNEYER, L.H.; YONG, J.A.; SCHNEYER, C. A. Salivary secretion of electrolytes. *Physiology Ver.* v. 52, p. 720-777, 1972.

SCHRAGER, J.; OATES, M. D. G. The isolation and partial characterization of the principal glycoprotein from mixed saliva, *Arch Oral Biol.* v. 16, p. 287-303, 1971.

SHOMERS, J.P.; TABAK, L.A.; LEVINE, M.J.; MANDE, I.D.; ELISSON, S.A. The isolation of a Family of Cysteine-containing Phosphoproteins from Submandibular-Sublingual Saliva, *J Dent Res.* v. 61, p. 973-977, 1982.

SIMÕES, H.G., CAMPBELL, C.S.G., BALDISSERA, V., DENADAI, B.S., KOKUBUN, E. Determinação do limiar anaeróbico por meio de dosagens glicêmicas e lactacidêmicas em testes de pista para corredores. *Revista paulista de educação física*, 12 (1): 17-30, 1998.

Siskind, S.J.; Sonnenblick, E.H.; Forman, R.; Scheuer, J.; LeJemtel, T.H. Acute substantial benefit of inotropic therapy with amrinone on exercise hemodynamics and metabolism in severe congestive heart failure. *Circulation.* v. 64, nº 5, p. 966-73, Nov, 1981.

SLOWEY, R.R.; EIDELLMAN, S.; KLEBANOFF, S.J. Antibacterial Activity of the Purified Peroxidase from Human Parotid Saliva. *J Bact.* v. 96, p. 575-579, 1968.

SPEIRS, R.L.; Herring, J.; Cooper, W.D.; Hardy, C.C.; Hind, C.R. The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. *Arch Oral Biol.* v. 19, nº 9, p. 747-52, Sep, 1974.

STAINSBY, W.N.; BROOKS, G.A. Control of lactate metabolism in contracting muscles and during exercise. *Exercise and Sports Sciences Reviews*, Williams e Wilkins, Baltimore, 1990.

STEGMANN, H.; KINDERMANN, W.; SCHNABEL, A Lactate Kinetics and individual anaerobic threshold. *International Journal of Sports Medicine*, 2: 160-165, 1981.

STEERENBERG, P.A; VAN ASPEREN, I.A; VAN NIEUW AMERONGEN, A; BIEWENGA, A.; MOL, D.; MEDEMA, G.J.; Salivary levels of immol/Lunoglobulin A in triathletes. *Eur J Oral Sci.* v. 105, nº 4, p. 305-9, Aug 1997.

SUDDICH, R.P.; DOWD, F.J. Mechanism of salivary secretion. In: Manaker, L. The biological basis of dental caries: an oral biology textbook of Lewis. Manaker. Hagerstow (MD): Harper & Row Publishers, p.67-118, 1986.

TEGTUBER, U; BUSSE, M.W; BRAUMANN, K.M. Estimation of an individual equilibrium point between lactate production and removal during exercise. Med. Sci. sports and exercise, 25: 620-627, 1993

TENOBUO, J. Different Molecular Forms of Human Saliva Lactoperoxidase. Arch Oral Biol. v. 26, p. 1051-1055, 1981.

THARP, G.F.; BARNES, M., Reduction of saliva immunoglobulin levels by swim training. Eur J Appl Physiol. v. 60, p. 61-64, 1990.

THAYSEN, J.H.; THORN, N.A.; SCHAWARTZ, I.L. Excretion of sodium, potassium chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. Am.J. Physiol. v. 178, p. 155-159, 1954.

VINING, R.F., MCGINLEY, R.A., MAKSUJTIS, J.J., et al. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. Ann Clin Biochem. v. 20, p. 329, 1983.

WASSERMAN, K.; HANSEN, J.E.; SUE, D.Y.; WHIPP, B.J. Principles of exercise testing and interpretation. Lea & Febiger, Philadelphia, 1986.

WASSERMAN, K.; BEAVER, W. L.; WHIPP, B.J. Gas exchange and lactic acid acidosis (anaerobic) threshold. Circulation. v. 81, p. 14-30, 1990.

WELTMAN, S.; WOOD, C.M.; WOMACK, C.J.; et al. Catecholamine and blood lactate responses to incremental rowing and running exercise. J. Appl. Physiol. v. 76, p. 1144-1149, 1994.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES DO LACTATO SANGUÍNEO E DE BIOMARCADORES SALIVARES NO ESFORÇO SUBMÁXIMO EM HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO DE MULHERES TRATADAS COM L-TIROXINA SÓDICA

Autores: Romeu Paulo Martins Silva Lamounier¹, Alexandre Gonçalves², Vivian Lamounier Camargos Resende Silva¹, Maria Luiza Mendonça Pereira Fernandes², Elmiro Santos Resende² e Foued Salmen Espindola¹.

Afiliação: ¹Instituto de Genética e Bioquímica – Laboratório de Bioquímica do Exercício e Saúde, ²Faculdade de Medicina – Mestrado em Ciências da Saúde Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil.

Autor correspondente: foued@ufu.br Fone: (55) 34-3218-2477 (Brasil), Fax: (55) 34-3218-2203.

Romeu Paulo Martins Silva Lamounier: Rua José Antônio de Oliveira nº 35 Apto 23-C, Bairro Ozanan, Uberlândia-MG, CEP 38400-000, Brasil.

Alexandre Gonçalves: Rua John Carneiro, 870 Apto 302, Bairro Lídice, Uberlândia-MG, CEP 38400-072, Brasil.

Vivian Lamounier Camargos Resende Silva: Rua José Antônio de Oliveira nº 35 Apto 23-C, Bairro Ozanan, Uberlândia-MG, CEP 38400-000, Brasil.

Anibal Monteiro de Magalhães Neto: Av. Brasil nº 4465 Apto 402-B, Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38405-312, Brasil.

