



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

## **Efeito da competição sobre biomarcadores salivares de estresse físico e oxidativo em jogadores de futebol**

**Aluno:** Leandro Cesar Domingos Galdino

**Orientadora:** Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

**UBERLÂNDIA - MG**

**2014**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Efeito da competição sobre biomarcadores salivares de estresse  
físico e oxidativo em jogadores de futebol**

Leandro Cezar Domingos Galdino

**Orientador:** Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para a obtenção do título  
de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)

Uberlândia - MG  
Julho – 2014

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

G149e Galdino, Leandro Cezar Domingos, 1987-  
2014 Efeito da competição sobre biomarcadores salivares de estresse físico e oxidativo em jogadores de futebol / Leandro Cezar Domingos Galdino. - 2014.  
75 f. : il.

Orientadora: Françoise Vasconcelos Botelho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Competição (Esporte) - Teses. 3. Saliva - Teses. 4. Stress oxidativo - Teses. I. Botelho, Françoise Vasconcelos. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

**Efeito da competição sobre biomarcadores salivares de estresse  
físico e oxidativo em jogadores de futebol**

**ALUNO: Leandro Cesar Domingos Galdino**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente: Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho**

**Examinadores:**

**Profa. Dra. Verônica Salerno Pinto (UFRJ)**

**Prof.Dr. Fábio Yuzo Nakamura (UEL)**

**Data da Defesa: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_**

As sugestões da comissão examinadora e as normas PPGGB para o formato da dissertação serão contempladas

---

Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

*Dedico este trabalho a meu pai e minha mãe, que*

*me concederam uma base forte para enfrentar os  
desafios com dedicação, humildade e respeito.*

*Dedico também aos meus irmãos pelo apoio e*

*acolhimento em suas casas desde o início deste  
ciclo. Aos amigos, familiares e a todos que, de*

*alguma forma, contribuíram para que este  
projeto fosse concretizado.*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus pela saúde, força e coragem para enfrentar esse desafio.
- A professora doutora Françoise Vasconcelos Botelho, por me aceitar como seu aluno e por todo processo de orientação e ensinamentos. Agradeço principalmente pelas cobranças, foi a partir delas que me tornei um estudante mais criterioso e engajado na busca do conhecimento.
- Ao Professor Dr. Foued Salmen Espindola por abrir as portas do seu laboratório e por todos os ensinamentos.
- À minha companheira de Mestrado, Zulmária Rezende Ramos de Freitas, por compartilhar e superar os momentos de angústia, choro, dificuldades, mas principalmente por acreditar que iríamos conseguir superar esse desafio. Com você ao meu lado, o caminho do conhecimento se tornou mais curto, menos doloroso, obrigado por essa amizade e companheirismo.
- A todos os membros do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, por abrirem as portas para novas oportunidades de aprendizado.
- A todos os atletas e comissão técnica da equipe de Futebol Santa Mônica – UFU, por colaborarem para que esse projeto se tornasse possível.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) pela oportunidade de crescimento.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <i>APRESENTAÇÃO</i> .....   | 1  |
| <i>INTRODUCTION</i> .....   | 4  |
| <i>CAPÍTULO 1</i> .....   | 7  |
| <i>Fundamentação Teórica</i> .....  | 7  |
| 1 - FUTEBOL: Contexto histórico, características metabólicas e fisiológicas.....        | 8  |
| 2 - ESTRESSE E COMPETIÇÃO.....  | 9  |
| 2.1 - MARCADORES DE ESTRESSE (ATIVIDADE AUTÔNOMA) .....                                 | 11 |
| 2.1.1 - Amilase salivar.....  | 11 |
| 2.1.2 - Cortisol .....  | 12 |
| 2.1.3 Concentração de Proteína total (PT) .....   | 13 |
| 3 - ESTRESSE OXIDATIVO E FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS .....                            | 14 |
| 3.1 - Estresse oxidativo e exercício.....   | 17 |
| 3.2 - Marcadores de estresse oxidativo .....  | 20 |
| 4 – SALIVA.....   | 20 |
| 4.1 Composição, inervação e secreção .....  | 20 |
| 4.2 - Saliva como um fluido para diagnóstico .....                                      | 23 |
| 4.3 - Saliva e exercício físico: possibilidades futuras .....                           | 26 |
| 5 - Referências .....   | 27 |
| <i>CAPÍTULO 2</i> .....   | 35 |
| 1 – Introdução .....  | 39 |
| 2 – Métodos.....  | 40 |
| 2.1 Sujeitos .....  | 41 |
| 2.2 Avaliação da composição corporal, estatura e características gerais da amostra..... | 41 |
| 2.3 Procedimentos do treinamento .....  | 42 |
| 2.4 Delineamento experimental - Procedimentos da Competição .....                       | 42 |
| 2.5 Coleta e processamento da saliva .....  | 43 |
| 2.6 Análise do fluxo salivar .....  | 44 |
| 2.7 Dosagem da concentração total de proteínas na saliva.....                           | 44 |
| 2.8 Análise da atividade de Alfa-Aamilase .....   | 44 |
| 2.9 Determinação da concentração de cortisol .....                                      | 45 |
| 3 – Técnicas de medida de estresse oxidativo.....                                       | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Peroxidação lipídica .....  | 45 |
| 3.2 Determinação da atividade da catalase .....   | 46 |
| 3.3 Determinação da capacidade antioxidante total.....  | 46 |
| 4 Estatística.....  | 47 |
| 5 Resultados .....  | 47 |
| 5.1 Efeito da competição no fluxo salivar, proteína total, atividade da amilase<br>salivar e cortisol salivar ..... | 47 |
| 5.2 Efeito da competição sobre marcadores de estresse oxidativo salivares   | 51 |
| 6 – Discussão.....  | 54 |
| 7 – Conclusões.....   | 58 |
| 8 – Referências .....   | 59 |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

**Figura 1:** Procedimento da coleta de saliva em seus respectivos momentos

**Figura 2.** Fluxo salivar em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ );  $n=14$ .

**Figura 3.** Atividade da alfa-amilase salivar em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ );  $n=14$ .

**Figura 4.** Taxa secreção de proteínas totais em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ ); # Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ );  $n=14$ .

**Figura 5.** Concentração de cortisol salivar em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ );  $n=14$ .

**Figura 6.** Concentrações salivares de produtos de peroxidação lipídica em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=14$ .

**Figura 7.** Avaliação da atividade antioxidante total da saliva em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso

entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* Diferenças significativas (Teste de Anova *oneway*,  $P<0.05$ );  $n=14$

**Figura 8.** Avaliação da atividade da enzima catalase em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=14$ .

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1:** Comparação das características entre plasma e saliva

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Idade, altura, massa, massa muscular, percentual de gordura, índice de massa corporal (IMC) e  $\text{VO}_{2\text{Max}}$  dos participantes. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (n=14).

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$  – Microlitros

ACTH – Hormônio adrenocorticotrópico (*adrenocorticotropic hormone*)

BHT – hidroxitolueno butilado (*Butylated hydroxytoluene*)

$\text{Ca}^{2+}$  – Cálcio

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

Cat – Catalase

$\text{Cl}^-$  – Cloreto

CRH – Hormônio liberador de corticotropina (*corticotropin-releasing hormone*)

$\text{Fe}^{+2}$  – Óxido Ferroso

$\text{Fe}^{+3}$  – Óxido Férrico

FIFA – Federação Internacional de Futebol (Fédération Internationale de Football Association)

FRAP – Habilidade do plasma em reduzir ferro (The ferric reducing ability of plasma)

GPX – Glutationa peroxidase

GSH – Glutationa reduzida

$\text{H}_2\text{O}$  – Água

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogênio

HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (hypothalamic-pituitary adreno-cortical)

IgA - Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

Km – quilômetros

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MDA – Malondialdeído

$\text{Na}^+$  – Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-KB – Fator nuclear kappa beta (Nuclear factor kappa beta)

$\text{NO}^\cdot$  – Óxido nítrico

$\text{O}_2$  – Oxigênio

$\text{O}_2^{\cdot\cdot}$  – ânion superóxido

$\text{OH}^\cdot$  – radical hidroxila

PKA – Proteína kinase

ROH – Álcool

RONs – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (reactive oxygen and nitrogen species)

ROOH – Hidroperóxido orgânico

ROS – Espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species)

sAA – Alfa-amilase salivar

SNA – Sistema nervoso autônomo (autonomic nervous system)

SNP – Sistema nervoso Parassimpático (parasympathetic nervous system)

SNS – Sistema nervoso simpático (sympathetic nervous system)

SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric acid reactive substances)

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

VO<sub>2max</sub> – Volume Máximo de oxigênio

# ***APRESENTAÇÃO***

O exercício físico é considerado um agente promotor de estresse e alterações no balanço redox, tais alterações dependem principalmente do tipo, intensidade e duração dos estímulos ou do nível de condicionamento do indivíduo. Nesse sentido, a competição esportiva pode ser considerada uma agente promotora de estresse em várias dimensões, desde psicológicas, com alterações nos sentimentos que variam de medo, ansiedade e nervosismo até alterações fisiológicas nos marcadores de atividade autônoma e de estresse oxidativo.

Já está bem evidenciado na literatura que a competição gera alterações no sistema nervoso autônomo tanto antes da competição, como durante e após o período de competição. Além disso, o exercício físico gera aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e aumento das enzimas antioxidantes que compõem o sistema de defesa do organismo. Porém, quando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio não é acompanhado por uma produção antioxidante eficiente ocorre a geração do estresse oxidativo, responsável por vários processos celulares, podendo ocasionar danos às estruturas protéicas, lipídicas e aos ácidos nucléicos.

O futebol é considerado o esporte mais popular do mundo, é amplamente vivenciado pelo brasileiro em seu cotidiano, seja ditado pela competição racionalizada, seja impregnado pelo sentimento lúdico ou utilizado pelo Estado atuando na coesão social, assim, podemos dizer que o futebol desempenha um papel central na nossa cultura e também na cultura mundial.

Contudo, apesar do futebol ser o esporte mais praticado no Brasil, podemos dizer que existem poucas pesquisas de cunho científico a respeito dessa modalidade esportiva. Portanto, temos certo que a compreensão acerca das variáveis fisiológicas e bioquímicas do jogador de futebol, em período de competição, pode contribuir para um melhor entendimento sobre o esporte.

Para uma melhor compreensão sobre variáveis fisiológicas e bioquímicas do jogador de futebol, estratégias como a utilização da saliva como biofluído para analisar possíveis alterações são bem vistas aos olhos dos treinadores e preparadores físicos, uma vez que são análises rápidas, não

invasivas, que podem ser feitas no próprio ambiente de treinamento e competição.

Nesse sentido, monitorar marcadores biológicos de estresse (atividade autônoma) e alterações no balanço redox (estresse oxidativo) durante um período de competição se faz necessário, principalmente para se fazer um bom planejamento das atividades a serem desenvolvidas, procurando assim um melhor rendimento dos atletas nas competições alvos e também evitar futuras lesões.

O presente estudo foi delineado com objetivo de avaliar o efeito da competição sobre marcadores de estresse físico (atividade autônoma) e marcadores do balanço redox (estresse oxidativo), utilizando a saliva de jogadores de futebol antes e após os jogos do Campeonato Brasileiro Universitário de Futebol realizado na Cidade de Uberlândia – MG.

A apresentação da dissertação foi dividida em capítulos, conforme as normas do Instituto de Genética e Bioquímica e, a formatação seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT. No capítulo 1, é apresentada uma revisão bibliográfica do assunto, incluindo tópicos referentes ao contexto histórico, características fisiológicas e metabólicas do futebol, competição e estresse, marcadores de estresse, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a relação do exercício físico na produção do estresse oxidativo. A saliva como biofluído promissor na busca de biomarcadores de estresse e balanço redox. No capítulo 2, mostramos os métodos utilizados, estatística, os resultados obtidos e a discussão sob a forma de um artigo, que será submetido a uma revista científica indexada.

# ***INTRODUCTION***

Exercise promotes stress and changes in redox balance. Such changes depend on the individual's fitness level, type, intensity and duration of the exercise. The sports competition can be considered a promoter agent of stress in different ways: psychological (changes in feelings ranging from fear, anxiety and nervous ness) and physiological (changes in markers of autonomous activity and oxidative stress).

The literature shows that competition promotes changes in the autonomic nervous system before the competition, during and after the competition period. In addition, exercise leads to increased production of reactive oxygen species and increase in antioxidant enzymes that make up the body's defense system. But when the increased production of reactive oxygen species is not accompanied by an efficient antioxidant production oxidative stress occurs. Oxidative stress is responsible for several cellular processes and may cause damage to protein structure, lipid and nucleic acids.

Football is considered the most popular sport in the world. However, we can say that there are few studies of scientific nature about this sport. It's important to understand the physiological and biochemical variables soccer players have in competition period, because this findings can contribute to a better understanding of the sport.

To search about physiological and biochemical variables in soccer players, some strategies as the use of saliva as biofluid are important to facilitate the analyzes. The use of saliva is well regarded in the eyes of coaches and trainers, as they are quick analysis, non-invasive, which can be made in own training and competition environment.

Follow biological markers of stress (self-employment) and changes in redox balance (oxidative stress) during a period of competition is important to plan better the activities to be developed, looking for a better performance of athletes targets in competitions and also prevent future lesions.

The present study was designed to evaluate the effect of competition on physical stress markers (self-employment) and markers of redox balance (oxidative stress) using saliva soccer players before and after the games of the Brazilian College Football Championship.

The presentation of the dissertation was divided into chapters according to the standards of the Institute of Genetics and Biochemistry and formatting followed the rules of the Brazilian Technical Standards Association, ABNT. In Chapter 1, we present a literature review of the subject. In chapter 2 is in the form of an article to be submitted to an indexed journal.

# **CAPÍTULO 1**

*Fundamentação Teórica*

## **1 - FUTEBOL: Contexto histórico, características metabólicas e fisiológicas.**

Segundo a FIFA (2014) o futebol é considerado o esporte mais popular do mundo. É praticado em centenas de países devido principalmente a seu jeito simples de jogar. São necessários apenas uma bola, equipes de jogadores e, em qualquer espaço, seja na rua, no clube, escola, campo de grama, quadra de cimento, pode-se jogar o futebol.

Os Jogos oficiais e amadores de futebol são caracterizados pela disputa de duas equipes, cada equipe com 11 jogadores. O árbitro principal é o responsável pela condução da partida e aplicação das regras do jogo. A partida de futebol é jogada em um gramado retangular, com uma baliza (traves) em cada lado do campo. O objetivo do jogo é deslocar a bola através do campo e colocá-la dentro da baliza do adversário, assim, ocorre o gol, considerado o momento mágico do futebol. A equipe que conseguir efetuar mais gols ao término da partida é considerada a vencedora.

O futebol, por sua condição específica, envolve um grupo elevado de atletas e é disputado em diferentes condições climáticas, com alternativas técnicas, táticas e físicas variadas, constituindo, portanto, um desporto de elevada complexidade de interpretação e estudo (Fonseca et al., 2007).

É um esporte com características intermitentes, de intensidade extenuante com ênfase nos componentes de força, velocidade e resistência (Gorostiaga et al., 2009). Devido ao longo período de uma partida de futebol, grande parte da sua liberação de energia provém do metabolismo aeróbio (Bangsbo, 1994), além disso, durante um jogo, os atletas percorrem em média 10km em uma intensidade próxima ao limiar anaeróbio ou 80-90% da frequência cardíaca máxima (Bangsbo et al., 1991; Helgerud et al., 2001; Reilly, 1997). Alta intensidade e sobrecargas intermitentes de exercício estimulam as vias metabólicas da glicólise anaeróbia. A contribuição desse metabolismo energético para com o futebol tem sido examinada em vários estudos, principalmente por meio da determinação da concentração de lactato sanguíneo (Helgerud et al., 2001).

Embora o futebol apresente predominância aeróbia, a aptidão anaeróbia demonstrada em ações de potência muscular, está relacionada com atividades decisivas das partidas como *sprints*, saltos, chutes e cabeceios (Abrantes et al., 2004) (Wragg et al., 2000).

No que diz respeito aos movimentos característicos num jogo de futebol, tem sido observado que um *sprint* ocorre em média a cada 90s (Reilly & Thomas, 1976) com durações entre 2s e 4s (Spencer et al., 2005). Além disso, os *sprints* constituem 1 a 11% da distância total percorrida na partida, correspondendo de 0.5 a 3% do tempo do jogo (Hoff and Helgerud, 2004).