Maria Luiza Mendonça Pereira Fernandes: Rua Quinze de Novembro nº 363 - Apto. 700, Bairro: Centro, Uberlândia-MG, CEP 38.400-214, Brasil.

Elmiro Santos Resende: Rua Ceara nº 836, Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38402018, Brasil.

Foued Salmen Espindola: Rua Padre Anchieta nº39, Bairro Centro, Uberlândia-MG, CEP 38400-061, Brasil.

RESUMO

Pacientes com hipotireoidismo subclínico tratados com L-tiroxina sódica realizaram teste de esforço físico em ciclo ergômetro. Selecionou-se oito voluntários do sexo feminino com idade $51,8 \pm 4,9$ anos, com níveis hormonais de TSH acima de $4,4 \text{ mU/dl}$ e T3 total e T4 livre no plasma com níveis normais. Os voluntários não apresentavam sinais clínicos de hipotireoidismo. Investigou-se as possíveis alterações causadas pelo tratamento com L-tiroxina e exercício físico através das concentrações de lactato sangüíneo, proteína total, IgA e óxido nítrico (NO) salivares, atividade da alfa-amilase salivar e tolerância ao esforço. Monitorou-se os níveis de TSH e FT4, sendo o de TSH antes $7,12 \pm 9,59$ e após o tratamento $1,0 \pm 1,7 \text{ m}\mu\text{/dL}$ ($p < 0,05$) e FT4 antes $0,95 \pm 0,15$ após o tratamento $1,00 \pm 0,38 \text{ m}\mu\text{/dL}$. Os valores de lactato e proteína foram mais elevados ($p < 0,05$) quando comparados antes e após a administração de L-tiroxina na realização do teste de esforço. O deslocamento para direita do ponto de limiar de lactato sanguíneo, proteína total salivar e o aumento de um estágio no teste incremental refletiram uma maior adaptação ao exercício após o tratamento. Além dos níveis de lactato sanguíneo e da proteína total salivar a concentração de NO salivar, também foram mais altos após o teste de esforço quando os voluntários foram tratados com L-tiroxina ($p < 0,05$). Os valores de atividade da alfa-amilase e de concentração de IgA antes e após o teste de esforço não foram diferentes ($p < 0,05$) em relação ao tratamento com L-tiroxina. Alguns dos biomarcadores salivares analisados neste estudo não sofreram alterações que indicassem uma melhor adaptação após o exercício. Porém, o tratamento com L-tiroxina promoveu alterações do NO salivar e do limiar anaeróbico no teste de esforço físico progressivo tanto quando avaliado pela mensuração do lactato sanguíneo e proteína total salivar. Estes dados sugerem que a reposição de L-tiroxina aumenta a tolerância ao esforço físico.

PALAVRAS CHAVES: Hipotireoidismo, L-Tiroxina, Exercício, Lactato, Saliva, IgA, Óxido Nítrico e Amilase.

ABSTRACT

Patients with subclinical hypothyroidism treated with sodium L-thyroxine realized test of physical effort in cycle ergometer to investigate the alterations in the concentrations of blood lactate; total protein, immunoglobulin A, nitric oxide, alpha-amylase activity, present in the saliva; and tolerance to the physical effort. We selected eight female volunteers aged 51.8 ± 4.9 years, TSH > 4.4 mU/dL, total T3 and free T4 in the plasma and without clinical signs of hypothyroidism. The values of blood lactate and salivary total protein was more raised ($p < 0.05$) when compared before and after the administration of L-thyroxine in the realization of the effort test. The displacement for right of the point of threshold of blood lactate, salivary total protein and the increase of a stage of training in the incremental test reflected a greater adaptation to the exercise after the treatment. The values of blood lactate, salivary total protein and salivary nitric oxide, before and after the test, was greater when the volunteers was treatment with L-thyroxine ($p < 0.05$). The values of salivary alpha-amylase activity and concentration of salivary immunoglobulin A, after and before the effort test, hadn't difference ($p < 0.05$) in relation to the treatment with L-thyroxine. Some of biomarkers analyzed in this study had not alterations that indicated one better adaptation after the exercise. However, the treatment with L-thyroxine showed alterations of the salivary nitric oxide and the anaerobic threshold in the test of physical effort when evaluated by the measure of blood lactate and salivary total protein. These data showed that the replacement of L-thyroxine increases the tolerance to the physical effort.

KEYWORDS: Hypothyroidism, L-Thyroxine, Exercise, Lactate, Saliva, Immunoglobulina A, Nitric Oxide and Amylase.

Introdução

O hipotireoidismo é caracterizado por diminuição dos níveis circulantes e teciduais dos hormônios tireoidianos (L-tiroxina e triiodotironina); pode ser classificado em primário, secundário ou terciário, se a doença que o causa se localizar na tireóide, hipófise ou hipotálamo, respectivamente (1).

Em casos de hipotireoidismo, em consequência da redução das atividades enzimáticas integrantes do metabolismo aeróbio, ocorre diminuição da capacidade de trabalho do músculo esquelético e aumento da lactacidemia durante esforços (1,2). No hipotireoidismo não tratado ocorre a diminuição da tolerância ao esforço físico devido a redução do inotropismo causado pelas alterações estruturais que ocorrem na miosina-ATPase na célula muscular. Esta enzima modificada determina uma alteração miocárdica que reduz o volume sistólico e, em consequência, o débito cardíaco, fator relevante na determinação da tolerância física ao esforço (4). Estudos observaram que o acúmulo de lactato sangüíneo foi significativamente maior em pacientes com hipotireoidismo subclínico e hipovasodilatação periférica quando comparados ao grupo controle sugerindo que a reposição de L-tiroxina precocemente pode ser útil para melhorar estas alterações metabólicas e, assim, talvez, garantir maior tolerância ao esforço (5).

A maioria dos testes utilizados para determinar melhora no desempenho físico ou alterações que atividade física proporciona o fazem através de amostras sanguíneas cuja coleta requer procedimentos invasivos, que sempre acarretam algum desconforto ao paciente e até podem gerar risco de contaminação. Por outro lado, a coleta da saliva não requer procedimentos invasivos ou equipamentos especiais, como ocorre para a coleta de tecido, sangue ou plasma. Neste sentido, tem se demonstrado que o exercício físico é capaz de induzir alterações agudas sobre a concentração de alguns biomarcadores salivares como óxido nítrico (NO) (6), IgA e proteína total (7, 8, 9, 10). Os níveis de NO na saliva após exercício físico intenso aumenta significativamente (6,11). A presença de NO pode ser quantificada na saliva a partir da dosagem dos ânions nitrito e nitrato resultante da estimulação das glândulas salivares (12).

O sistema nervoso simpático tem sua atividade aumentada progressivamente com a intensidade do exercício sendo o principal responsável pelas alterações causadas nos componentes salivares no decorrer do mesmo (13,14,15,16). A alfa-amilase salivar humana (HSA) é a proteína mais abundante na saliva, produzido pelas glândulas salivares e é principalmente sintetizada pela glândula parótida (17). A medida da atividade da HSA pode ser também um indicador de estresse psicológico, uma vez que sua secreção é regulada pela ação da noraepinefrina sobre as glândulas salivares (18,19).

O exercício físico pode influenciar nos níveis de imunoglobulinas A salivar (sIgA) podendo assim indicar o estado da função imunológica nos exercícios agudos (8; 9,6,10). A presença da sIgA na saliva funciona como uma primeira barreira protegendo do risco de infecções, especialmente das vias aéreas superiores.

Pouco se sabe ainda sobre o efeito do exercício físico avaliado pelos biomarcadores salivares em pacientes com hipotireoidismo subclínico. Portanto, este estudo tem como objetivo analisar as concentrações de proteína total na saliva e lactato sanguíneo obtidos em todos os estágios do exercício até exaustão e comparar as concentrações de proteína total, atividade da α -amilase, óxido nítrico e IgA, presente na saliva, no início, final do teste incremental e após cinco minutos da realização do teste de esforço submáximo.

Material e métodos

População e Amostra

A população deste estudo foi composta pelos pacientes atendidos nos do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU), que apresentaram quadro de hipotireoidismo subclínico identificado pela ausência de sinais e sintomas de hipotireoidismo e pelas análises bioquímicas de hormônio estimulante da tireóide (TSH), T4 livre (FT4), Triiodotironina (T3) e Tetraiodotironina (tiroxina) (T4) totais. Foram selecionadas oito voluntários do sexo feminino. Os critérios de inclusão foram: concentrações de TSH acima de 4,4Um/dl, idade entre 40 e 60 anos, IMC < 35 kg/m². Os critérios de exclusão foram: ausência de histórica clínica de doença ou disfunção cardiovascular, insuficiência pulmonar crônica, insuficiência renal, *diabetes mellitus*.

Métodos

O estudo foi iniciado após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia/CEPUFU. Após os procedimentos iniciais para confirmação do quadro de hipotireoidismo subclínico, as voluntárias, foram convidadas a participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre esclarecido. Após estes procedimentos, foram avaliadas clinicamente com o objetivo de se detectar alguma alteração que pudesse impedir a prática de esforço físico.

Avaliação da tolerância ao esforço

Antes de iniciarem a reposição hormonal com L-tiroxina, as voluntárias foram submetidas a um teste ergométrico para verificação do nível de tolerância ao esforço. Os testes foram realizados em cicloergômetro (Ergofit 167, Germany) entre as 9:00 e 11:00 horas da manhã com a temperatura da sala mantida entre 24 e 26°C. Os voluntários realizaram alongamento e um breve aquecimento de dois minutos sem carga. A frequência cardíaca foi mensurada durante todo o tempo por um monitor de frequência cardíaca (Polar

S610TM, Polar Electro Oy, Finlândia). Iniciou-se o teste com 50 W, aumentando de 25 em 25 W a cada estágio (dois minutos cada) até exaustão. A frequência de rotação do pedal foi mantida entre 68 e 75 rpm. Os testes foram finalizados: 1) voluntariamente pelo voluntário; 2) se a rotação do pedal não conseguisse ser mantida; ou 3) quando a frequência cardíaca ultrapassasse 90% da sua capacidade máxima.

Coleta e análise do sangue

Utilizando-se de luvas cirúrgicas, e após assepsia local com álcool, foi feita punção do lobo da orelha por meio de lanceta descartável. A primeira gota de sangue foi desprezada para evitar contaminação com lactato eliminado no suor produzido pelas glândulas sudoríparas, e a seguir 25 µL de sangue arterializado foram coletados, utilizando-se de capilares de vidro heparinizados e calibrados. O sangue coletado foi depositado em microtubos contendo 50 µL de fluoreto de sódio 1%, para inibição da enzima glicolítica enolase, interrompendo assim a atividade glicolítica e evitar a coagulação sanguínea. O lactato sanguíneo foi analisado por método eletro-enzimático no YSI 1500 Sport L-Lactate analyser (YSI Inc, Yellow Springs, Ohio).

Reposição hormonal com L-tiroxina sódica

Conforme orientação da médica endocrinologista que participou do estudo, as pacientes iniciaram o tratamento após o primeiro teste no cicloergometro recebendo um comprimido de 25 mcg de L-tiroxina sódica, via oral, pela manhã e em jejum. A dose inicial era aumentada, de acordo com a necessidade, até que os níveis de TSH se normalizassem. A dosagem da L-tiroxina variou de 25 a 75mcg.

Procedimentos de Re-Teste

Oito semanas após o início do tratamento com L-tiroxina atingiu-se em média a normalização do TSH quando todas as voluntárias foram submetidas novamente a exames laboratoriais e ao teste ergométrico para verificação da tolerância ao esforço. Os procedimentos para o segundo teste seguiram as mesmas orientações daqueles aplicados antes do tratamento.