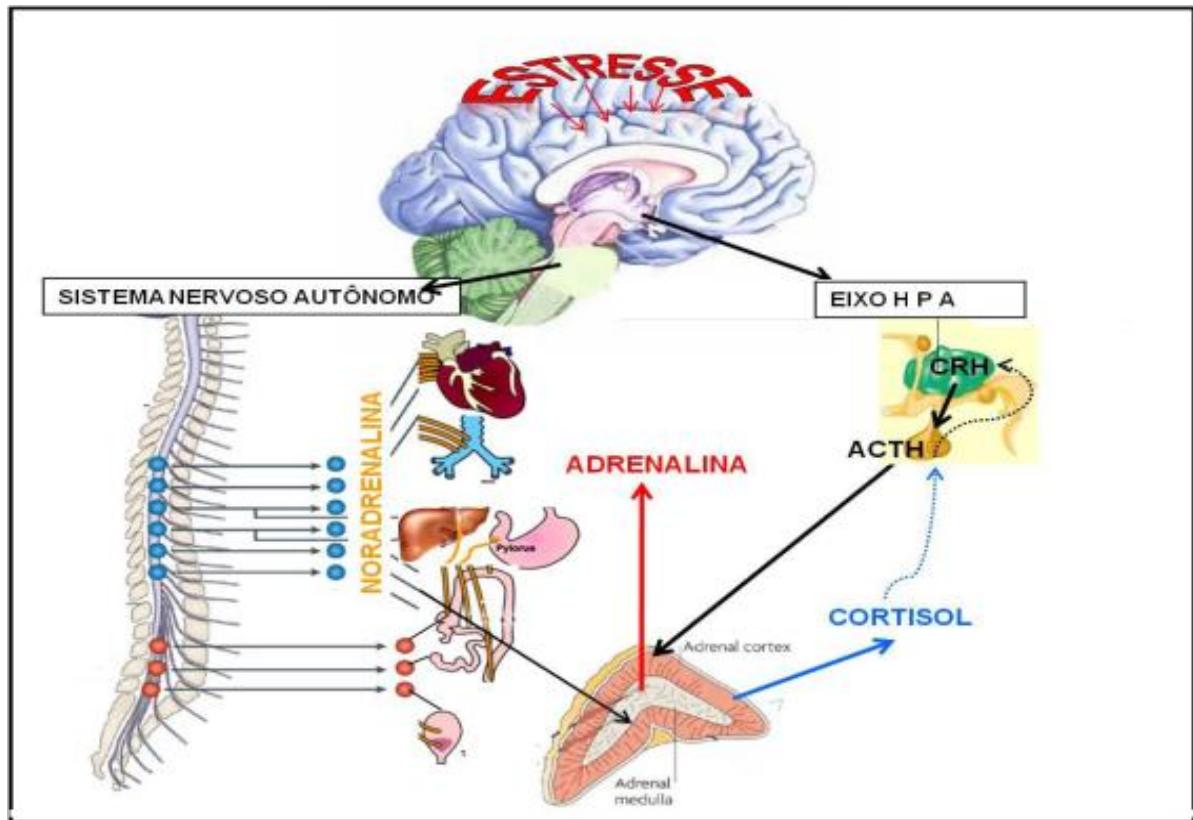
## 2 - ESTRESSE E COMPETIÇÃO

O estresse pode ser definido como um estado antecipado ou real de ameaça ao equilíbrio do organismo e a reação do mesmo, que visa restabelecer o equilíbrio através de um complexo conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais. A manutenção deste estado de equilíbrio, homeostase, é essencial para a vida e é constantemente desafiado por forças internas ou externas (Ulrich-Lai and Herman, 2009).

As respostas ao estresse são mediadas por componentes do sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com ações complementares através de todo o organismo (Diaz et al., 2012). O SNA é o responsável pela resposta mais imediata à exposição ao estressor. Suas duas partes, simpático e parassimpático, provocam alterações rápidas nos estados fisiológicos através da inervação dos órgãos alvos (Iversen et al., 2000).

Já o eixo HPA quando ativado por agentes estressores, resulta na elevação dos níveis de glicocorticóides circulantes. A exposição ao estressor ativa os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo que secretam hormônios liberadores, como o hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin-releasing hormone* – CRH), esse hormônio vai agir na hipófise anterior promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropic hormone* - ACTH) que, por sua vez, vai atuar no córtex da

glândula adrenal iniciando a síntese e liberação de glicocorticóides, como, por exemplo, do cortisol em humanos (Ulrich-Lai and Herman, 2009) (**Figura 1**).



**Figura 1. Sistema nervoso autônomo e eixo HPA, sistemas responsáveis pela resposta ao estresse. Fisiologia do estresse e sua influência na saúde. Disponível em:<http://rnp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/Fisiologia%20do%20estresse.pdf>.**

Dentre os vários agentes causadores de estresse, pode-se dizer que o esporte é um dos principais agentes estressores. Neste sentido, o estresse associado à competição esportiva é um tópico altamente relevante, relacionado principalmente ao desempenho de atletas profissionais e amadores, submetidos aos rigores de treinamento e às demandas de contextos competitivos (Hanton, Thomas & Mellalieu, 2008).

A competição esportiva profissional e amadora oferece um cenário único para avaliar as respostas ao estresse, pois estes tipos de competições envolvem avaliações e comparações sociais, além de ser uma importante fonte de pressão para os atletas (Gucciardi and Dimmock, 2008). Outro fator interessante de avaliações em competições esportivas se deve ao fato das

mesmas serem altamente organizadas, os critérios de desempenho são bem claros e os atletas são avaliados em ambientes de situações reais (Diaz et al., 2012).

Já está bem evidenciado na literatura que a competição gera alterações no sistema nervoso autônomo tanto antes da competição (Alix-Sy et al., 2008), como durante e após o período de competição (Passelergue and Lac, 1999). Essas variações na atividade autônoma estão relacionadas principalmente com a concorrência e as demandas do contexto competitivo. Neste sentido, os atletas experimentam diversos sentimentos que variam de ansiedade, insegurança, medo, agressividade, vigor, sendo que esses sentimentos dependem principalmente da experiência do atleta, da competição que será disputada e da forma que o atleta lida com o estresse.

## **2.1 - MARCADORES DE ESTRESSE (ATIVIDADE AUTÔNOMA)**

### **2.1.1 - Amilase salivar**

Desde que alguns estudos farmacológicos demonstraram uma ligação direta entre a atividade da alfa amilase salivar (AAs) e o Sistema Nervoso Simpático (SNS) (van Stegeren et al., 2006), a determinação da mesma, sob condições físicas e psicológicas estressantes, é cada vez mais utilizada em estudos biocomportamentais. Baseados nas observações de (Gilman et al., 1979), de que a AAs poderia ser um indicador de estresse devido à sua liberação ser regulada pelo SNS, estudos dirigidos por (Chatterton et al., 1996) mostraram uma correlação positiva entre a AAs e norepinefrina, no plasma, durante exercício físico.

Sabe-se que a secreção de  $\alpha$ -amilase salivar é influenciada pela regulação adrenérgica do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Granger et al., 2007). Diante disso, o exercício pode afetar os níveis de  $\alpha$ -amilase salivar (Koibuchi and Suzuki, 2014).

A utilização da atividade da alfa-amilase como marcador de estresse físico foi citada na literatura por pesquisadores espanhóis que observaram o comportamento da atividade da alfa-amilase em 12 jovens bem treinados em

ciclo ergômetro com incremento de 25 watts até a exaustão. Eles observaram que, nos instantes que precedia a exaustão dos voluntários, a atividade da alfa-amilase salivar aumentava na mesma proporção que o lactato sanguíneo; sendo assim, a mensuração da atividade enzimática da amilase salivar, poderia ser um novo método para avaliação da *performance* no exercício (Chicharro et al., 1999).

Em estudo realizado por Bishop et al. (2006), onze homens treinados apresentaram aumento da atividade da alfa-amilase após exercício em bicicleta ergométrica a 70% do  $VO_2$  pico com duração de 90 minutos. Fortes e Whitham (2011) também demonstraram aumento da atividade da alfa-amilase quando avaliaram homens treinados em duas intensidades (50 e 70 %  $VO_2$  max/30 min) de corrida. Por outro lado, também foi demonstrado que embora a atividade da alfa-amilase tenha aumentado em corredores treinados, após 2h de corrida a 75%  $VO_2$  max não houve diferença significativa entre os momentos pré e pós corrida na atividade enzimática (Costa et al., 2012).

No que diz respeito à atividade da alfa-amilase antes e após períodos de competição existe apenas dois estudos, um envolvendo *Taekwondo* (Chiodo et al., 2011) e o outro envolvendo natação (Diaz et al., 2012). No primeiro estudo dezesseis atletas de *taekwondo*, faixa preta, participaram de uma competição oficial, que consistiu em 3 *rounds* de 2 minutos, com intervalo de 1 minuto. A atividade da alfa-amilase aumentou em 115% em relação aos valores pré-competição. No segundo estudo (Diaz et al., 2012), verificou aumento nas concentrações de alfa-amilase após uma competição de natação. Assim, o estresse físico e psicológico contribuem para o aumento das concentrações de  $\alpha$ -amilase.

### **2.1.2 - Cortisol**

O cortisol é um hormônio glicocorticoide frequentemente usado como indicador de estresse de treinamento agudo e crônico (Drucker and New, 1987). Esse hormônio relaciona-se com uma variedade de funções fisiológicas de comportamento e cognitivas, como por exemplo, a depressão do sistema imune (Martinac et al., 2014), a regulação do metabolismo da glicose e do

metabolismo de gorduras (Shafer et al., 2013), alteração de humor e prejuízo na formação e na consolidação da memória em resposta às circunstâncias de estresse crônico (Di Corrado et al., 2014).

Tradicionalmente, a avaliação do cortisol mostrou-se um método útil para verificar a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) relacionado à resposta ao estresse (Kirschbaum and Hellhammer, 1994). O cortisol livre ou biologicamente ativo, por difusão passiva, pode ser transferido para a saliva, além disso, apresenta a correlação entre nos níveis de cortisol plasmático ou salivar (Vining et al., 1983).

Em situações de estresse e exercício físico provavelmente o cortisol é o hormônio que mais sofre alterações (Passelergue and Lac, 1999) e, devido a diferenças nos níveis de circulação frente a diferentes formas de exercício, o cortisol tem sido utilizado para determinar o estresse fisiológico imposto durante uma única e várias sessões de exercício (Moreira et al., 2009).

### **2.1.3 Concentração de Proteína total (PT)**

Biomarcadores presentes na saliva podem monitorar as alterações decorrentes do exercício físico. A concentração de proteína total salivar sofre alterações durante o exercício físico em indivíduos jovens, além disso, a concentração de proteína total da saliva apresenta o mesmo comportamento que o lactato, podendo também ser um parâmetro de análise do Limiar salivar (LAS) (Oliveira et al., 2005).

Steerenberg et.al (1997) revelaram alterações tanto na concentração de proteína total e IgA na saliva em triatletas após competição. Os níveis de proteína total no decorrer da competição aumentaram significativamente ao final da competição em comparação aos níveis iniciais. Resultados similares foram obtidos num trabalho dinamarquês que utilizou onze atletas de ciclismo que exercitaram por 2 horas, em sessões de exercício, em dias alternados (Krzywkowssky, 2001). Eles avaliaram, na saliva, as concentrações de proteína total e verificaram que as mesmas mantiveram-se elevadas ao final do exercício, mas, foram reduzidas para valores próximos aos níveis basais duas horas após o término do exercício.

### 3 - ESTRESSE OXIDATIVO E FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

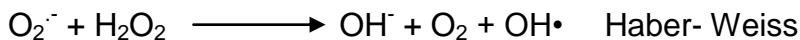
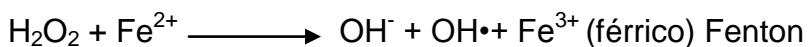
O termo estresse oxidativo foi definido pela primeira vez em 1985 e significa “um distúrbio entre o balanço pró-oxidante e antioxidante, a favor do primeiro” (Sies and Cadenas, 1985).

Segundo (Halliwell and Cross, 1994) o estresse oxidativo é considerado uma condição na qual o delicado equilíbrio entre a produção de radicais livre e sua subsequente melhoria, através do sistema de defesa antioxidante fica inclinado a favor do aumento da produção dos radicais livres. Num esforço para aperfeiçoar o sentido de estresse oxidativo, tem sido sugerido que este termo deve ser redefinido como "uma perturbação da sinalização redox" e de controle (Jones, 2006).

A produção ou a formação de radicais livres *in vivo* é iniciada pelo consumo de oxigênio molecular, o qual, devido à sua estrutura é, na verdade, em si, uma espécie radicalar (Halliwell and Cross, 1994). Um radical livre é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell, 1991). Embora exista um grande número de radicais livres (átomos de hidrogênio, íons de metais de transição, radicais centrados no carbono e enxofre), os que são derivados a partir de oxigênio e/ ou nitrogênio, representam a classe mais importante dos radicais gerados em sistemas vivos (Miller et al., 1990). Ambos os radicais, derivados do oxigênio e nitrogênio, são referidos como (RONS) espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Valko et al., 2007).

Os agentes oxidantes produzidos nos músculos esqueléticos são derivados a partir de duas moléculas-mãe, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico ( $NO^-$ ) (Powers and Jackson, 2008). Estima-se que 0,1 a 4% do oxigênio possam sofrer redução univaleente e ser convertido ao ânion superóxido através do complexo I e III da cadeia respiratória. Os ânions superóxidos são dismutados pela enzima superóxido dismutase (SOD), nas células, para formar peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e outros oxidantes de baixo peso molecular situado na cascata produtora de espécies reativas (Asmus et al., 2000). O superóxido pode reduzir o  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  facilitando a produção do

radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). O conjunto de reações entre o peróxido de hidrogênio, superóxido e ferro é chamada reação de Haber-Weiss(Stohs and Bagchi, 1995) - esquema abaixo:



Outras formas de produção de espécies reativas de oxigênio são produzidas através da enzima xantina oxidase (Zweier et al., 1988) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, esta por sua vez gera superóxido através da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular (Halliwell et al., 2007). A partir da oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos, metabolização de xenobióticos por enzimas microssomais P450 (Beckman and Ames, 1998), leucócitos (contra micro-organismos invasores) (Segal, 2005), ciclooxygenases, lipoxigenases, hemoglobina, mioglobina, epinefrina, dopamina e de açúcares (Hermes-lima, 2004) também podem produzir espécies reativas de oxigênio.

Pelo fato dos radicais livres serem potencialmente danosos, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante, responsável pela proteção das células contra o excesso de produção de ROS. Tais defesas antioxidantes (enzimático e não enzimático), têm como função inibir e/ou atenuar os danos provocados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicais.

O sistema de defesa enzimático é constituído pelas seguintes enzimas: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutationa Peroxidase (GPx). A SOD foi descoberta em 1969 por (McCord and Fridovich, 1969) e forma a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido, tem a função de catalisar a formação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ). A Catalase (CAT) serve para várias funções bioquímicas, mas o objetivo principal da CAT é catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água (H<sub>2</sub>O) e oxigênio (O<sub>2</sub>) (Powers and Jackson, 2008). A glutationa peroxidase (GPX) catalisa a redução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água (H<sub>2</sub>O) usando a glutationa reduzida (GSH) como doadora de elétrons ou catalisa a redução do hidroperóxido orgânico (ROOH) em álcool (ROH) (Bjornstedt et al., 1994).

O sistema de defesa não-enzimático inclui, os compostos antioxidantes de origem dietética, como o ácido ascórbico (vitamina C), o α-tocoferol e β-caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (Prasad et al., 2007). A glutationa (GSH) é o antioxidante não-enzimático mais importante nas fibras musculares, tem como funções servir de substrato para a enzima GPX eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reage diretamente com alguns radicais e também na redução de outros antioxidantes, como por exemplo, a vitamina E (Powers and Jackson, 2008).

Em níveis basais a produção e remoção de RONS ocorrem constantemente, podendo gerar efeitos positivos e negativos sobre a função fisiológica (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009). Este delicado equilíbrio entre produção de radicais livres e defesas antioxidantes serve para determinar o estado redox intracelular que, por sua vez, desempenha um papel chave na otimização da função celular (Allen and Tresini, 2000).

As vias de sinalização celular dos mamíferos são sensíveis ao ambiente redox intracelular, podendo serem ativadas pelo estresse oxidativo (Ji et al., 2006). Diante disso, distúrbios transitórios no equilíbrio redox, levando a um ambiente mais oxidante, pode ocorrer via aumento produção de RONS e ou diminuição das defesas antioxidantes, e parece ser um “sinal” para ativar vários mecanismos de sinalização celulares importantes para função fisiológica ideal (Droge, 2002). Um exemplo claro disso é o aumento da expressão de enzimas antioxidantes e ou glutationa em resposta a MAPK e ativação de NF-κB em um esforço para restaurar o equilíbrio redox, isso ocorre principalmente em situações onde o exercício físico agudo aumenta a produção de RONS, e serve como um “sinal” necessário para a regulação dos sistemas de defesas antioxidantes (Ji et al., 2006).

Sabe-se que a produção de RONS é necessária para iniciar várias vias de sinalização, entretanto, condições que favorecem a produção acelerada e ou crônica de RONS pode servir pra sobrecarregar a capacidade do sistema de defesa antioxidante, interrompendo a sinalização, causando uma mudança permanente no equilíbrio redox (Droge, 2002). Assim, essa mudança permanente no ambiente redox pode gerar efeitos nocivos e danos diretos sobre os ácidos nucléicos, lipídeos e proteínas (Dalle-Donne et al., 2006) bem como alterações na expressão de genes que promovem a apoptose no interior das células saudáveis, e inflamação sistêmica (Chung et al., 2009).

A produção em excesso de RONS resulta de diferentes fatores estressores, tais como consumo excessivo de nutrientes (Sies et al., 2005), exposição a poluentes ambientais (Halliwell, 1991), exercício físico (Vollaard et al., 2005). Contudo, qualquer situação em que o consumo de oxigênio é aumentado, tal como durante o exercício físico, poderia resultar em um estado agudo de estresse oxidativo (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009).