Coleta da saliva e mensuração da saliva

A saliva estimulada, por goma de mascar (trident-menta®), foi coletada pelo método de cuspe (20). Dez minutos antes do teste físico, coletou-se saliva estimulada em proveta graduada por três minutos. Logo antes desta coleta os voluntários enxaguaram a boca várias vezes com água destilada, para limpeza de “debris” celulares e outros. Avisava-se o voluntário um minuto antes de cada mudança de estágio, para que engolissem a saliva e começassem a mastigar o chiclete. A coleta da saliva iniciava 30 segundos após cada estágio. A saliva era colocada em mini-tubos pré-resfriados (4°C). Em torno de no máximo três horas, a saliva era centrifugada a 12.000g, o sedimento era descartado e o sobrenadante congelado a -80°C até a data da análise. A proteína total foi mensurada pelo método de Bradford (21) e a atividade da amilase salivar foi realizada por método cinético a 405 nm, utilizando o substrato 2 cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotrioseo (CNP-G3) conforme o protocolo do fabricante (Amilasa 405, linha líquida, Wiener lab, Argentina).

A dosagem da concentração do óxido nítrico salivar foi feita a partir do método colorimétrico de Granger (22), A absorbância foi mensurada na leitora de microplaca (Titertek multiskan plus MK11) com filtro de 570nm. Os dados foram analisados de acordo com software Microplate Manager version 4.0 (Bio-Rad Laboratories, USA).

A análise da IgA total utilizou o teste de ELISA adaptado (23,24). As placas de poliestireno (Maxi-Sorp, Nunc, Wohlen) foram sensibilizadas com anticorpo anti-IgA humano (Sigma Chemical, Buchs), diluído na concentração ideal em tampão carbonato, 0,06M (pH 9,6) por 12 horas a 4 °C. As placas

foram lavadas e bloqueadas com tampão específico de dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD). As amostras de saliva foram diluídas a partir de 1:2 em 1% BSA-PBS-T e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, foi acrescentado conjugado biotinilado anti-IgA marcado com peroxidase diluída na concentração a ser utilizada. O substrato enzimático H_2O_2 + OPD (tampão cromógeno) incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Para análise individual das placas, os resultados foram expressos em índices ELISA (IE). Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados na leitora de microplaca à 405 nm. Após obter-se os resultados da IgA total dividiu o mesmo pelo valor da proteína total na saliva e encontrou-se o valor da IgA específica.

Determinação do limiar anaeróbio

O limiar anaeróbio foi determinado a partir de um modelo de regressão bissegmentada (25).

Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t de Student para variáveis com distribuição normal e o teste de Wilcoxon quando este comportamento da variável não foi observado, para $p < 0,05$ (26,27).

Resultados

A administração de L-tiroxina em pacientes com hipotireoidismo subclínico mostrou-se segura e nenhum efeito colateral foi relatado durante o período de acompanhamento dos voluntários. O comportamento do perfil hormonal no pré e no pós-tratamento mostrou níveis de TSH e FT4, sendo o de TSH antes $7,12 \pm 9,59$ e após o tratamento $1,0 \pm 1,7$ $m\mu/dL$ ($p < 0,05$) e FT4 antes $0,95 \pm 0,15$ após o tratamento $1,00 \pm 0,38$ $m\mu/dL$ (Fig.1).

O comportamento das concentrações de lactato sanguíneo e proteína total salivar durante o teste de esforço no pré e no pós-tratamento, em todos os voluntários visto na Fig.2, demonstra um aumento de um estagio para quase

todos os voluntários (Fig. 2: 2-8) e também uma mudança do limiar tanto para as concentrações de lactato (Fig.2: 1,2,6,7,8) quanto para proteína total salivar (Fig.2: 2,6,7,8). Por outro lado, os valores do limiar de lactato e proteína total salivar expressos em watts (W) de cada voluntário determinados pelo modelo de regressão linear bissegmentado (Fig.3) apresentaram um aumento significativo após o tratamento (Tabela 1).

Ao considerar para análise destes dados a média total da concentração de lactato sangüíneo e proteína total salivar em relação ao tratamento, não houve diferença entre as médias de concentrações de lactato sangüíneo no teste de esforço no pré e no pós-tratamento, apesar das médias de concentrações terem sido mais elevadas do que no pré-tratamento ($p < 0,05$). Entretanto, houve diferença para as concentrações de proteína total salivar após o tratamento (Fig. 4B) ($p > 0,05$).

Além disso, comparou-se os níveis dos parâmetros aqui investigados em relação às situações de repouso, final do teste e cinco minutos pós-teste no grupo antes e após o tratamento (situação A), como também se houve diferença dos valores deste biomarcadores separadamente independente do tratamento (situação B). Estes resultados estão agrupados na figura 5 (A-F). Com relação à avaliação do lactato sanguíneo (Fig. 5A) comparou-se os valores obtidos no repouso, no final do teste e em cinco minutos pós-teste antes e após o tratamento e as diferenças entre o grupo não-tratado e tratado intra e inter-ensaio. Os dados encontrados revelam que os valores de lactato após o tratamento aumentaram no repouso e no final do exercício (situação A). Observou-se o aumento de sua concentração do repouso para o final do teste e do repouso para os cinco minutos após o teste tanto antes como depois do tratamento analisando os testes separadamente ($p < 0,05$), e também uma queda do final do teste para os cinco minutos após o tratamento ($p < 0,05$) (situação B).

Os dados da concentração de proteína total salivar (Fig. 5B) na situação A, mostraram aumento no repouso e no final do teste. Houve também aumento de suas concentrações do repouso para o final e para os cinco minutos e uma queda do final para os cinco minutos após o teste tanto antes como depois do tratamento analisando os testes separados ($p < 0,05$) (situação B).

A atividade da HSA (Fig. 5C) aumentou do repouso para o final e teve uma queda do final para os cinco minutos após o teste, tanto antes como depois do tratamento analisando os testes separados ($p < 0,05$) (Situação B). Não houve alteração após o tratamento com L-tiroxina (situação A).