### **3.1 - Estresse oxidativo e exercício**

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando ao estresse oxidativo celular está ligado a inúmeras patologias, incluindo câncer (Valko et al., 2007) e diabetes (Wei et al., 2009). Portanto, parece paradoxal que, embora o exercício promova o estresse oxidativo, uma rotina de exercício físico regular está associada a inúmeros benefícios à saúde, incluindo um menor risco de mortalidade por qualquer causa, reduzindo as ameaças de doença cardiovascular, câncer e diabetes (Hayes and Kriska, 2008); (Kraus and Slentz, 2009).

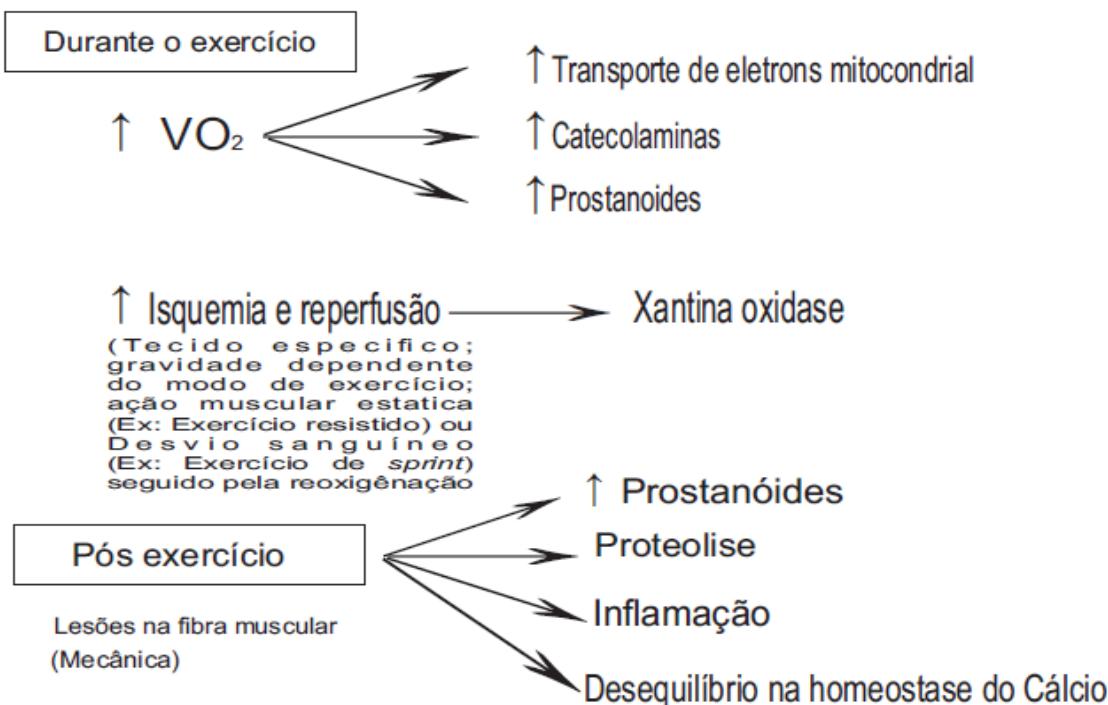
O primeiro estudo que relatou o estresse oxidativo induzido pelo exercício foi publicado em 1978 (Dillard et al., 1978). Segundo os autores, 60 minutos de exercícios de resistência a 60% do  $VO_{2\max}$  resultou em aumento nos níveis de pentano expirado (biomarcadores de peroxidação lipídica) e que a suplementação antioxidante com vitamina E reduziu a produção de pentano induzida pelo exercício. Foi concluído que o exercício promove o aumento da produção de oxidantes.

Desde a descoberta de que a contração dos músculos esqueléticos produz espécies reativas de oxigênio (ROS) (Davies et al., 1982), muitos pesquisadores têm assumido que o músculo esquelético fornece a principal fonte de geração de radicais livres e ROS durante o exercício (Powers and Jackson, 2008).

A geração primária dessas espécies reativas de oxigênio, em resposta ao exercício agudo, pode ocorrer através dos seguintes caminhos: respiração mitocondrial (vazamento de elétrons a partir da cadeia transportadora de elétrons e posterior produção do radical superóxido), metabolismo dos prostanóides, auto-oxidação das catecolaminas e atividade das enzimas oxidases NADPH oxidase e xantina oxidase (Jackson 2000).

A geração de ROS durante o exercício depende principalmente do modo (aeróbico, anaeróbico), intensidade e duração do exercício, como também diferentes tipos de exercício e suas necessidades energéticas, níveis de consumo de oxigênio e tensões mecânicas impostas aos tecidos (Jackson 2000).

(Fig.2)



**Figura 2: Potenciais mecanismos de aumento da produção de relacionado a sessões agudas de exercício.** Adaptado de Bloomer RJ, & Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 29(3): 245–263, 2004.

Várias evidências apontam o aumento da produção de RONS durante e após o exercício físico; assim, inúmeras investigações têm relatado um aumento de vários biomarcadores de estresse oxidativo, tanto após o exercício aeróbio agudo (Vollaard et al., 2005) e exercício anaeróbio (Bloomer and Goldfarb, 2004).

Já é claro que o exercício físico realizado com volume, intensidade e duração elevada pode levar a um aumento da produção de RONS, gerando oxidação de diversas moléculas biológicas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos). Diante disso, esta condição é indicativa de estímulos nocivos e ainda continua a ser um tema de debate (Vollaard et al., 2005). Isto se da principalmente pelo potencial que as RONS têm em prejudicar o desempenho do exercício através de alterações na função contrátil, provocando lesões musculares e acelerar a fadiga (Reid, 2001).

Atualmente não existem dados de “causa e efeito” para indicar que o aumento de RONS resultante do exercício físico agudo realmente causa problemas de saúde e doença (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009). Pelo contrário, pelo princípio da hormesis, parece ser necessário um esforço de baixo grau oxidativo para varias adaptações fisiologias (Schulz et al., 2007). Uma exposição do organismo repetidas vezes frente ao aumento da produção de RONS durante o treinamento físico crônico leva a uma regulação positiva no sistema de defesa antioxidante (Elosua et al., 2003).

Dessa forma, o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico pode funcionar de uma forma semelhante a todos os outros princípios das ciências do exercício, ou seja, a produção de RONS deve ultrapassar um limiar mínimo, para que ocorra uma sobrecarga de forma eficaz ao sistema, assim, se a sobrecarga for alcançada, a capacidade fisiológica do corpo vai se expandir e se adaptar, gerando uma melhora na saúde e ou no desempenho esportivo (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009).

### **3.2 - Marcadores de estresse oxidativo**

Uma das metodologias mais comum para verificar o estresse oxidativo induzido pelo exercício aeróbio têm sido a avaliação da peroxidação lipídica, com o malondialdeido (MDA) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009).

Em estudo realizado por (Miyazaki et al., 2001) a concentração de TBARS aumentou após 12 semanas de corrida a 80% da frequência cardíaca máxima, em estudo apresentado por (Laaksonen et al., 1999) foi realizado exercício submáximo em bicicleta ergométrica, durante 40 minutos e a 60% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$  e verificou aumento de 50% nas concentrações de TBARS. Por outro lado, alguns estudos verificaram não haver aumento de TBARS frente a protocolos de exercícios submáximos e máximos. Segundo (Rahnama et al., 2007), o treinamento realizado 3 vezes por semana durante 8 semanas e a 70% da frequência cardíaca máxima não apresentou diferenças significativas nos níveis de MDA.

Em resposta a exercícios físicos extenuantes, parece que a capacidade antioxidante total pode ser temporariamente reduzida, principalmente porque os seus componentes estão agindo no combate a agentes oxidantes nocivos (Rahnama et al., 2007). Em oposição a este estudo, imediatamente após o exercício físico e durante o período de recuperação, os níveis aumentam além dos níveis basais (Gonzalez et al., 2008; Ispirliidis et al., 2008).

## **4 – SALIVA**

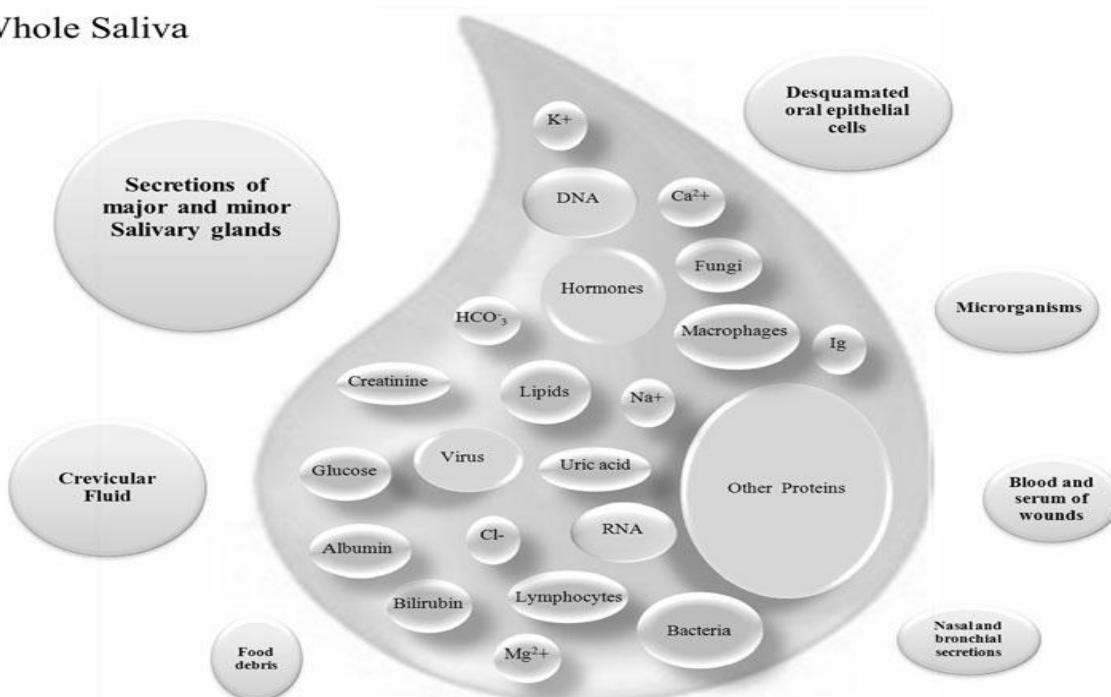
### **4.1 Composição, inervação e secreção**

A saliva é um líquido transparente ligeiramente ácido (pH 6-7), que é secretado na boca, principalmente pelas glândulas salivares (Spielmann and Wong, 2011). Diariamente e, sob condições normais, humanos adultos produzem entre 500 e 1500 mL de saliva (Navazesh, 1993).

Toda saliva é uma mistura complexa de fluidos orais, contendo também o fluido crevicular, células epiteliais descamadas orais e micro-organismos, tais

como, vírus, fungos, bactérias e endotoxinas bacterianas. Em alguns casos, o sangue e soro oriundos de feridas na cavidade oral, secreções brônquicas e nasais, oriundos da expectoração e restos de alimentos, podem ser encontrados na saliva (Kaufman e Lamster, 2002 ; Marcantoni, 2009 ) (**Figura 3**).

Whole Saliva



**Figura 3: Representação esquemática dos componentes de toda a saliva.** O tamanho de cada gotícula individual é uma representação aproximada da sua concentração no conjunto de saliva. Cuevas-Cordoba, B., and J. Santiago-Garcia, 2014, Saliva: a fluid of study for OMICS: Omics, v. 18, p. 87-97.

Embora a diversidade deste fluido seja grande, cerca de 99% do teor da saliva é água, enquanto o 1% restante são componentes orgânicos e inorgânicos (Navazesh and Kumar, 2008). Os componentes orgânicos podem ser protéicos ou não-protéicos, os componentes não protéicos da saliva são (ácido úrico, bilirrubina, creatinina, glicose, lipídeos, ácidos aminados, aminas, lactato, dentre outros). Os componentes protéicos são proteínas ricas em prolina, amilase, mucina, lisozima, lactoferrina, IgA, peroxidase, esterinas, histatinas, metaloproteases de matriz, glicoproteínas e lipoproteínas, inibidores de enzimas, citocinas, tais como interleucina-8 e hormônios, tais como catecolaminas, tiroxina, triiodotironina, cortisol, hormônio do crescimento, testosterona, progesterona, prolactina e melatonina (Marcantoni, 2009).

A parte inorgânica da saliva é composta por eletrólitos, como sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, e fosfato, já o fluido crevicular contém vários elementos plasmáticos, como a albumina, transferrina, IgG, IgM, neutrófilos polimorfonuclear, linfócitos T e B, macrófagos, entre outros. Toda a saliva pode também conter células epiteliais bucais, produtos de degradação do sistema imunológico e endotoxinas (Chiappin et al., 2007). Estes componentes desempenham várias funções, incluindo respostas imunes, proteção tecidual, atividade antimicrobiana, inibição da precipitação de cálcio, percepção do aroma, digestão, inibição de proteases, bem como outras funções, tais como a transcrição, proliferação de células, transdução de sinal, quimiotaxia, e motilidade celular (Spielmann and Wong, 2011).

Muitos componentes que não são habituais da saliva são oriundos a partir de vários órgãos e sistemas. Algumas moléculas plasmáticas atravessam a barreira dos capilares, o espaço intersticial, e as membranas das células acinares e ductal, até atingir o lúmen dos túbulos de excreção das glândulas salivares. Assim, diferentes moléculas entram na saliva através de rotas intracelulares e extracelulares (Llena-Puy, 2006).

As glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) produzem cerca de 90% da secreções salivares, enquanto as glândulas salivares menores (labial, bucal e palatal) produzem os 10% restantes (Navazesh and Kumar, 2008). Inicialmente a saliva é produzida pelas células acinares, que são divididas em dois tipos: células serosas e mucosas. A glândula parótida tem células acinares serosas e secreta uma saliva fina, aquosa e rica em amilase, a glândula submandibular é constituída por células acinares serosas e mucosas e produz uma saliva mais viscosa e rica em mucina e a glândula sublingual tem células acinares mucosas e também produz uma saliva rica em mucina viscosa (Mese and Matsuo, 2007).

A secreção salivar é controlada exclusivamente pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (Mese and Matsuo, 2007). O SNS é o principal responsável pela secreção de proteínas e o SNP é o principal responsável pela secreção de água e eletrólitos (Garrett et al., 1991). A estimulação do nervo simpático ou dos receptores ou beta-adrenergicos causa

exocitose, mas diminui a secreção do fluido. A ativação dos receptores aumenta os níveis celulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), que é o principal segundo mensageiro para a secreção de amilase (Garrett et al., 1991). O (cAMP) ativa a proteína kinase (PKA) levando a fosforilação das proteínas e estimulando as células a liberar o conteúdo dos grânulos secretores (Mese and Matsuo, 2007).

A estimulação do nervo parassimpático ou receptores colinérgicos muscarínicos inicia através de segundos mensageiros das células acinares, ou seja, o sistema de transdução de sinal envolve a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . O aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular leva a abertura de canais de  $\text{Cl}^-$  na membrana apical, o que promove a secreção de  $\text{Cl}^-$  no lúmen. A secreção líquida de  $\text{NaCl}$  cria um gradiente osmótico através dos ácinos, o que extrai água a partir da corrente sanguínea por meio das junções comunicantes (Garrett et al., 1998). Assim, a saliva secretada no lúmen (saliva primária) é um fluido isotônico semelhante ao plasma. Na próxima etapa, a composição da saliva primária é modificada no sistema ductal (hipótese de 2 etapas), processo no qual os ductos intralobulares reabsorvem  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , mas não água, o que torna a saliva final um fluido hipotônico (Pousen, 1998).

#### **4.2 - Saliva como um fluido para diagnóstico**

A identificação e análise de biomoléculas presentes na saliva podem fornecer informações sobre a função de vários órgãos do corpo (Oppenheim et al., 2007); (Tiwari, 2011). Dessa forma, a saliva representa uma atrativa ferramenta para o monitoramento e para o diagnóstico precoce de doenças da cavidade oral e também da saúde sistêmica.

Até o presente momento, o líquido mais popular e universalmente aceito para diagnósticos clínicos sobre doenças é o sangue. Pelo fato deste fluido circular ao redor de todos os tecidos e órgãos e coletar subprodutos de áreas doentes, a análise dos componentes do sangue revelou ligações com vários processos patológicos (Loo et al., 2010). Entretanto, nos últimos anos a saliva tem chamado atenção como um fluido potencialmente útil em termos de descoberta de biomarcadores para diagnósticos e acompanhamento de várias doenças.

Quando comparado ao sangue, a saliva apresenta várias vantagens em sua utilização, principalmente pela sua natureza não invasiva durante as coletas, consequentemente reduzindo o estresse e ansiedade (Shah et al., 2011). Isto se torna de grande importância principalmente em pacientes crianças, idosos, pacientes com problemas vasculares (Malamud, 2011) e pensando nos profissionais das ciências do exercício físico, é de grande importância realizar coletas que seja prática e fácil tanto para vida do treinador e também do atleta. Além disso, a simplicidade da coleta, manuseio, armazenamento e processamento, faz com que ocorra redução de custos (Tiwari, 2011). Outras comparações da saliva em relação ao plasma são apresentadas na **tabela 1**.

#### COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ENTRE PLASMA E SALIVA

| Plasma   | Saliva   |
|--|--|
| Bem aceito para diagnósticos clínicos  | Potencialmente atrativo para diagnósticos clínicos   |
| Associado a marcadores com processo de varias doenças  | Na maioria dos casos, os marcadores não são completamente validados para diagnósticos e monitoramento de doenças             |
| Coleta invasiva e estressante  | Coleta não invasiva, baixos níveis de estresse e ansiedade   |
| Alto risco de exposição dos trabalhadores do laboratório a amostras perigosas                                    | Baixos riscos de exposição dos trabalhadores do laboratório a amostras perigosas   |
| Métodos de coletas são padronizados  | Métodos de coletas não totalmente padronizados   |
| Baixa variação na concentração das moléculas   | Variação na concentração de muitas moléculas e afetada por ritmo circadiano, estímulos, idade, entre outros                  |
| Alta concentração de biomoléculas  | Baixa concentração de biomoléculas   |
| Alta e mais complexas substâncias inibidoras   | Baixa e menos complexa as substâncias inibitórias  |
| 23% das proteínas encontradas no plasma são também presentes na saliva   | 27% das proteínas presentes na saliva são também presentes no plasma   |
| 77% das proteínas presentes no plasma são ausentes na saliva (exclusiva ao plasma)                               | 73% das proteínas presentes na saliva são ausentes no plasma (exclusivas do plasma)  |
| 60% das proteínas do plasma consideradas como candidatas a marcadores de doenças muitas são exclusivas do plasma | Cerca de 40% das proteínas do plasma consideradas candidatas a marcadores para várias doenças pode ser encontradas na saliva |
| Algumas proteínas de elevada abundância na saliva são encontradas no plasma em concentrações similares           | Algumas das muitas proteínas abundantes no plasma são também encontradas na saliva em moderadas a altas concentrações        |

**Tabela 1: Comparação das características entre plasma e saliva.** Cuevas-Cordoba, B., and J. Santiago-Garcia, 2014, Saliva: a fluid of study for OMICS: Omics, v. 18, p. 87-97.

A saliva pode facilmente ser coletada por humanos, o paciente deve receber informações detalhadas sobre o protocolo de coleta, sendo de grande importância não escovar os dentes, evitar alimentos, líquidos, e goma de

mascar por pelo menos 30 minutos antes da coleta. E lavar a boca com água destilada de preferência (Chiappin et al., 2007 ).

A padronização da coleta de saliva tem uma grande importância na sua análise, pois vários fatores podem afetar o fluxo e a composição salivar. Atualmente, vários métodos e dispositivos estão disponíveis, entre eles o método mais fácil e viável é a coleta do fluido oral total. É possível fazer coletas em regiões mais específicas e verificar diferenças na composição secretada por diferentes glândulas, entretanto, são métodos mais difíceis e menos viáveis, e de um ponto de vista prático, são metodologias que necessitam de profissionais especializados, inviabilizando assim uma possível comercialização.

A saliva total (ou fluido oral total) é fácil de recolher, e é mais representativo do ambiente oral, a coleta não necessita ser realizada por um técnico especializado e pode ser feita pelo paciente ou pelo próprio participante do estudo (Chiappin et al., 2007). A saliva total não estimulada pode ser recolhida por vários dispositivos coletores dos fluidos orais e estes dispositivos estão disponíveis comercialmente. A coleta não estimulada pode ser das seguintes formas: (1) Babando passivamente (sem movimentos orais) permitindo a saliva descer pelo lábio inferior para dentro do frasco de plástico (Dawes et al., 2001), ou (2) Cuspindo diretamente no frasco coletor, mas dessa maneira a saliva pode conter 14 vezes mais bactérias do que a saliva recolhida pelo método de babar, isso pode afetar o armazenamento e futuras análises (Nurkka et al., 2003).

A saliva total estimulada pode ser obtida com movimentos orais, como a mastigação suave e o uso de ácido cítrico, entretanto o ácido cítrico pode interferir na análise de alguns analitos, como a testosterona (Granger et al., 1999). Os dispositivos mais utilizados são rolos de algodão estéreis no salivete (SARSTED, Newton, NC). O rolo de algodão é colocado na boca do sujeito e é suavemente mastigada durante cerca de 1 a 2 minutos, em seguida, colocado no interior do frasco. A saliva é obtida através da sucção do algodão utilizando uma seringa sem agulha ou por centrifugação (Chiappin et al., 2007).

Outros métodos não absorventes são utilizados para obter a saliva de forma estimulada, são eles: mastigar um pedaço de cera de parafina com tamanho padronizado (Laine et al., 1999), mascar goma base neutra (Dawes et al., 2001), mastigar parafilme ou elásticos (Gonzalez et al., 1997), manter na boca cristais de bebida em pó (Granger et al., 2004) ou algum produto alimentar que tenha ácido cítrico (Jensdottir et al., 2005).

Após as coletas, as amostras de saliva devem ser mantidas no gelo, em seguida ser aliquotadas e congeladas o mais rápido possível, para manter a integridade das amostras, a refrigeração evita a degradação de algumas moléculas da saliva e o crescimento bacteriano. A saliva contém várias proteases bacterianas que podem degradar proteínas salivares, afetando as análises de compostos proteicos, para evitar a degradação de compostos salivares, deve-se armazenar imediatamente as alíquotas de saliva sem qualquer processamento; armazenar em temperatura ambiente quando a análise for realizada de imediato ou em até 30 a 90 minutos da coleta; armazenar em -20°C quando a análise for realizada entre 3h e 6h após a coleta e armazenar em -80°C quando a análise for realizada dias e até meses após a coleta (Chiappin et al., 2007).

#### **4.3 - Saliva e exercício físico: possibilidades futuras**

O exercício físico tem sido considerado um fator determinante na manutenção, promoção e recuperação das funções orgânicas, contribuindo na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, obesidade, diabetes e evitando elevação no número de mortalidade gerado por essas doenças.

Nos últimos anos cresceu o número de trabalhos envolvendo análises sobre marcadores de estresse, balanço redox e seus efeitos sobre vários tecidos. Além disso, a influência do exercício físico em diferentes contextos tem merecido destaque, principalmente por ser um agente estressor e promover alterações no organismo.

Nesse sentido, o fluido corporal considerado como padrão ouro para análises é o sangue, porém, a saliva tem despertado interesse em muitos pesquisadores por apresentar algumas vantagens em relação à coleta

sanguínea. Principalmente por ser um método simples, não invasivo e seguro, além da facilidade na logística e a possibilidade de coleta nos próprios ambientes de treinamento.

Assim, podemos dizer que a saliva é uma ferramenta importante e de grande utilidade para o monitoramento não só da saúde oral, mas também da saúde sistêmica. Entretanto, várias precauções devem ser tomadas para que esse fluido represente de maneira fidedigna a resposta a qual se pretende avaliar.

## 5 - Referências

- Abrantes, C., V. Macas, and J. Sampaio, 2004, Variation in football players' sprint test performance across different ages and levels of competition: *J Sports Sci Med*, v. 3, p. 44-9.
- Alix-Sy, D., C. Le Scanff, and E. Filaire, 2008, Psychophysiological responses in the pre-competition period in elite soccer players: *J Sports Sci Med*, v. 7, p. 446-54.
- Allen, R. G., and M. Tresini, 2000, Oxidative stress and gene regulation: *Free Radic Biol Med*, v. 28, p. 463-99.
- Asmus, K. D.; Bonifacic, M. Free radical chemistry. In: Sen, C.K., Packer, L., Hanninen, O. (Eds.), *Handbook of Oxidants and Antioxidants*. Elsevier, Amsterdam, pp. 3–54; 2000.
- Bangsbo, J., 1994, Energy demands in competitive soccer: *J Sports Sci*, v. 12 Spec No, p. S5-12.
- Bangsbo, J., L. Norregaard, and F. Thorso, 1991, Activity profile of competition soccer: *Can J Sport Sci*, v. 16, p. 110-6.
- Beckman, K. B., and B. N. Ames, 1998, The free radical theory of aging matures: *Physiol Rev*, v. 78, p. 547-81.
- Bishop, N. C., G. J. Walker, G. A. Scanlon, S. Richards, and E. Rogers, 2006, Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion: *Med Sci Sports Exerc*, v. 38, p. 513-9.
- Bjornstedt, M., J. Xue, W. Huang, B. Akesson, and A. Holmgren, 1994, The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase: *J Biol Chem*, v. 269, p. 29382-4.

Bloomer, R. J., and A. H. Goldfarb, 2004, Anaerobic exercise and oxidative stress: a review: *Can J Appl Physiol*, v. 29, p. 245-63.

Chatterton, R. T., Jr., K. M. Vogelsong, Y. C. Lu, A. B. Ellman, and G. A. Hudgens, 1996, Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity: *Clin Physiol*, v. 16, p. 433-48.

Chiappin, S., G. Antonelli, R. Gatti, and E. F. De Palo, 2007, Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation: *Clin Chim Acta*, v. 383, p. 30-40.

Chicharro, J. L., M. Perez, A. Carvajal, F. Bandres, and A. Lucia, 1999, The salivary amylase, lactate and electromyographic response to exercise: *Jpn J Physiol*, v. 49, p. 551-4.

Chiodo, S., A. Tessitore, C. Cortis, G. Cibelli, C. Lupo, A. Ammendolia, M. De Rosas, and L. Capranica, 2011, Stress-related hormonal and psychological changes to official youth Taekwondo competitions: *Scand J Med Sci Sports*, v. 21, p. 111-9.

Chung, H. Y., M. Cesari, S. Anton, E. Marzetti, S. Giovannini, A. Y. Seo, C. Carter, B. P. Yu, and C. Leeuwenburgh, 2009, Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases: *Ageing Res Rev*, v. 8, p. 18-30.

Costa, R. J., M. B. Fortes, K. Richardson, J. L. Bilzon, and N. P. Walsh, 2012, The effects of postexercise feeding on saliva antimicrobial proteins: *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, v. 22, p. 184-91.

Dalle-Donne, I., R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, and A. Milzani, 2006, Biomarkers of oxidative damage in human disease: *Clin Chem*, v. 52, p. 601-23.

Davies, K. J., A. T. Quintanilha, G. A. Brooks, and L. Packer, 1982, Free radicals and tissue damage produced by exercise: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 107, p. 1198-205.

Dawes, C., R. W. Tsang, and T. Suelzle, 2001, The effects of gum chewing, four oral hygiene procedures, and two saliva collection techniques, on the output of bacteria into human whole saliva: *Arch Oral Biol*, v. 46, p. 625-32.

Diaz, M. M., O. L. Bocanegra, R. R. Teixeira, S. S. Soares, and F. S. Espindola, 2012, Response of salivary markers of autonomic activity to elite competition: *Int J Sports Med*, v. 33, p. 763-8.

Diaz, M. M., O. L. Bocanegra, R. R. Teixeira, S. S. Soares, and F. S. Espindola, 2013, Salivary nitric oxide and alpha-amylase as indexes of training intensity and load: *Int J Sports Med*, v. 34, p. 8-13.

Di Corrado, D., T. Agostini, M. Bonifazi, and V. Perciavalle, 2014, Changes in mood states and salivary cortisol levels following two months of training in elite female water polo players: *Mol Med Rep*, v. 9, p. 2441-6.

Dillard, C. J., R. E. Litov, W. M. Savin, E. E. Dumelin, and A. L. Tappel, 1978, Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation: *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, v. 45, p. 927-32.

Droge, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function: *Physiol Rev*, v. 82, p. 47-95.

Drucker, S., and M. I. New, 1987, Disorders of adrenal steroidogenesis: *Pediatr Clin North Am*, v. 34, p. 1055-66.

Elosua, R., L. Molina, M. Fito, A. Arquer, J. L. Sanchez-Quesada, M. I. Covas, J. Ordonez-Llanos, and J. Marrugat, 2003, Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women: *Atherosclerosis*, v. 167, p. 327-34.

Fisher-Wellman, K., and R. J. Bloomer, 2009, Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history: *Dyn Med*, v. 8, p. 1.

Fonseca,P.H.S; Marins, J.C.B; Silva, A.T. Validação de equações antropométricas que estimam a densidade corporal em atletas profissionais de futebol. *Rev Bras Med Esporte* Vol. 13, Nº 3 – Mai/Jun, 2007.

Fortes, M. B., and M. Whitham, 2011, Salivary Hsp72 does not track exercise stress and caffeine-stimulated plasma Hsp72 responses in humans: *Cell Stress Chaperones*, v. 16, p. 345-52.

Garrett, J. R., A. M. Suleiman, L. C. Anderson, and G. B. Proctor, 1991, Secretory responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats: *Cell Tissue Res*, v. 264, p. 117-26.

Garrett JR, Ekström J, Anderson LC (eds): *Mecanismos glandulares de salivar Secretion*. Front Biol Oral. Basel, Karger, 1998, vol 10, pp 36-54 (DOI: 10.1159/000061087)

Gilman, S. C., G. J. Fischer, R. J. Biersner, R. D. Thornton, and D. A. Miller, 1979, Human parotid alpha-amylase secretion as a function of chronic hyperbaric exposure: *Undersea Biomed Res*, v. 6, p. 303-7.

Gonzalez, D., R. Marquina, N. Rondon, A. J. Rodriguez-Malaver, and R. Reyes, 2008, Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva: *Res Sports Med*, v. 16, p. 128-37.

Gonzalez, M., J. A. Banderas, A. Baez, and R. Belmont, 1997, Salivary lead and cadmium in a young population residing in Mexico city: *Toxicol Lett*, v. 93, p. 55-64.

Gorostiaga, E. M., I. Llodio, J. Ibanez, C. Granados, I. Navarro, M. Ruesta, H. Bonnabau, and M. Izquierdo, 2009, Differences in physical fitness among indoor and outdoor elite male soccer players: *Eur J Appl Physiol*, v. 106, p. 483-91.

Granger, D. A., K. T. Kivlighan, M. el-Sheikh, E. B. Gordis, and L. R. Stroud, 2007, Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1098, p. 122-44.

Granger, D. A., E. B. Schwartz, A. Booth, M. Curran, and D. Zakaria, 1999, Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults: *Psychoneuroendocrinology*, v. 24, p. 567-79.

Granger, D. A., E. A. Shirtcliff, A. Booth, K. T. Kivlighan, and E. B. Schwartz, 2004, The "trouble" with salivary testosterone: *Psychoneuroendocrinology*, v. 29, p. 1229-40.

Gucciardi, D. F., and J. A. Dimmock, 2008, Choking under pressure in sensorimotor skills: Conscious processing or depleted attentional resources?: *Psychology of Sport and Exercise*, v. 9, p. 45-59.

Halliwell, B., 1991, Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease: *Am J Med*, v. 91, p. 14s-22s.

Halliwell, B., and C. E. Cross, 1994, Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress: *Environ Health Perspect*, v. 102 Suppl 10, p. 5-12.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press, Oxford; 2007.

Hanton, S., Thomas, O., & Mellalieu, S. D. (2008). Management of competitive stress in elite sport. In B. Brewer (Ed.), *International Olympic Committee Sport Psychology Handbook* (pp.30-42). New York: Blackwell.

Hayes, C., and A. Kriska, 2008, Role of physical activity in diabetes management and prevention: *J Am Diet Assoc*, v. 108, p. S19-23.

Helgerud, J., L. C. Engen, U. Wisloff, and J. Hoff, 2001, Aerobic endurance training improves soccer performance: *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, p. 1925-31.

Hoff, J., and J. Helgerud, 2004, Endurance and strength training for soccer players: physiological considerations: *Sports Med*, v. 34, p. 165-80.

Ispirlidis, I., I. G. Fatouros, A. Z. Jamurtas, M. G. Nikolaidis, I. Michailidis, I. Douroudos, K. Margonis, A. Chatzinikolaou, E. Kalistratos, I. Katrabasas, V. Alexiou, and K. Taxildaris, 2008, Time-course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game: *Clin J Sport Med*, v. 18, p. 423-31.

Iversen, S., Iversen, L. & Saper, C. B. in *Principles of Neural Science* (eds Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M.) (McGraw-Hill, New York, 2000).

Jackson MJ: Exercise and oxygen radical production by muscle. In *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise* Edited by: Sen CK, Packer L, Hanninen O. Amsterdam: Elsevier Science; 2000:57-68.

Jensdottir, T., B. Nauntofte, C. Buchwald, and A. Bardow, 2005, Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition: *Caries Res*, v. 39, p. 468-74.

Ji, L. L., M. C. Gomez-Cabrera, and J. Vina, 2006, Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1067, p. 425-35.

Jones, D. P., 2006, Redefining oxidative stress: *Antioxid Redox Signal*, v. 8, p. 1865-79.

Kirschbaum, C., and D. H. Hellhammer, 1994, Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications: *Psychoneuroendocrinology*, v. 19, p. 313-33.

Koibuchi, E., and Y. Suzuki, 2014, Exercise upregulates salivary amylase in humans (Review): *Exp Ther Med*, v. 7, p. 773-777.

Kraus, W. E., and C. A. Slentz, 2009, Exercise training, lipid regulation, and insulin action: a tangled web of cause and effect: *Obesity (Silver Spring)*, v. 17 Suppl 3, p. S21-6.

Krzywkowski K, Petersen EW, Ostrowski K, Link-Amster H, Boza J, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK (2001) Effect of glutamine na protein supplementations on exercise-induced decreases in salivary IgA. *J Appl Physiol*. Aug; 91 (2): 832-8.

Laaksonen, D. E., M. Atalay, L. Niskanen, M. Uusitupa, O. Hanninen, and C. K. Sen, 1999, Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men: *Redox Rep*, v. 4, p. 53-9.

Laine, M., K. Pienihakkinen, and R. Leimola-Virtanen, 1999, The effect of repeated sampling on paraffin-stimulated salivary flow rates in menopausal women: *Arch Oral Biol*, v. 44, p. 93-5.

Llena-Puy, C., 2006, The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis: *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 11, p. E449-55.

Loo, J. A., W. Yan, P. Ramachandran, and D. T. Wong, 2010, Comparative human salivary and plasma proteomes: *J Dent Res*, v. 89, p. 1016-23.

Malamud, D., 2011, Saliva as a diagnostic fluid: *Dent Clin North Am*, v. 55, p. 159-78.

Marcantoni M. (2009). Ecología de la cavidad bucal. In: *Microbiología*

Martinac, M., D. Pehar, D. Karlovic, D. Babic, D. Marcinko, and M. Jakovljevic, 2014, Metabolic syndrome, activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and inflammatory mediators in depressive disorder: *Acta Clin Croat*, v. 53, p. 55-71.

McCord, J. M., and I. Fridovich, 1969, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein): *J Biol Chem*, v. 244, p. 6049-55.

Mese, H., and R. Matsuo, 2007, Salivary secretion, taste and hyposalivation: *J Oral Rehabil*, v. 34, p. 711-23.

Miller, D. M., G. R. Buettner, and S. D. Aust, 1990, Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions: *Free Radic Biol Med*, v. 8, p. 95-108.

Miyazaki, H., S. Oh-ishi, T. Ookawara, T. Kizaki, K. Toshinai, S. Ha, S. Haga, L. L. Ji, and H. Ohno, 2001, Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise: *Eur J Appl Physiol*, v. 84, p. 1-6.

Moreira, A., F. Arsati, Y. B. de Oliveira Lima Arsati, D. A. da Silva, and V. C. de Araujo, 2009, Salivary cortisol in top-level professional soccer players: *Eur J Appl Physiol*, v. 106, p. 25-30.

Navazesh, M., 1993, Methods for collecting saliva: *Ann N Y Acad Sci*, v. 694, p. 72-7.

Navazesh, M., and S. K. Kumar, 2008, Measuring salivary flow: challenges and opportunities: *J Am Dent Assoc*, v. 139 Suppl, p. 35s-40s.

Nurkka, A., J. Obiero, H. Kayhty, and J. A. Scott, 2003, Effects of sample collection and storage methods on antipneumococcal immunoglobulin A in saliva: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 10, p. 357-61.

Oliveira VN, Bortolini Junior MS, Reis IT, Lamonier RPMS, Espindola FS (2005) Biomarcadores Salivares na Avaliação do Limiar Anaeróbio. Fitness e Performance J. Rio de Janeiro, v.04 n.2, p. 85-89

Oppenheim, F. G., E. Salih, W. L. Siqueira, W. Zhang, and E. J. Helmerhorst, 2007, Salivary proteome and its genetic polymorphisms: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1098, p. 22-50.

Passelergue, P., and G. Lac, 1999, Saliva cortisol, testosterone and T/C ratio variations during a wrestling competition and during the post-competitive recovery period: *Int J Sports Med*, v. 20, p. 109-13.

Poulsen JH. Secretion of electrolytes and water by salivary glands. In: Garrett JR, Ekstroöm J, Anderson LC, eds. *Glandular Mechanisms of Salivary Secretion*. Basel: Karger, 1998

Powers, S. K., and M. J. Jackson, 2008, Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production: *Physiol Rev*, v. 88, p. 1243-76.

Prasad, A. S., F. W. Beck, B. Bao, J. T. Fitzgerald, D. C. Snell, J. D. Steinberg, and L. J. Cardozo, 2007, Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress: *Am J Clin Nutr*, v. 85, p. 837-44.

Rahnama, N., A. A. Gaeini, and M. R. Hamedinia, 2007, Oxidative stress responses in physical education students during 8 weeks aerobic training: *J Sports Med Phys Fitness*, v. 47, p. 119-23.

Reid, M. B., 2001, Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction: *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, p. 371-6.

Reilly, T., 1997, Energetics of high-intensity exercise (soccer) with particular reference to fatigue: *J Sports Sci*, v. 15, p. 257-63.

Schulz, T. J., K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer, and M. Ristow, 2007, Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress: *Cell Metab*, v. 6, p. 280-93.

Segal, A. W., 2005, How neutrophils kill microbes: *Annu Rev Immunol*, v. 23, p. 197-223.

Schafer, H. H., J. D. de Villiers, E. Sivukhina, J. Lewis, D. Wande, B. Perembe, and G. Jirikowski, 2013, Altered homeostasis of systemic glucocorticoids as related to obesity, glucose tolerance, and smoking: *Horm Metab Res*, v. 45, p. 245-51.

Shah, F. D., R. Begum, B. N. Vajaria, K. R. Patel, J. B. Patel, S. N. Shukla, and P. S. Patel, 2011, A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer: *Indian J Clin Biochem*, v. 26, p. 326-34.

Sies, H., and E. Cadenas, 1985, Oxidative stress: damage to intact cells and organs: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 311, p. 617-31.

Sies, H., W. Stahl, and A. Sevanian, 2005, Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress: *J Nutr*, v. 135, p. 969-72.

Site da FIFA  
<http://www.fifa.com/aboutfifa/footballdevelopment/technicalsupport/refereeing/laws-of-the-game/index.html> acessado em 20 de fevereiro de 2014.

Spencer, M., D. Bishop, B. Dawson, and C. Goodman, 2005, Physiological and metabolic responses of repeated-sprint activities:specific to field-based team sports: *Sports Med*, v. 35, p. 1025-44.

Spielmann, N., and D. T. Wong, 2011, Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives: *Oral Dis*, v. 17, p. 345-54.

Steerenberg PA, Van Asperen IA, Van Nieuw Amerongen A, Biewenga A, Mol D, Medema GJ (1997) Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. *Eur J Oral Sci*. Aug; 105 (4): 305-9

Stohs, S. J., and D. Bagchi, 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions: *Free Radic Biol Med*, v. 18, p. 321-36.

Tiwari, M., 2011, Science behind human saliva: *J Nat Sci Biol Med*, v. 2, p. 53-8.

Ulrich-Lai, Y. M., and J. P. Herman, 2009, Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses: *Nat Rev Neurosci*, v. 10, p. 397-409.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease: *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, p. 44-84.

van Stegeren, A., N. Rohleder, W. Everaerd, and O. T. Wolf, 2006, Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade: *Psychoneuroendocrinology*, v. 31, p. 137-41.

Vining, R. F., R. A. McGinley, J. J. Maksvytis, and K. Y. Ho, 1983, Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol: *Ann Clin Biochem*, v. 20 (Pt 6), p. 329-35.

Vollaard, N. B., J. P. Shearman, and C. E. Cooper, 2005, Exercise-induced oxidative stress:myths, realities and physiological relevance: *Sports Med*, v. 35, p. 1045-62.

Wei, W., Q. Liu, Y. Tan, L. Liu, X. Li, and L. Cai, 2009, Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications: *Hemoglobin*, v. 33, p. 370-7.

Wragg, C. B., N. S. Maxwell, and J. H. Doust, 2000, Evaluation of the reliability and validity of a soccer-specific field test of repeated sprint ability: *Eur J Appl Physiol*, v. 83, p. 77-83.

Zweier, J. L., P. Kuppusamy, and G. A. Lutty, 1988, Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 4046-50.

Zuardi, A. W. ; Fisiologia do estresse e sua influência na saúde; Disponível em:<http://rnp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/Fisiologia%20do%20estresse.pdf>.

## **CAPÍTULO 2**

# **Efeito da competição sobre biomarcadores salivares de estresse físico e oxidativo em jogadores de futebol**

(Formatado segundo as normas da revista *European Journal of Applied Physiology*)

Leandro Cezar Domingos Galdino <sup>a</sup>, Zulmária Rezende Ramos de Freitas <sup>a</sup>,  
Marcelo Costa Júnior <sup>a</sup>, Renata. R. Teixeira <sup>a</sup>, Foued Salmen Espindola <sup>a</sup>,  
Françoise Vasconcelos Botelho<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU,  
Uberlândia, MG, Brasil

**\*Endereço para correspondência:** Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho  
Tel.: +3432182203 Fax: +55 34 3218 2203, Endereço do laboratório: Avenida  
Pará, 1720CEP: 38400-902 – Uberlândia, MG, Brasil. E-mail:  
[ffranciosevb@gmail.com](mailto:ffrancoisevb@gmail.com)

## Resumo

O futebol é um esporte com características intermitentes, de intensidade extenuante com ênfase nos componentes de força, velocidade e resistência. Nesse sentido, a competição esportiva oferece um cenário único para avaliar as respostas ao estresse e alterações no balanço redox. A análise e coleta de amostras menos-invasivas, como a coleta de saliva, têm se destacado por oferecer oportunidade de coletas no próprio campo de treinamento ou competição. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da competição sobre biomarcadores salivares de estresse e balanço redox em atletas de futebol. A amostra foi composta por 14 indivíduos homens ( $24,05 \pm 3,1$  anos,  $173 \pm 0,05$  cm,  $71,84 \pm 8,50$  kg). Os voluntários foram monitorados durante o campeonato brasileiro universitário e realizaram quatro jogos de futebol com intervalo de 24h de descanso entre os jogos. Amostras de saliva foram coletadas antes e após o término dos jogos e acondicionadas até o momento da análise. Nossos achados mostram que nos 4 jogos a sAA e a taxa de secreção de Proteínas totais pós-jogos apresentaram aumentos significativos em relação aos momentos pré-jogos. No jogo 1, 2 e 3 a concentração de cortisol foi maior nos momentos pós-jogos em relação aos momentos pré-jogos. No que diz respeito às alterações do balanço redox, não foi verificado alterações nas taxas de danos oxidativos a lipídeos antes e após os 4 jogos, que foram quantificados através da concentração dos produtos de peroxidação lipídica (TBARS). Por outro lado, a resposta antioxidante total no jogo 3 apresentou aumento significativo no momento pós-jogo em relação ao pré-jogo, mostrado pela capacidade antioxidante total (FRAP). A atividade da catalase não sofreu alteração significativa em nenhum dos momentos avaliados. Esses resultados sugerem que os 3 marcadores de estresse (atividade autônoma) apresentaram alterações frente a competição esportiva. A taxa de secreção de Proteínas Totais pode ser um marcador atraente de estresse, pela facilidade e baixo custo do método. Os jogos mesmo com pouco intervalo de recuperação não foram suficiente para promover danos oxidativos a lipídeos, fato esse ocorreu provavelmente pelas adaptações induzidas pelo treinamento da equipe.

**Palavras chave:** Competição, futebol, saliva, estresse, balanço redox.

## ABSTRACT

Football is a sport with intermittent characteristics, high intensity and emphasis on components of strength, speed and endurance. This sport competition offers a unique setting for assessing stress responses and changes in redox balance. The collection and analysis of less-invasive samples such as saliva, offer the opportunity to collect in the field of training or competition. So, the aim of this study was to evaluate the effect of competition on salivary biomarkers of stress and redox balance in soccer players. The sample consisted of 14 male subjects ( $24.05 \pm 3.1$  years,  $173 \pm 0.05$  cm,  $71.84 \text{ kg} \pm 8.50$ ). The volunteers were monitored during the college national championship (four games) with an interval of 24 hours between games. Saliva samples were collected before and after the games and put up until the time of analysis. Our findings show that in 4 games SAA and the rate of secretion of total protein post-games showed significant increases over the pre-game moments. Game 1.2 and 3 cortisol levels showed significant increases in post-game moments in relation to pre-game moments. With regard to changes in redox balance, was not observed changes in rates of oxidative damage to lipids before and after 4 games, which were quantified by the concentration of the products of lipid peroxidation (TBARS). On the other hand, total antioxidant response in Game 3 was significantly increased in the post-game compared to the pre-game, shown by the total antioxidant capacity (FRAP). Catalase activity did not change significantly in any of the time points. These results suggest that 3 markers of stress (autonomous activity) showed changes due to athletic competition. The secretion rate of total protein can be an attractive marker of stress, ease and low cost of the method. The games even with little recovery range were not enough to promote oxidative damage to lipids, probably because of the induced training adaptations.

Keywords: Competition, Football, saliva, stress, redox balance.

## 1 – Introdução

O estresse provocado pela atividade física é mediado por componentes do sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Diaz et al., 2012). O SNA é o responsável pela resposta imediata à exposição ao agente estressor e estimula a adrenal para produzir catecolaminas; já o eixo HPA resulta na elevação dos glicocorticóides (Tsigos and Chrousos, 2002). Além disso, o sistema simpático é responsável por estimular as glândulas salivares na secreção de proteínas e o parassimpático responsável pela estimulação do fluxo salivar (Proctor and Carpenter, 2007).

A alfa-amilase salivar (sAA) é utilizada como um marcador de atividade autônoma, pois a sua concentração/atividade altera com a variação do sistema nervoso simpático e parassimpático (Rohleider and Nater, 2009). Assim, esta enzima é considerada um biomarcador de estresse físico (Chicharro et al., 1999) e, consequentemente, utilizada para mensurar a intensidade do exercício em competições esportivas ( Chiodo et al., 2011, Diaz et al., 2012). A proteína total (PT) apresenta resposta semelhante à sAA frente aos estímulos de estresse (Diaz et al., 2012). Sendo, portanto, uma mensuração rápida e barata de um marcador alternativo para atividade autonômica. Entretanto, ainda é necessário estudos para confirmar a concentração de proteína total salivar como tal biomarcador.

O cortisol é um hormônio corticosteróide liberado na circulação pelo córtex adrenal, utilizado como um método útil para acessar a reatividade do eixo HPA em relação ao estresse (Kirschbaum and Hellhammer, 1994). Em situações de estresse o cortisol é o hormônio que mais sofre alterações (Passelergue and Lac, 1999). Dessa forma, o cortisol tem sido utilizado para determinar o estresse fisiológico imposto durante uma ou várias sessões de exercício (Moreira et al., 2009). Porém em relação ao cortisol salivar existem estudos controversos, alguns verificaram que as concentrações de cortisol aumentam (Haneishi et al., 2007) e outros não encontraram mudanças após períodos competitivos (Moreira et al., 2009; Mortatti et al., 2012).

Outras variações relacionando o exercício físico e estresse são as alterações provocadas no balanço redox celular. Já é bem relatado na literatura que o exercício físico aumenta o estresse oxidativo (Vollaard et al., 2005), embora seja paradoxal, parece que uma rotina de exercício físico regular está associada a inúmeros benefícios à saúde (Hayes and Kriska, 2008), indicando que além de gerar o estresse oxidativo, o exercício físico aumenta a capacidade antioxidante (Rahnama et al., 2007).

Neste sentido, a competição esportiva oferece um ambiente único e primordial para avaliar as respostas ao estresse em suas diferentes dimensões, principalmente pela pressão e pelos vários sentimentos experimentados e impostos aos atletas. Outro fator interessante de avaliações em competições é que os critérios de desempenho são bem claros, e os atletas são avaliados em ambientes de situações reais (Diaz et al., 2012). Para tais procedimentos, a utilização de instrumentos de fácil aplicação se faz necessário, nesse sentido, a coleta de saliva é uma boa alternativa principalmente pelo seu caráter não-invasivo, coleta e análises rápidas e fáceis.

Neste estudo, avaliamos o efeito do período de competição sobre marcadores de estresse físico (cortisol salivar e sAA) em atletas de futebol amadores. Adicionalmente foram mensuradas marcadores do balanço redox (Atividade antioxidante total, Catalase e TBARs). Assim, a hipótese do nosso estudo é de que: (1) As concentrações de marcadores de estresse físico estariam alteradas durante diferentes momentos da competição; (2) O balanço redox na saliva estaria alterado pela sobrecarga dos jogos.

## 2 – Métodos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia e cada participante preencheu um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual os riscos da sua participação, na investigação proposta, foram explicados. O projeto não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

## 2.1 Sujetos

Vinte jogadores de futebol do sexo masculino da equipe de futebol da Universidade Federal de Uberlândia inicialmente foram recrutados para o estudo, mas somente 14 foram selecionados para as análises, isso ocorreu pelo fato dos 14 jogadores participarem de todos os 4 jogos do campeonato brasileiro universitário.