Os dados de NO salivar (Fig. 5D) revelam que os seus valores após o tratamento aumentaram no final do exercício (situação A). Observou-se também o aumento de sua concentração do repouso para o final do teste e para os cinco minutos após o teste, e também do final para os cinco minutos tanto antes como depois do tratamento analisando os testes separadamente (situação B) ($p < 0,05$).

Os valores de IgA (Fig. 5E) aumentaram do repouso em relação o final e também do final para os cinco minutos após o teste tanto antes como depois do tratamento analisando os testes separadamente ($p < 0,05$) (Situação B), mas não teve alteração quando comparados após o tratamento (Situação A).

Os valores da frequência cardíaca (Fig. 5F) não mostraram alterações com o tratamento de L-tiroxina apenas nos momentos separadamente. Havendo aumento do repouso para o final e uma queda do final para os cinco minutos após o teste, tanto antes como depois do tratamento analisando os testes separadamente ($p < 0,05$).

Discussão

Este estudo examinou o efeito do tratamento de L-tiroxina sódica durante exercício físico com cargas crescentes em voluntários com hipotireoidismo subclínico. Avaliou-se as concentrações de lactato sanguíneo e os biomarcadores salivares como proteínas totais, atividade da alfa-amilase salivar, óxido nítrico e IgA, bem como os limiares anaeróbico de lactato e proteína total salivar; além do efeito na performance até exaustão voluntária. Além disso, comparou-se os valores médios desses parâmetros no momento de repouso, exaustão e no pós-exercício antes e após o tratamento com a L-tiroxina sódica.

A intolerância aos esforços físicos em pacientes com hipotireoidismo é conhecida e a capacidade de suportar cargas de trabalho progressivas é reduzida no teste de esforço em pacientes com esta disfunção tireoideana.

(28). Tal fato é explicado pela diminuição da capacidade de trabalho do músculo esquelético provocada pela redução da capacidade metabólica do sistema aeróbio aumentando lactacidemia durante esforços (2,3 e 29). Foi demonstrado que a capacidade de realizar esforço em hipotireoidismo é significativamente menor quando comparada ao eutireoideo (28).

A intolerância ao esforço é melhorada após a normalização dos níveis de TSH com a reposição hormonal. Este fato foi demonstrado neste estudo ao verificar-se uma potência no teste de esforço progressivo significativamente maior após tratamento com L-tiroxina sódica. Esta potência de trabalho aumentada permitiu que todos os indivíduos alcançassem um estágio de esforço a mais no período após tratamento. Assim, a terapia de reposição hormonal poderia ser justificada para reduzir o acúmulo de lactato e, como conseqüência, aumentar a capacidade de realizar atividades em intensidade mais elevadas.

A análise dos resultados das concentrações de lactato e proteína total revelam um limiar de lactato e proteína total salivar deslocado para a direita após o tratamento com L-tiroxina sódica. Este parâmetro corresponde à intensidade máxima de exercício em que ocorre equilíbrio entre a produção e a remoção do lactato e representa um meio bioquímico de avaliação da capacidade aeróbia (30,31).

Houve uma correlação entre as concentrações de lactato sanguíneo e proteína total salivar antes e após o tratamento. Isto sugere que além do lactato a análise da proteína total na saliva para avaliar o exercício físico em portadores de hipotireoidismo pode ser também um indicador de intensidade do esforço. Para reforçar esta nossa hipótese, em outros trabalhos relatou-se altas correlações entre limiar de lactato plasmático com biomarcadores salivares do limiar anaeróbico (Th_{sa}) como por exemplo, a concentração de eletrólitos (Cl^- , K^+ e especialmente Na^+) ou a atividade da amilase ou estes dois fatores combinados (32,14).

No presente estudo a reposição hormonal pode ter causado o aumento nos valores médios de lactato sanguíneo e proteína total salivar, estando de acordo com outro estudo em que se observou o acúmulo de lactato maior nos pacientes com hipotireoidismo subclínico quando comparado com os eutireoidismo durante exercícios dinâmicos de braço (5). Entretanto, todas as

voluntárias deste estudo melhoraram sua tolerância ao esforço. Pode-se sugerir que, quando se analisa estes biomarcadores do esforço em relação a reposição hormonal, ocorra uma maior tolerância ao esforço na presença de acidez metabólica devido a atuação hormonal periférica, promovendo uma mudança no limiar anaeróbio para ambos biomarcadores.

O aumento na concentração da proteína total da saliva observado neste estudo com exercício agudo incremental poderia estar relacionado com a ativação simpática e parasimpática sobre as glândulas salivares que afetam a secreção de proteínas e redução do fluxo salivar respectivamente (33,34,35). Outros estudos também relatam o efeito de exercício incremental sobre o limiar de catecolaminas correlacionado com o limiar de lactato e com outros biomarcadores salivares como eletrólitos e amilase (13).

A atividade da alfa-amilase salivar avaliada neste estudo revelou que no final no ultimo estagio do teste de cada voluntário, antes e após o tratamento com L-tiroxina sódica, houve elevação de sua atividade. Entretanto, a atividade da alfa-amilase reduzia-se após o cinco minutos do teste de esforço. Isto está de acordo com dados que relatam que a atividade da alfa-amilase, via ativação adrenérgica está aumentada em diversas situações como ação de beta-bloqueadores adrenérgicos, estresse físico como o exercício, exposição a ambientes com pressão e temperaturas elevada e estresse psicológico que levam a fadiga mental (16, 18, 36, 19,4). No entanto, quando comparados os voluntários antes e após o tratamento não houve diferença na atividade da alfa-amilase mostrando que o tratamento de L-tiroxina sódica não influenciou esta atividade enzimática quando analisada em uma situação de atividade física.