## 2.2 Avaliação da composição corporal, estatura e características gerais da amostra.

Na semana que antecedeu ao campeonato brasileiro universitário os atletas realizaram o **Soccer Test** para verificar a Resistência e Potência Aeróbia Máxima ( $VO_{2max}$ ). O teste consiste em quatro corridas de 15 metros com intervalo de 10s. O objetivo é fazer o maior número de repetições possíveis e a cada 240 metros (4 repetições) finaliza-se um estágio e com isso há um incremento de 1 km/h na velocidade de corrida no estágio seguinte. O teste começa com a velocidade de 9 km/h e a velocidade da corrida é controlada mediante sinais sonoros (bips) gravados em um CD. O teste é encerrado quando o atleta não conseguir acompanhar a velocidade estabelecida (Barros e Guerra, 2004).

A massa corporal, percentual de gordura e massa muscular foi verificado através de uma balança de bioimpedância da marca tetrapolar *Tanita BC558*, a altura foi mensurada utilizando um estadiômetro da marca *Sanny* (**Tabela 1**).

**Tabela 1. Características antropométricas e físicas dos participantes.**

|  |                     |
|--|---------------------|
| <b>IDADE (anos)</b>  | <b>24,05± 3.1</b>   |
| <b>ALTURA (cm)</b>   | <b>1,73 ± 0,05</b>  |
| <b>MASSA (Kg)</b>  | <b>71.84 ± 8.50</b> |
| <b>MASSA MUSCULAR (Kg)</b>                                     | <b>62.44±5.43</b>   |
| <b>PERCENTUAL DE GORDURA (%)</b>                               | <b>9.92±3.81</b>    |
| <b>IMC</b>   | <b>20.8±1.7</b>     |
| <b>VO<sub>2</sub>Max (ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b> | <b>59.2 ± 5.5</b>   |

Idade, altura, massa, massa muscular, percentual de gordura, índice de massa corporal (IMC) e VO<sub>2</sub>Max dos participantes. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n=14).

### **2.3 Procedimentos do treinamento**

Durante seis meses anterior ao período de competição os jogadores da equipe de treinamento da Universidade Federal de Uberlândia realizaram treinamentos 3 vezes por semana, sendo que o primeiro dia de treino era voltado para o trabalho físico e técnico, no segundo dia o trabalho era voltado para a parte tática e técnica e o terceiro dia de trabalho era voltado para o jogo propriamente dito, devido ao volume total de treino podemos considerar a equipe de futebol da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) como uma equipe de futebol Amador.

### **2.4 Delineamento experimental - Procedimentos da Competição**

O campeonato Brasileiro Universitário aconteceu na cidade de Uberlândia, o período total de competição foi de quatro dias. Durante os quatro dias de competição a equipe de futebol da UFU realizou um jogo por dia, com intervalo de descanso de 24h entre os jogos.

Os jogos foram disputados de acordo com as regras internacionais, sendo 2 tempos de 45 minutos, com 15 minutos de intervalo de descanso.

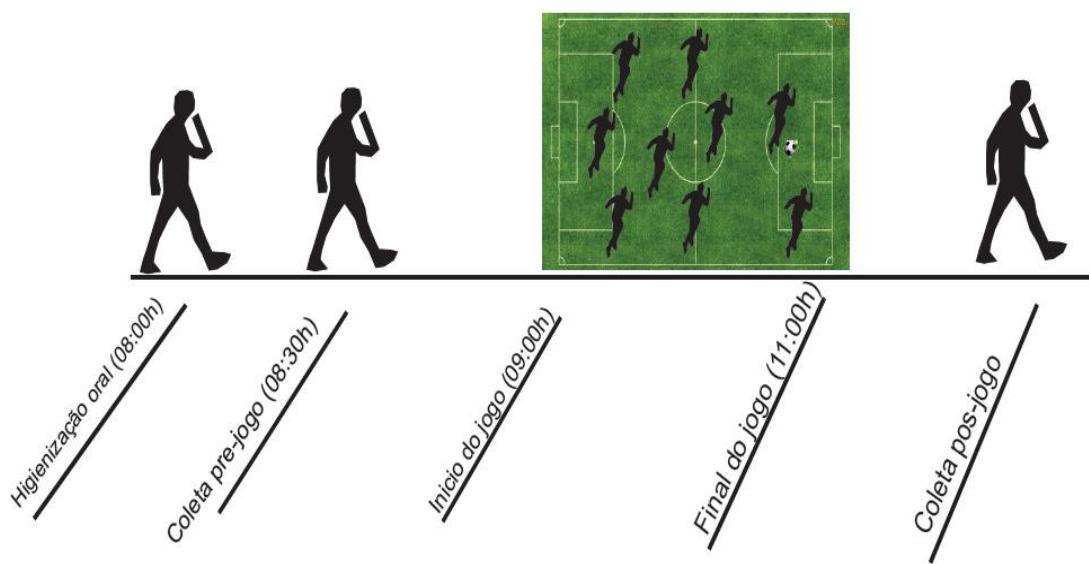
Para as análises escolhemos os voluntários que jogaram por pelo menos 45 minutos e participaram de todos os jogos.

Somente água foi fornecida aos atletas nos intervalos de descanso.

## 2.5 Coleta e processamento da saliva

Os atletas foram orientados a absterem-se de compostos antioxidantes no dia dos jogos além de produtos alimentares e de cafeína por pelo menos 1h antes das coletas de saliva e fizeram higienização da cavidade oral através da escovação dental e da língua 30 minutos antes da coleta pré-partida. As amostras de saliva foram coletadas em dois momentos: pré e pós os jogos.

As amostras de saliva pré-jogo foram coletadas 30 minutos antes do início das partidas, antes do aquecimento e sempre no mesmo horário do dia (08:30h). A saliva coletada pós-partida foi coletada imediatamente após o término dos jogos ou após o atleta ter sido substituído, o tempo de coleta da saliva foi padronizado em três minutos para todos os atletas (**Figura 1**).



**Figura 1: Procedimento da coleta de saliva em seus respectivos momentos**

A saliva foi coletada de forma não-estimulada, pelo método de cuspe (Navazesh, 1993), em tubos plásticos (falcon) de 15 mL. Após as coletas os tubos foram guardados no gelo para transporte até o laboratório. A saliva foi centrifugada a 3500 rpm, durante 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi

coletado e aliquotado (400 $\mu$ L) microtubos de 1,5 mL e armazenados a -80°C até serem analisados.

## 2.6 Análise do fluxo salivar

O fluxo salivar das amostras de saliva coletada foi avaliado pela seguinte fórmula:

$$\text{Fluxo salivar} = \left( \frac{\text{peso do tubo Falcon cheio (g)} - \text{peso do tubo Falcon vazio (g)}}{\text{densidade da saliva (g/mL)}} \right) \div \text{tempo de coleta (min)}$$

Após calcularmos o fluxo salivar do pré-jogo e do pós-jogo, fizemos a diferença entre os dois para avaliarmos se houve ou não diferença do fluxo salivar após os jogos.

## 2.7 Dosagem da concentração total de proteínas na saliva

A dosagem de proteínas totais das amostras de saliva foi realizada de acordo com o protocolo de Bradford (1976) adaptado para microplaca, com albumina sérica bovina como padrão. Em cada poço da microplaca adicionou-se 5  $\mu$ L da saliva bruta, 95  $\mu$ L de água deionizada e 200  $\mu$ L do reagente de Bradford. O ensaio foi realizado em duplicata e a leitura feita a 595 nm em temperatura ambiente.

## 2.8 Análise da atividade de Alfa-Amilase

Uma alíquota de 10  $\mu$ L da saliva foi diluída (1:200) em tampão MES (MES 50 mM, NaCl 300 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, KSCN 140 mM, pH 6,3), seguindo-se a adição de 300  $\mu$ L do substrato (2-cloro-p-nitrofenol, associado à maltotriose), pré-aquecido a 37°C. A densidade óptica foi lida a 405 nm em intervalos de 1min durante 3 min a 37°C, utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA). A atividade da enzima foi determinada através da fórmula: [diferença de absorbância por minuto x volume total do ensaio (308 $\mu$ L) x fator de diluição (200)] / [absortividade milimolar de 2-cloro-

p-nitrofenol (12,9) x volume da amostra ( 0,008mL) x caminho da luz (0,97)] (Granger et al. 2007, adaptado).

## **2.9 Determinação da concentração de cortisol**

A concentração de cortisol salivar foi determinada utilizando-se um ensaio imunoenzimático competitivo por meio do Kit Cortisol Expanded Range EIA (Salimetrics,USA).

## **3 – Técnicas de medida de estresse oxidativo**

### **3.1 Peroxidação lipídica**

O TBARS representa um método de mensuração de peroxidação lipídica. O método consiste na análise dos produtos da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff, que podem ser lidas espectrofotometricamente.

A mensuração dos metabólitos, reativos ao TBA foi realizada pelo método descrito por (Buege and Aust, 1978). A saliva (100 $\mu$ L) foi homogeneizado em 900 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugadas por 6 minutos a 10.000g. Desta solução, 400 $\mu$ L de cada amostra foi colocado em eppendorfs e foi adicionado 400 $\mu$ L de TCA 20%. Dessa nova diluição foram separados tubos para o branco e tubos para o teste, sendo 400 $\mu$ L da amostra e 600 $\mu$ L de ácido clorídrico (HCL) 0,5M para o branco e 400 $\mu$ L da amostra e 600 $\mu$ L do (TBA) a 0,75% em HCL 0,5M e BHT 0,1mM para o teste. As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e depois centrifugadas por 6 minutos a 10.000g. O sobrenadante do branco e do teste foi usado para leitura no espectrofotômetro a 532 nm e a 600nm.

Para o cálculo consideramos o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (156 mmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

### **3.2 Determinação da atividade da catalase**

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em  $H_2O$  e  $O_2$ . Sua atividade foi medida na saliva segundo o método proposto por Aebi (1984), por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio, lida a 240 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific GENESYS 10S – Vis e UV). O reagente de trabalho, preparado imediatamente antes do experimento é composto por tampão fosfato de sódio ( $NaH_2PO_4$  50 mM e  $Na_2HPO_4$  50 mM, pH 7.4 e EDTA 0.5 mM) e peróxido de hidrogênio a 30%. A proporção foi de 1000 mL de tampão para 340  $\mu L$  de peróxido de hidrogênio. Todas as leituras foram feitas em cubeta de quartzo. O aparelho foi zerado com tampão fosfato (890  $\mu L$ ) e em seguida, as amostras foram lidas em duplicata, adicionando-se à cubeta 100  $\mu L$  da solução de trabalho e 10  $\mu L$  da saliva pura.

O consumo do peróxido de hidrogênio foi monitorado durante 60 segundos, anotando-se as absorbâncias a cada intervalo de 15 segundos. O cálculo da atividade da catalase é dado pela equação:  $[((t_0 - t_{60}) / 0,04) / \text{proteína}]$ , sendo  $t_0$  o tempo de leitura inicial,  $t_{60}$  o tempo de leitura final, ( $\epsilon_{240} = 0,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio. A quantificação de proteína total é necessária para o cálculo.

### **3.3 Determinação da capacidade antioxidante total**

A capacidade antioxidante total foi avaliada por meio da redução do ferro no seu estado férrico ( $Fe^{3+}$ ) para seu estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) em pH baixo, formando o complexo ferro-tripiridiltriazina (TPTZ) de coloração azul intensa, lido espectofotometricamente a 593 nm (Benzie and Strain, 1996). Os reagentes incluem tampão acetato de sódio (300 mM.  $L^{-1}$ , pH 3,66), e 16 ml de  $C_2H_4O_2$  por litro de tampão; 10 mmol.  $L^{-1}$  de TPTZ preparado em HCL a 40 mmol.  $L^{-1}$  e cloreto férrico ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) a 20 mM, preparado no tampão acetato de sódio (300 mM.  $L^{-1}$ , pH 3,6). O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se 25 ml de tampão acetato de sódio, 2,5 ml da solução de TPTZ

e 2,5 ml da solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , sendo aquecido a 37°C por cinco minutos. Na microplaca foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da amostra, 25  $\mu\text{L}$  de água destilada e 250  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho, incubados a 37°C por seis minutos. A absorbância foi mensurada em espectofotômetro a 593 nm utilizando uma leitora de microplaca. A atividade antioxidante total foi calculada, baseada na curva padrão construída a partir de trolox, nas concentrações de 1000, 800, 400, 200 e 50  $\mu\text{M}$ . Os reagentes foram preparados imediatamente antes do experimento.

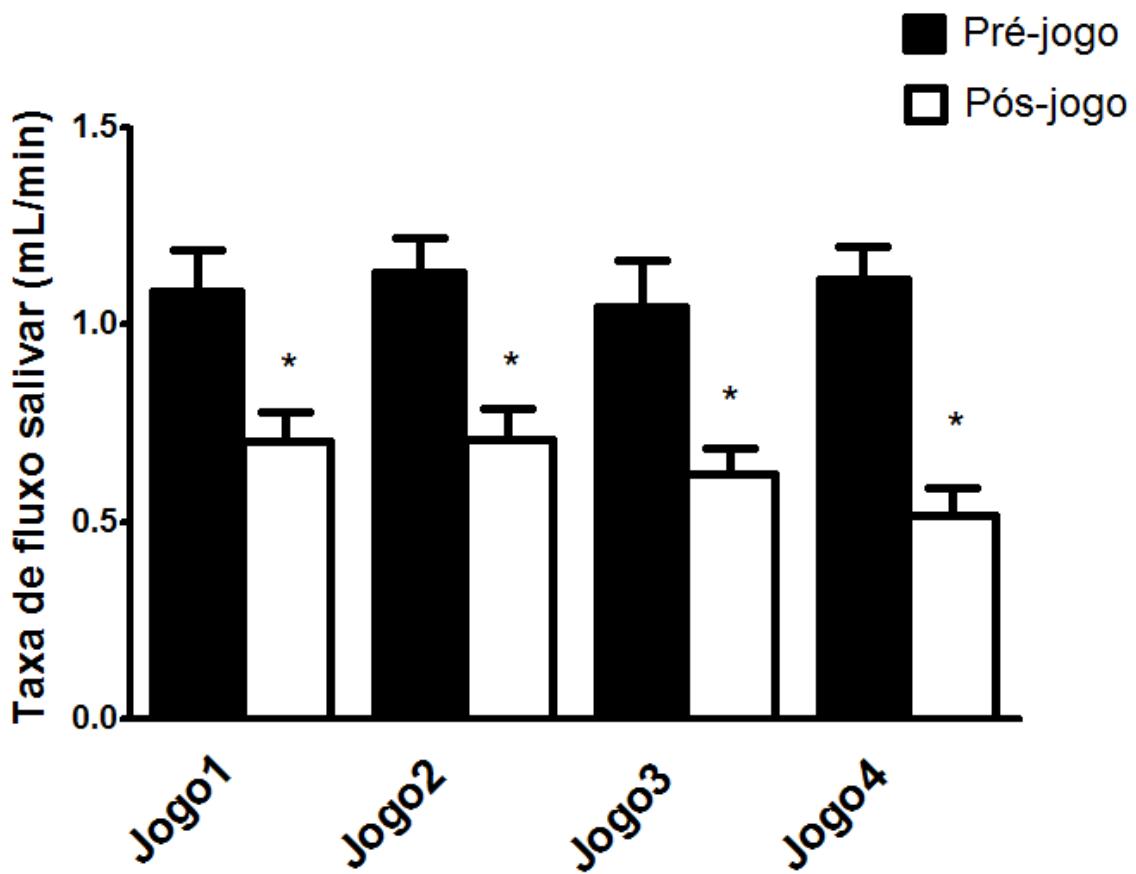
#### 4 Estatística

Foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), havendo normalidade fizemos a análise de variância (ANOVA) entre os momentos pré e pós de todos os quatro jogos, entre somente os momentos pré e somente entre os momentos pós. Para saber entre quais momentos haveria diferença significante aplicamos o *post-hoc* de *tukey*. O nível de significância adotado foi de  $p<0,05$ . O programa utilizado foi o *graph-pad prism*.

### 5 Resultados

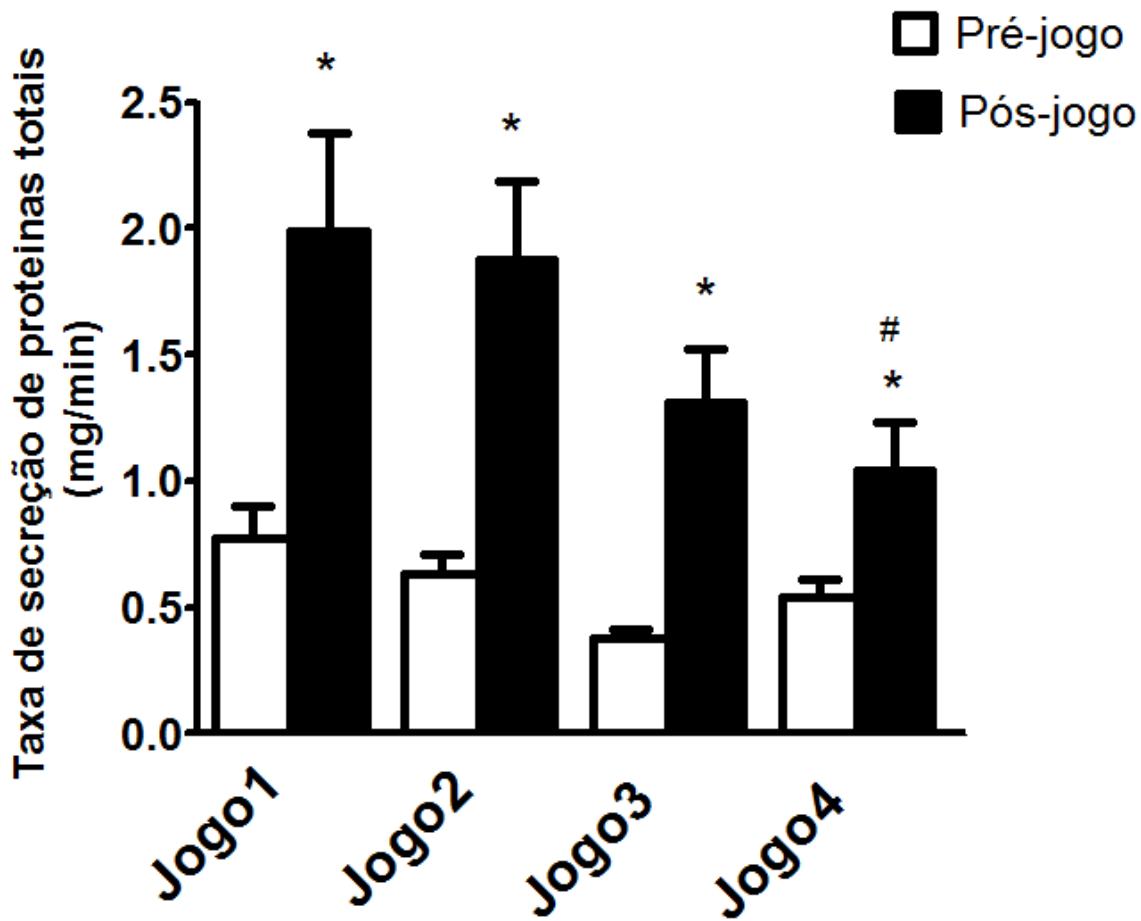
#### 5.1 Efeito da competição no fluxo salivar, proteína total, atividade da amilase salivar e cortisol salivar

Quanto ao fluxo salivar observamos redução do mesmo após todos os jogos analisados (**Figura 2**)



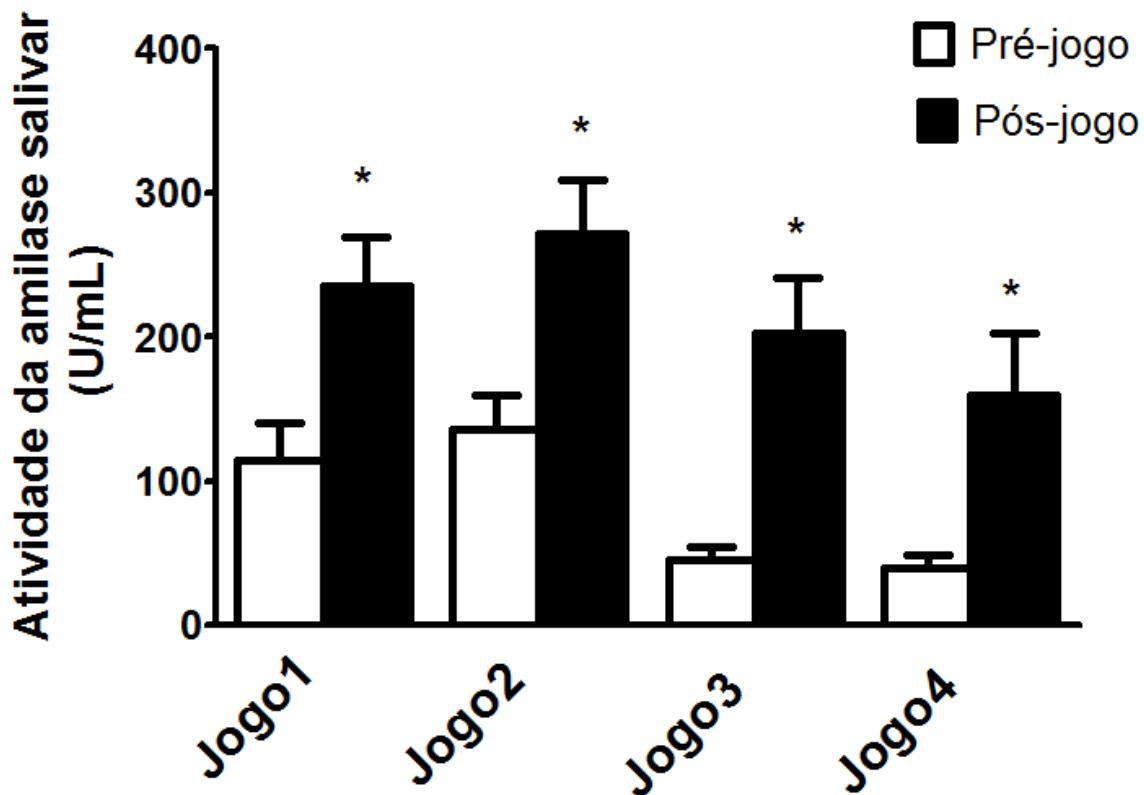
**Figura 2:** Fluxo salivar em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ );  $n=14$ .

No que diz respeito à taxa de secreção de proteínas totais, foi verificado em todos os jogos, aumento nos momentos pós-partida quando comparado aos momentos pré, indicando diferença estatisticamente significativa entre os momentos pré e pós-partidas  $p=0,0157$ . Quando comparado o momento pós-partida do jogo 1 versus o momento pós-partida do jogo 4, foi verificado diferença estatística significante  $p=0,0157$ .



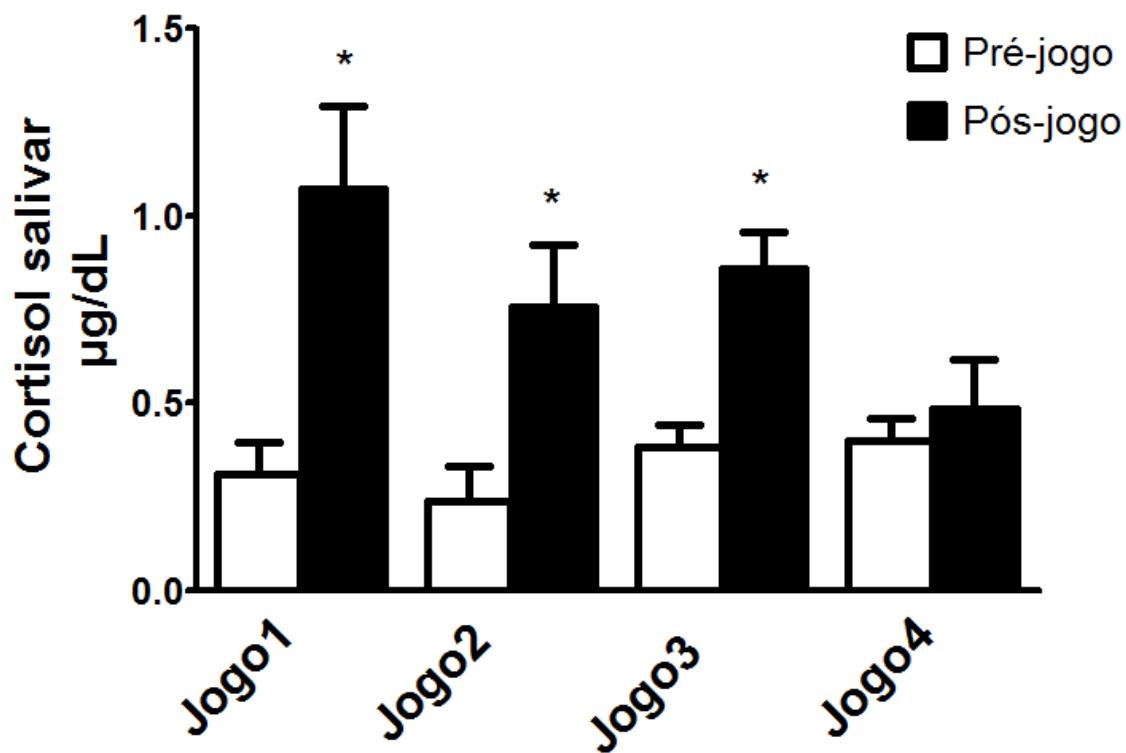
**Figura 3.** Taxa secreção de proteínas totais em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas entre os momentos pré e pós (Teste de Anova oneway,  $p=0,0157$ ); # Diferenças significativas entre o momento pós do jogo 1 versus momento pós do jogo 4 (Teste de Anova oneway,  $p=0,0157$ );  $n=14$ .

A atividade da enzima alfa-amilase apresentou aumento nos momentos pós-partida quando comparado aos momentos pré-partida de todos os quatro jogos. Indicando diferença estatisticamente significativa entre os momentos pré e pós-partidas  $p= 0,0150$  (**Figura 4**).



**Figura 4.** Atividade da alfa-amilase salivar em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $p= 0,0150$ );  $n=14$ .

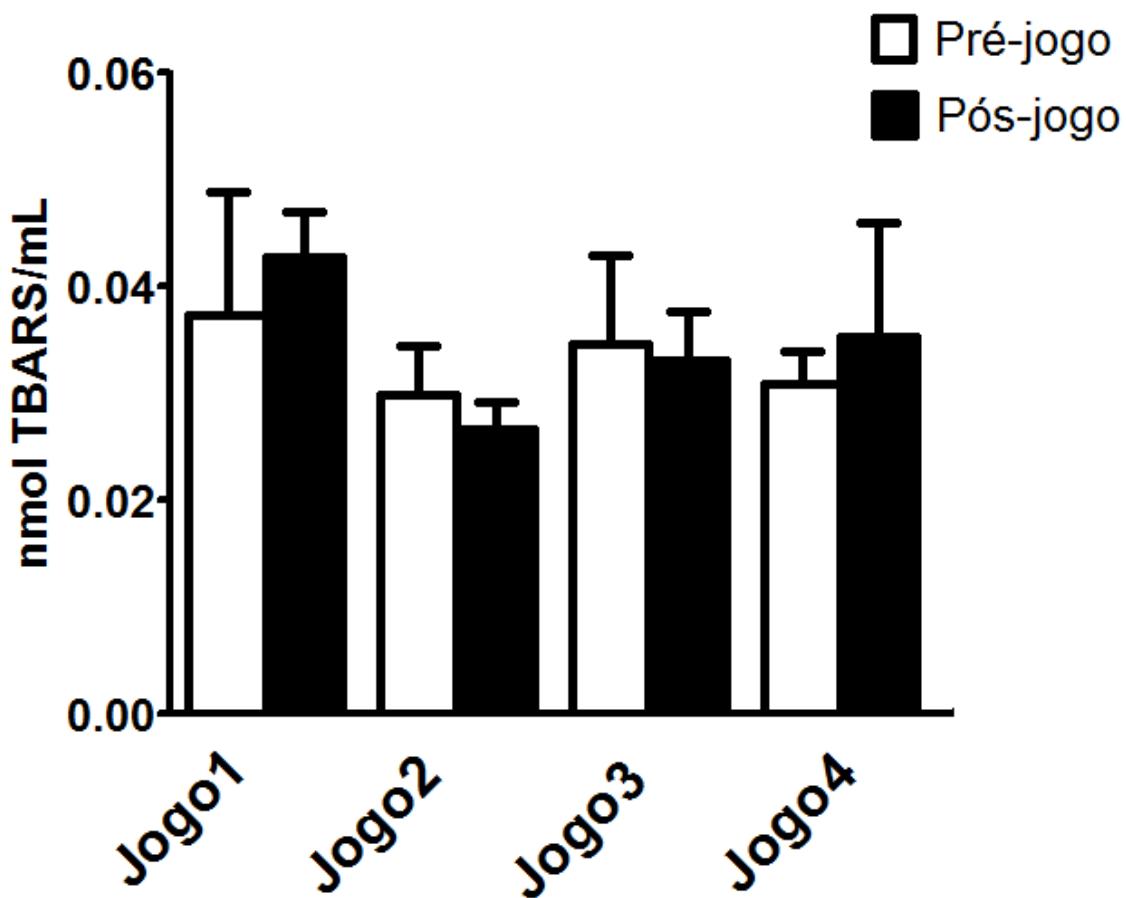
Como observado na **figura 5**, as concentrações de cortisol foram maiores nos momentos pós-partida em relação aos momentos pré-partida de todos os jogos, porém, diferenças estatisticamente significantes foi verificada nos jogos 1,2 e 3 ( $p= 0,0006$ ).



**Figura 5.** Concentração de cortisol salivar em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* Diferenças significativas (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ ).

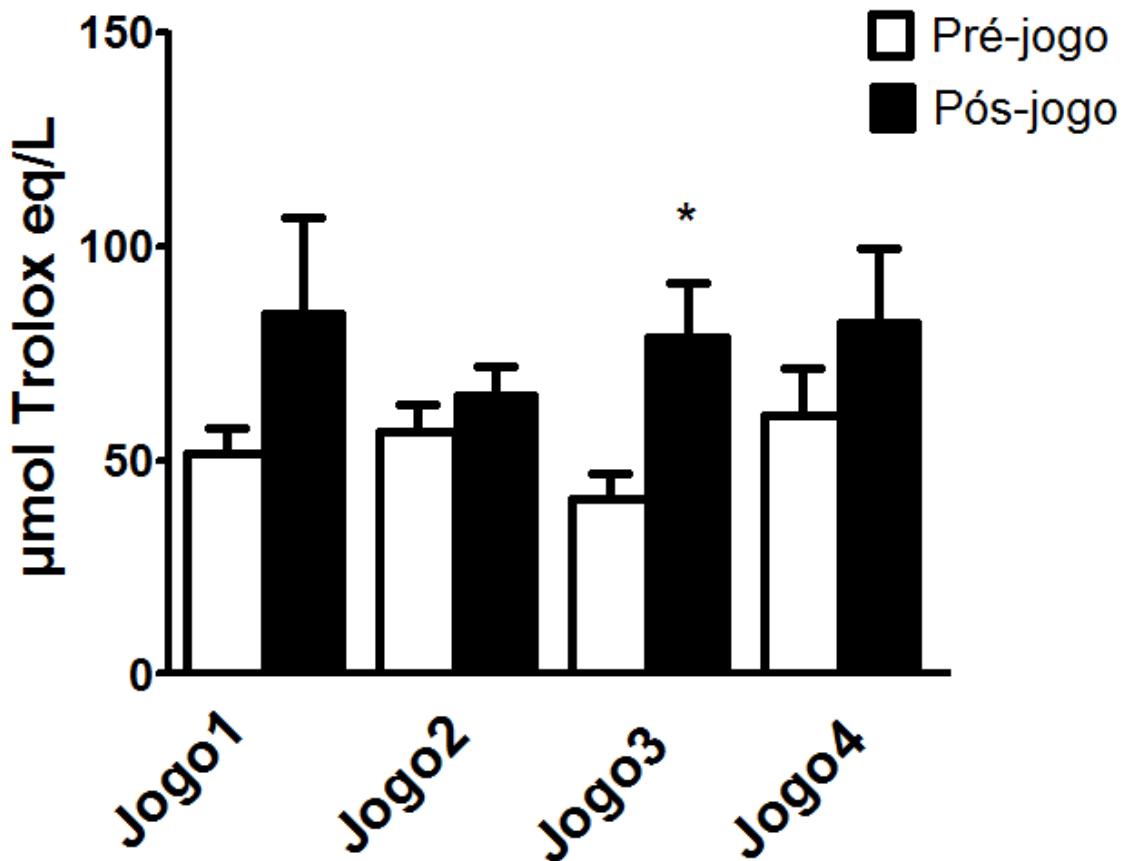
## 5.2 Efeito da competição sobre marcadores de estresse oxidativo salivares

As concentrações dos produtos de peroxidação lipídica (**Figura 6**) não mostram aumento do dano oxidativo à lipídeos, no momento pós-partida, em nenhum dos quatro jogos analisados.