Neste estudo mostrou-se que após o tratamento com L-tiroxina sódica as concentrações medias de NO na exaustão foram maiores. Podendo ser um dos fatores que permitiram os voluntários aumentarem um estagio no reteste, através de um maior aporte de oxigênio e nutrientes pelo aumento na vasodilatação. A melhora no fluxo sanguíneo periférico está atribuída ao aumento na formação e liberação de NO, em condições basais e após estimulação (37).

O sistema imunológico na performance física pode ser mostrado através da análise de IgA (38). No presente estudo demonstrou-se que houve um

aumento nas concentrações de IgA tanto antes como após o tratamento com L-tiroxina sódica analisando cada voluntário individualmente. Isto está de acordo com dados que mostraram elevação dos níveis de IgA após exercícios agudos realizados em sessão única de treinamento com intensidade moderada a intensa (39,40). Mas comparando-se os dois testes antes e após o tratamento, este aumento não foi diferente, sugerindo que a L-tiroxina não influenciou nos níveis de IgA salivar.

A análise dos biomarcadores IgA e atividade da alfa-amilase não sofreram alterações após o tratamento que indicassem uma melhor adaptação após o exercício ou mesmo melhora no sistema imunológico. Porém, a correlação entre a proteína total salivar e o lactato sanguíneo fornece informações tanto bioquímicas quanto fisiológicas mostrando o estado funcional do hipotireoidismo durante a sessão de exercício após a terapia de reposição hormonal com L-tiroxina sódica podendo assim proporcionar maior tolerância ao esforço físico progressivo. A concentração de óxido nítrico está diretamente relacionada com a intensidade do exercício, sendo liberado em maior proporção após o tratamento com L-tiroxina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro AVB. Avaliação clínica e laboratorial de portadores de hiperlipidemia e hipotireoidismo. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 76: 119-22.
2. Kaminsky P, Klein M, Robin-Lherbier B. A ³¹P NMR study of different hypothyroid states in rat leg muscle. *Am J Physiol.* 1991; 261: 706–712.
3. Kaminsky P, Robin-Lherbier B, Brunotte F. Energetic metabolism in hypothyroid skeletal muscle, as studied by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74: 124–129.
4. Klein I, Ojamaa K. Thyrotoxicosis and the heart. *Endocrinol Metab Clin.* 1998; 27: 51-62.
5. Monzani F, Caraccio N, Siciliano G, Manca L, Murri L, Ferrannini E. Clinical and biochemical features of muscle dysfunction in subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3315-8.
6. Panossian Ag, Oganessian As, Ambartsumian M, Gabrielian Es, Wagner H, Wikman G. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. *Phytomedicine.* 1999; 6: 17-26.
7. Walsh NP, Blannin AK, Clark AM, Cook L, Robson PJ, Gleeson M. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci.* 1999; 17: 129-34.
8. Hiscock N, Pedersen BK. Exercise-induced immunodepression- plasma glutamine is not the link. *J Appl Physiol.* 2002; 93: 813-22.
9. Bishop NC, Walker GJ, Scanlon GA, Richards S, Rogers E. Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38: 513-9.

10. Steerenberg PA, Van Asperen IA, Van Nieuw Amerongen A, Biewenga A, Mol D, Medema GJ. Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105: 305-9.
11. McAllister RM, Laughlin MH. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. *Essays Biochem.* 2006; 42: 119-31.
12. Bodis S, Haregewoin A. Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. *Biochemical and Biophysical research communications.* 1993; 194: 347-350.
13. Chatterton RT Jr, Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol.* 1996; 16: 433-48.
14. Chicharro JL, Lucia A, Pérez M, Vaquero AF, Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Méd.* 1998; 26:17-27.
15. Bishop NC, Blannin AK, Armstrong E, Rickman M, Gleeson M. Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32: 2046-51.
16. Walsh NP, Montague JC, Callow N, Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch Oral Biol.* 2003; 49:149-154.
17. Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis.* 2002; 8: 3-11.

18. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, Ehlert U. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol.* 2005; 55: 333-42.
19. Yamaguchi M, Kanemori T, Kanemaru M, Takai N, Mizuno Y, Yoshida H. Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. *Biosensors and Bioelectronics.* 2004; 20:491-497.
20. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci, Saliva as a diagnostic fluid.* 1993; 694: 72-77.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 1: 248-54.
22. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JBJr 1995 Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. *Methods: A Comp Meth Enz.* 1995; 7: 78-83
23. Silva DA, Gervasio AM, Sopenete MC, Arruda-Chaves E, Arruda LK, Chapman MD, Sung SS, Taketomi EA. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major Dermatophagoides pteronyssinus allergen. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001; 86: 545-50.
24. MacKinnon LT, Jenkins DG. Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25: 678-83.
25. Toler JE. Patterns of genotypic performance over environmental arrays. *Clemson University, US 154f. phd-tesis Biol.* 1990.
26. Graner EA. *Estatística. São Paulo: Melhoramentos.* 1996.

27. Siegel S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil. 1975.
28. Kahaly GJ, Kampmann C, Mohr-Kahaly S. Cardiovascular hemodynamics and exercise tolerance in thyroid disease. *Thyroid*. 2002; 12: 473- 81.
29. Argov Z, Renshaw PF, Boden B, Winkokur A, Bank WJ. Effects of thyroid hormones on skeletal muscle bioenergetics. *J Clin Invest*. 1988; 81:1695– 1701
30. Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med*. 1985; 6: 117-30.
31. Harnish CR, Swensen TC. Methods for estimating the maximal lactate steady state in trained cyclists. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 33: 1052-5.
32. Calvo F, Chicharro, JL, Bandrés F, Lucia A, Peres M, Álvares J, Mojares LL, Vaquero Af, Legido JC. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. *Can. J. Appl. Physiol*. 1977; 22: 553-561.
33. Denniss AR, Young JA. Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin, VIP, GIP and other enterohormones. *Pflugers Arch*. 1978; 25: 73-80.
34. Emmelin N. Nerve interactions in salivary glands. *J Dent Res*. 1987; 66: 509-17.
35. Nederfors T, Dahlöf C, Twetman S. Effects of beta-adrenoreceptor antagonists atenolol and propranolol on human unstimulated whole saliva flow rate and protein composition. *Scand J Dent Res*. 1994;102: 235-7.
36. Van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology*. 2006; 31: 137-41.

37. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 1998; 98: 2709-2715.
38. Krzywkowski K, Petersen EW, Ostrowski K, Link-Amster H, Boza J, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK. Effect of glutamine and protein supplementation on exercise-induced decreases in salivary IgA. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 832-8.
39. Sakamoto Y, Ueki S, Shimanuki H, Kasai T, Takato J, Ozaki H, Kawakami Y, Haga H. Effects of low intensity physical exercise on acute changes in resting saliva secretor IgA levels in the elderly. *Geriatrics and Gerontology Internac*. 2005; 5: 202-206.
40. Miletic ID, Schiffman SS, Miletic VD, Sattely-Miller EA. Salivary IgA secretion rate in young and elderly persons. *Physiol Behav*. 1996; 60: 243-8.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. The graphs show absolute average values (standard deviation SD) of the TSH concentration before (TSH B) and after (TSH A) in $m\mu/dL$ (1), and FT4 before (FT4 B) and after (FT4 A) in $m\mu/dL$ (2). There was a difference before and after the treatment only for TSH for one $p < 0.05$ (*).

Fig. 2. graphs show absolute average values (standard deviation SD) of the total salivary protein concentration (C) in mg/mL , the blood lactate concentration (E) in $mmol/L$ related to the stages pre (Lac B, Prot B) and post (Lac A, Prot A) treatment. There was a stage increase after treatment and a change in the lactate \downarrow and protein \downarrow thresholds.

Fig. 3. Relationship between the lactate, total salivary protein thresholds expressed in watts (W) before (B) and after (A) treatment with L-Thyroxine Sodium. There was an increase both in the lactate and in the protein threshold to one $p < 0.05$.

Fig. 4. The graphs show absolute average values (standard deviation SD), average total salivary protein concentration in mg/mL , average blood lactate concentration in $mmol/L$ before (B) and after (A) treatment. There was a difference before and after treatment in the average protein concentrations ($p < 0.05$ *).

Fig. 5. The graphs show absolute average values (standard deviation SD) of the Nitrite concentration in μM (C), blood lactate concentration in $mmol/L$ (A), IgA in mg/dL (E) salivary alpha-amylase activity in U/mL (D), total salivary protein concentration in mg/mL (B) and heart rate in bpm (F) before the test (RES), at the end of the test (EXH), and five minutes after the test (REC). The symbols on the columns indicate a difference before the test (#) and at the end of the test (*) as compared to the tests pre- and post-treatment, for a $p < 0.05$ (situation A, white column against the black column). Differences are also shown in the tests separately, regardless of treatment: symbol (+) indicates a difference between the Before, Final and Post ($p < 0.05$). Symbol (▪) refers to the difference between the Final and the Post ($p < 0.05$) (situation B, white column against the white column and the black column against the black column) when compared to each other.

ILUSTRAÇÕES

TABLE 1: Descriptive analysis of the inflection of the straight line (breaking points) before and after the treatment with L-tiroxina.

	<i>Total salivary protein (mg/dL)</i>	Lactate (mmol/L)
Breaking points before	52,5±11,3	73,12±12,5
Breaking points after	63,75±10,6	75±16
Difference statistics	P<0,01	P<0,007

Mean SE± the total salivary protein end lactate blood.

Figure 1:

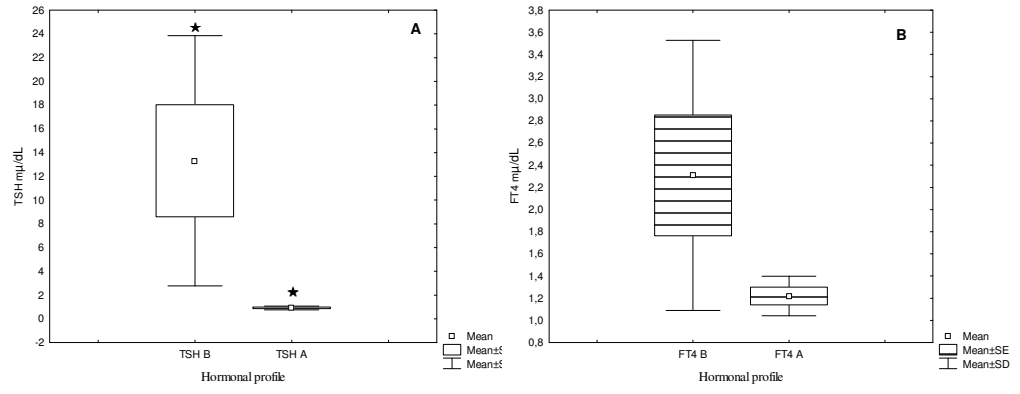


Figure 2:

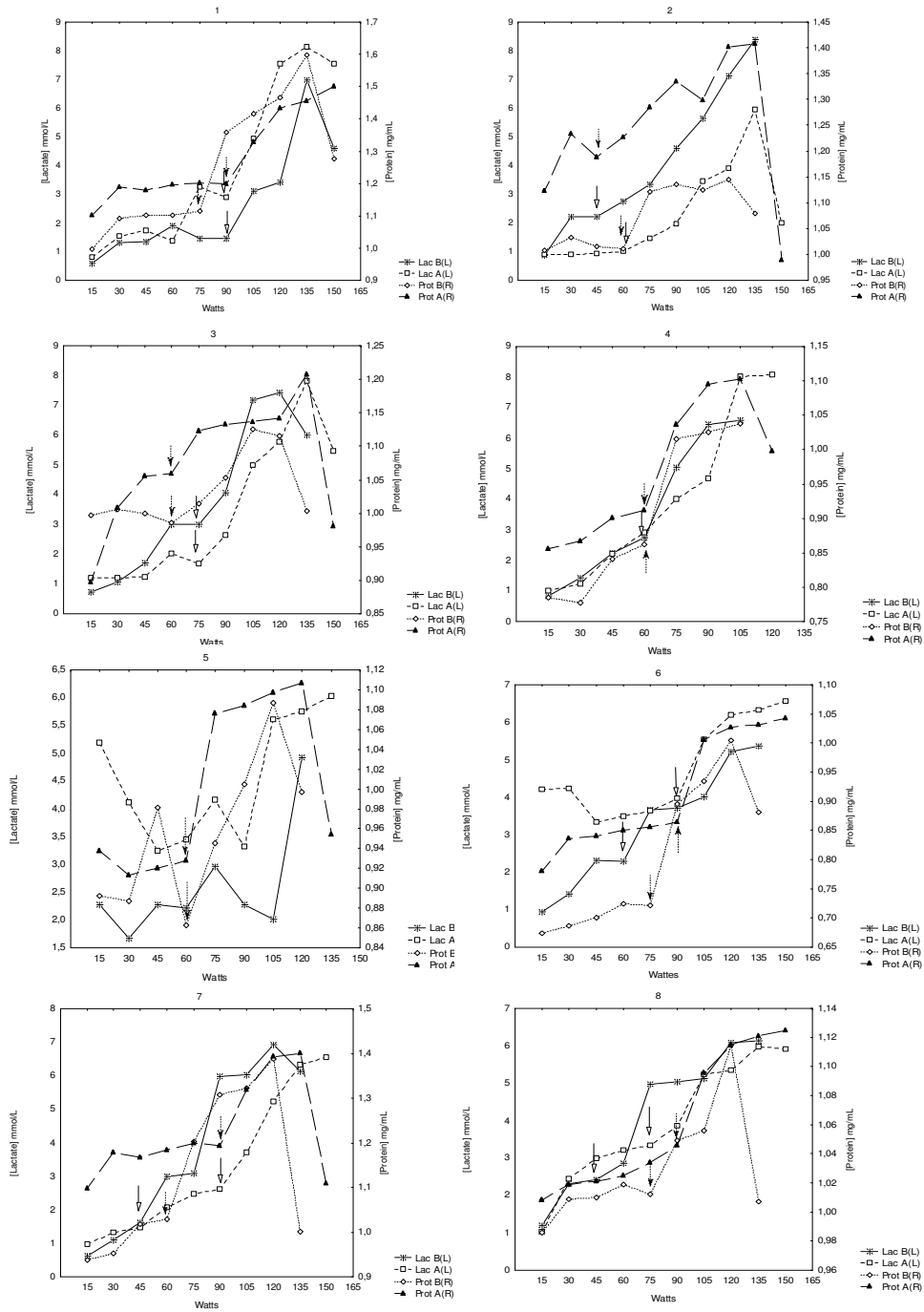


Figure 3:

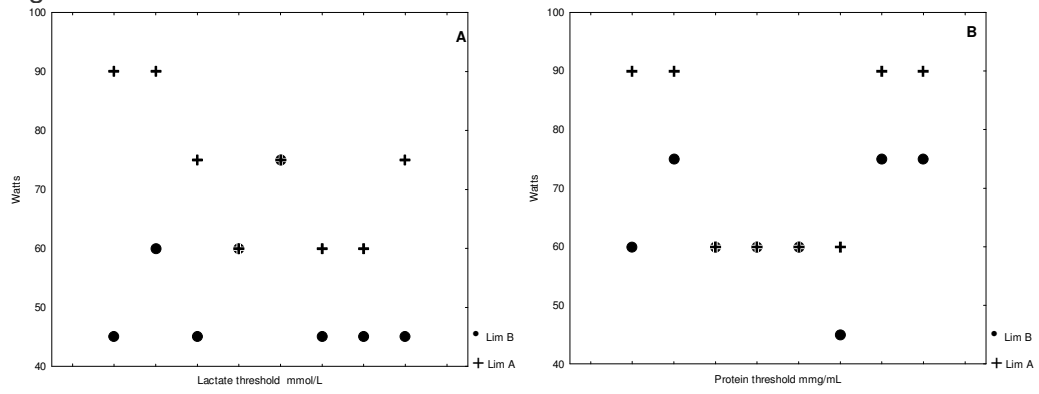


Figure 4:

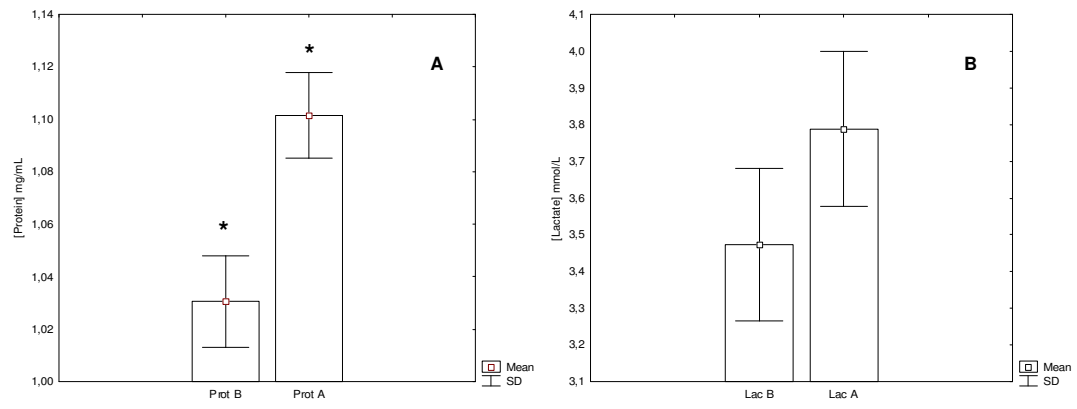


Figure 5