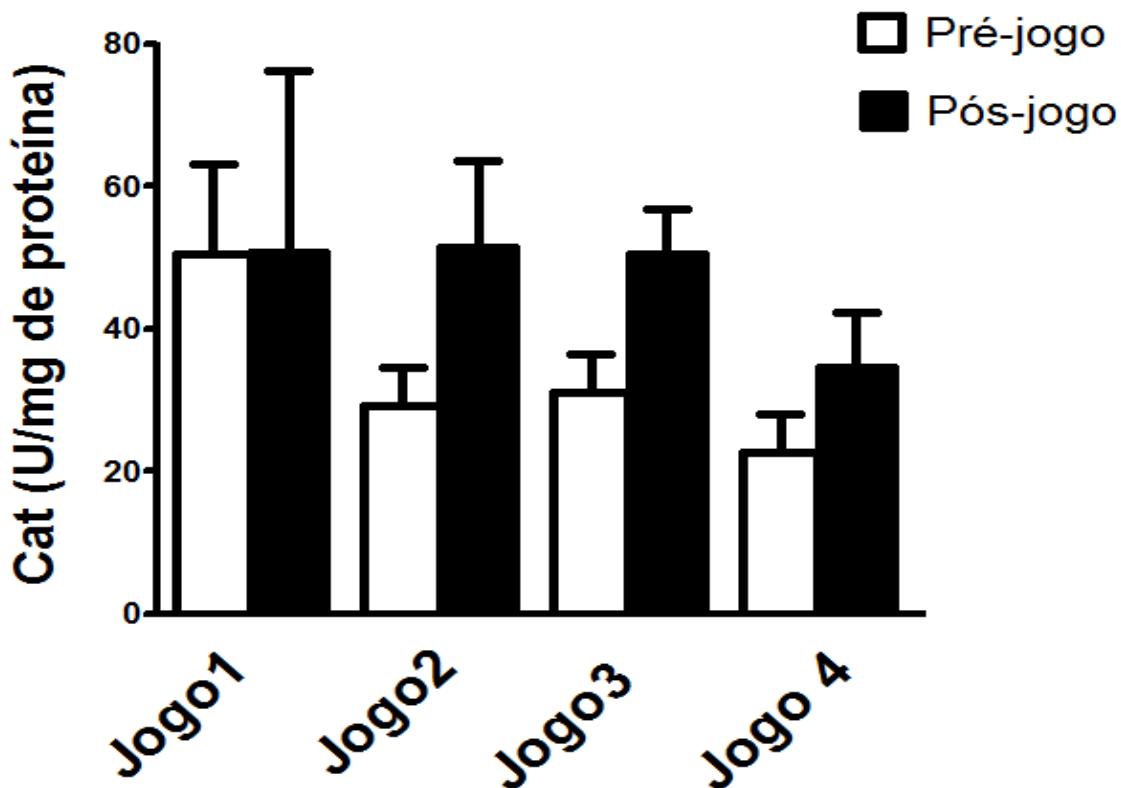
**Figura 6.** Concentrações salivares de produtos de peroxidação lipídica em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=14$ .

Quanto à capacidade antioxidante total (**Figura 7**) apresentou aumento significativo no momento pós-partida em relação ao momento pré-partida do jogo 3, indicando diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0120$ ) . Os jogos 1, 2 e 4 apresentaram aumento na capacidade antioxidante total, entretanto não foi suficiente para provocar alterações estatisticamente significantes ( $p=0,3123$ ).



**Figura 7.** Avaliação da atividade antioxidante total da saliva em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* Diferenças significativas entre o momento pré e pós do jogo 3 (Teste de Anova oneway,  $P<0.05$ );  $n=14$

A atividade da enzima catalase foi aumentada no momento pós-partida em relação ao momento pré-partida dos jogos 1, 2, 3, 4, entretanto, não foi verificado diferenças estatisticamente significantes entre os valores ( $p=0,0710$ ).



**Figura 8.** Avaliação da atividade da enzima catalase em atletas jogadores de futebol antes e após quatro jogos de futebol consecutivos (24h de descanso entre cada jogo). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; n=14.

## 6 – Discussão

Para uma melhor compreensão, do que um período competitivo, em atletas de futebol, provoca nos marcadores salivares de estresse, é necessário entender o comportamento e mecanismos de secreção de proteínas na saliva. Segundo (Navazesh and Kumar, 2008) as glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) produzem cerca de 90% das secreções salivares, enquanto as glândulas menores (labial, bucal e palatal) produzem os 10% restantes. No geral, os nervos simpáticos são responsáveis pela secreção de proteínas, enquanto os nervos parassimpáticos são responsáveis pela secreção de água e eletrólitos (Diaz et al., 2012).

De acordo com a nossa hipótese inicial, nos momentos pós-jogos comparados aos pré-jogos de todas as partidas, encontramos um aumento na atividade da alfa-amilase e na taxa de secreção de proteínas totais. Quando

comparamos isoladamente somente os momentos pré de todos os jogos não obtivemos diferença significante e quando comparamos somente os momentos pós de todos os jogos obtivemos uma redução significativa na taxa de secreção de proteína do jogo 4 comparada ao jogo 1.

Nossos achados corroboram com os dados de outros estudos (Chiodo et al., 2011; Diaz et al., 2012) que avaliaram as respostas de marcadores de estresse em situações adversas. O primeiro estudo verificou aumento da atividade da alfa-amilase salivar após combates de *taekwondo* e no segundo estudo foi verificado aumento da atividade da alfa-amilase e proteínas totais após competição de natação.

Um possível mecanismo para o aumento na atividade da sAA é a sua liberação dos grânulos secretores, tal procedimento ocorre principalmente via exercício físico induzindo a ativação de receptores beta (Castle and Castle, 1998), o que pode aumentar a atividade simpática e alterar a secreção na glândula salivar (Schneider et al., 2000). Outra possível resposta para o aumento da sAA e taxa de secreção de proteína total é a desidratação durante o exercício físico prolongado, ocasionando a redução do fluxo salivar (Walsh et al., 2004). Devido ao tempo total (90 minutos) e estímulos de altas intensidades exigidas em cada jogo de futebol, os atletas ao final da partida encontram-se desidratados. Nosso estudo não verificou a desidratação dos atletas, entretanto apresentou reduções na taxa de fluxo salivar após os quatro jogos, corroborando com a ideia que o fluxo salivar reduzido pode vir a ser um marcador de desidratação (Walsh et al., 2004).

Em relação à concentração de cortisol salivar, a previsão era de que ocorresse alterações significativas entre os momentos pré-jogos da competição ou, somente entre os momentos pós-jogos, entretanto, não foi o que observamos. Porem ocorreu diferenças significativas quando comparados os momentos pré-jogos com os momentos pós-jogos. Nossos resultados são consistentes com alguns estudos envolvendo competição (Haneishi et al., 2007; Kraemer et al., 2001; Mortatti et al., 2012), mas não com outros (Moreira et al., 2009).

Devido à situação desafiadora da competição, componentes psicológicos contribuem em grande parte para o aumento do cortisol. Em estudo realizado por (Elloumi et al., 2003) os níveis de cortisol aumentaram significativamente após jogo de rúgbi, entretanto, quando o jogo foi simulado em laboratório, os níveis de cortisol não corresponderam da mesma forma. Os voluntários do nosso estudo são atletas amadores, apresentando diferenças em relação atletas de elite, diante disso, sentimentos relacionados ao estresse, medo, angústia, nervosismo podem influenciar no aumento de cortisol nessa população.

Além disso, fatores fisiológicos devem ser levados em consideração. Já é bem estabelecido que o aumento do cortisol é dependente da intensidade do exercício (Few, 1974). O futebol é um esporte que exige muito de componentes aeróbios e anaeróbios, a distância total percorrida por um jogador é cerca de 10 a 12 km em 90 minutos e os *sprints* ocorrem uma vez a cada 30 a 90 segundos (Kirkendall, 2000). Competições organizadas no contexto amador não disponibilizam uma infraestrutura e organização como em esportes de elite, assim, o tempo total de competição é reduzido, consequentemente, vários jogos são realizados durante a semana de competição, o pouco tempo entre um jogo e outro faz com que os atletas não se recuperem por completo, podendo aumentar ainda mais o estresse.

No que diz respeito às alterações no balanço redox, os danos de peroxidação lipídica através do ensaio de TBARS na saliva dos jogadores não apresentaram diferenças significantes. Nossos achados estão de acordo com (Djordjevic et al., 2012). Por outro lado nossos resultados não corroboram com o estudo de (Ispirlidis et al., 2008), que verificou danos de peroxidação lipídica imediatamente após o término de uma partida de futebol competitiva em análises feitas no plasma. Este resultado pode ser explicado pela eficiência do treinamento pré-competição em promover adaptações nas defesas antioxidantes. Tais adaptações são relatadas nos estudos de (Ascensao et al., 2008; Silva et al., 2014).

A atividade antioxidante total aumentou em todos os jogos nos momentos pós-partida, porém, somente no jogo 3 houve diferença significativa.

Fato que também pode explicar a atenuação dos dados de peroxidação lipídica. Nossos achados estão de acordo com vários autores (Ispirlidis et al., 2008; José et al., 2009; Gonzalez et al., 2008), mas não com outros (Atsumi et al., 1999; Atsumi et al., 2008). O aumento da capacidade antioxidante total é consequência da mobilização das reservas de vitamina C e E como mecanismo de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (Finaud et al., 2006) ou significante aumento da síntese de ácido úrico ocasionado pela ativação da xantina oxidase (Ascenso et al., 2008). Esse aumento da capacidade antioxidante total reflete as defesas antioxidante melhoradas, em resposta ao período de treinamento, antes da competição. Os atletas do presente estudo realizaram treinamentos específicos do futebol (técnico, tático, físico) durante 6 meses, o que provavelmente gerou adaptações enzimáticas necessárias para combater o estresse oxidativo. Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a verificar a capacidade antioxidante total na saliva durante período competitivo de atletas de futebol.

Embora a atividade da enzima catalase apresentou aumento em todos os momentos pós jogo, não foi verificado diferença estatisticamente significante. O aumento da expressão e atividade da catalase no músculo esquelético em resposta ao exercício crônico é controverso, com estudos relatando aumento, diminuição, ou nenhuma alteração (Powers and Jackson, 2008). Para nosso conhecimento, dois estudos relacionaram atividade da catalase, saliva e exercício (Benitez-Sillero et al., 2011; Cavas et al., 2005), entretanto, nenhum deles verificou o efeito da competição sobre esta enzima antioxidante.

Vários resultados do nosso estudo merecem destaque, esse é o primeiro estudo a verificar a atividade da alfa-amilase e a taxa de secreção de proteínas totais como marcadores de estresse na saliva de jogadores de futebol em período competitivo. Através desses marcadores verificamos que a atividade autônoma reduziu do início da competição até o último jogo, supomos que isso ocorreu devido a uma redução da atividade simpática, em consequência principalmente da fadiga acumulada nos jogadores, levando os atletas a uma queda na intensidade dos gestos esportivos (correr, saltar, caminhar, chutar). Assim, corroborando com os resultados de (Diaz et al., 2012), sugerimos a

utilização da taxa de secreção de proteínas totais como um marcador da atividade autônoma, pois do ponto de vista laboratorial é uma alternativa rápida, barata e mais prática quando comparada aos ensaios cinéticos ou imunológicos tradicionais.

Nosso estudo é um dos poucos a verificar o estresse oxidativo na saliva de jogadores de futebol durante um período de competição. Embora, só verificamos diferenças significantes na capacidade antioxidante total, acreditamos que estudos futuros sobre estresse oxidativo na saliva de jogadores, principalmente na atividade de outras enzimas antioxidantes como SOD, GPX, são necessários. O fato de a saliva ser amostras biológicas de coleta não invasiva, a facilidade e rapidez das suas análises faz com que esse biofluído seja coletado no próprio ambiente de treinamento dos atletas, facilitando o planejamento dos técnicos e preparadores físicos de equipes desportivas, evitando futuras lesões e otimizando o rendimento.

## **7 – Conclusões**

O conjunto dos dados nos permite dizer que a atividade da amilase salivar e a taxa de secreção de proteínas apresentaram comportamento similar após período de competição em futebol. Acreditamos que tais comportamentos das proteínas foram principalmente devido à atividade simpática, influenciada pelos estímulos exigidos no futebol. A taxa de secreção de proteínas totais pode ser utilizada como um possível marcador de atividade autônoma, principalmente pela facilidade e simplicidade do método. As concentrações de cortisol refletiram o estresse que a competição gerou aos atletas, fato esse ocorreu principalmente por fatores psicológicos e fisiológicos relacionados às altas demandas físicas exigidas pelo futebol. No que diz respeito ao estresse oxidativo, durante o período de competição não foi verificado danos de peroxidação na saliva de jogadores, entretanto, a capacidade antioxidante total aumentou, indicando melhorias nas defesas e atenuando os danos oxidativos.

## Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Declaramos não haver conflito de interesse.

## 8 – Referências

- Aebi, H., 1984, Catalase in vitro: Methods Enzymol, v. 105, p. 121-6.
- Ascensao, A., A. Rebelo, E. Oliveira, F. Marques, L. Pereira, and J. Magalhaes, 2008, Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery: Clin Biochem, v. 41, p. 841-51.
- Atsumi, T., I. Iwakura, Y. Kashiwagi, S. Fujisawa, and T. Ueha, 1999, Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise: Antioxid Redox Signal, v. 1, p. 537-46.
- Atsumi, T., K. Tonosaki, and S. Fujisawa, 2008, Salivary free radical-scavenging activity is affected by physical and mental activities: Oral Dis, v. 14, p. 490-6.
- Barros, T. and Guerra, I. *Ciência do Futebol*. São Paulo: Manole, 2004.
- Benitez-Sillero, J. D., J. L. Perez-Navero, I. Tasset, M. Guillen-Del Castillo, M. Gil-Campos, and I. Tunez, 2011, Cardiorespiratory fitness and oxidative stress: effect of acute maximal aerobic exercise in children and adolescents: J Sports Med Phys Fitness, v. 51, p. 204-10.
- Benzie, I. F., and J. J. Strain, 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay: Anal Biochem, v. 239, p. 70-6.
- Bosch, J. A., E. C. Veerman, E. J. de Geus, and G. B. Proctor, 2011, alpha-Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet!: Psychoneuroendocrinology, v. 36, p. 449-53.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: Anal Biochem, v. 72, p. 248-54.
- Buege, J. A., and S. D. Aust, 1978, Microsomal lipid peroxidation: Methods Enzymol, v. 52, p. 302-10.

Castle, D., and A. Castle, 1998, Intracellular transport and secretion of salivary proteins: *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 9, p. 4-22.

Cavas, L., P. Arpinar, and K. Yurdakoc, 2005, Possible interactions between antioxidant enzymes and free sialic acids in saliva: a preliminary study on elite judoists: *Int J Sports Med*, v. 26, p. 832-5.

Chiodo, S., A. Tessitore, C. Cortis, G. Cibelli, C. Lupo, A. Ammendolia, M. De Rosas, and L. Capranica, 2011, Stress-related hormonal and psychological changes to official youth Taekwondo competitions: *Scand J Med Sci Sports*, v. 21, p. 111-9.

Diaz, M. M., O. L. Bocanegra, R. R. Teixeira, S. S. Soares, and F. S. Espindola, 2012, Response of salivary markers of autonomic activity to elite competition: *Int J Sports Med*, v. 33, p. 763-8.

Djordjevic, B., I. Baralic, J. Kotur-Stevuljevic, A. Stefanovic, J. Ivanisevic, N. Radivojevic, M. Andjelkovic, and N. Dikic, 2012, Effect of astaxanthin supplementation on muscle damage and oxidative stress markers in elite young soccer players: *J Sports Med Phys Fitness*, v. 52, p. 382-92.

Elloumi, M., F. Maso, O. Michaux, A. Robert, and G. Lac, 2003, Behaviour of saliva cortisol [C], testosterone [T] and the T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days: *Eur J Appl Physiol*, v. 90, p. 23-8.

Few, J. D., 1974, Effect of exercise on the secretion and metabolism of cortisol in man: *J Endocrinol*, v. 62, p. 341-53.

Finaud, J., G. Lac, and E. Filaire, 2006, Oxidative stress : relationship with exercise and training: *Sports Med*, v. 36, p. 327-58.

Gonzalez, D., R. Marquina, N. Rondon, A. J. Rodriguez-Malaver, and R. Reyes, 2008, Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva: *Res Sports Med*, v. 16, p. 128-37.

Granger DA, Kivlighan KT, El-Sheikh M. Salivary  $\alpha$ -amylase in Biobehavioral Research: Recent Developments and Applications. New York Acad Sci. 2007;1098:122-44.

Guerrero, J., González, D, R Marquina, Zambrano Jean C, A. J. Rodriguez-Malaver, R Reyes 2009, Exhaustive physical exercise causes a decrease in oxidative stress and an increase in salivary total antioxidant activity of elite triathlete: *Rev Fac Farm*, v 51 (1): 2-7.

Haneishi, K., A. C. Fry, C. A. Moore, B. K. Schilling, Y. Li, and M. D. Fry, 2007, Cortisol and stress responses during a game and practice in female collegiate soccer players: *J Strength Cond Res*, v. 21, p. 583-8.

Ispirlidis, I., I. G. Fatouros, A. Z. Jamurtas, M. G. Nikolaidis, I. Michailidis, I. Douroudos, K. Margonis, A. Chatzinikolaou, E. Kalistratos, I. Katrabasas, V.

Alexiou, and K. Taxildaris, 2008, Time-course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game: *Clin J Sport Med*, v. 18, p. 423-31.

Kraemer, W. J., A. C. Fry, M. R. Rubin, T. Triplett-McBride, S. E. Gordon, L. P. Koziris, J. M. Lynch, J. S. Volek, D. E. Meuffels, R. U. Newton, and S. J. Fleck, 2001, Physiological and performance responses to tournament wrestling: *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, p. 1367-78.

Moreira, A., F. Arsati, Y. B. de Oliveira Lima Arsati, D. A. da Silva, and V. C. de Araujo, 2009, Salivary cortisol in top-level professional soccer players: *Eur J Appl Physiol*, v. 106, p. 25-30.

Mortatti, A. L., A. Moreira, M. S. Aoki, B. T. Crewther, C. Castagna, A. F. de Arruda, and J. M. Filho, 2012, Effect of competition on salivary cortisol, immunoglobulin A, and upper respiratory tract infections in elite young soccer players: *J Strength Cond Res*, v. 26, p. 1396-401.

Navazesh, M., and S. K. Kumar, 2008, Measuring salivary flow: challenges and opportunities: *J Am Dent Assoc*, v. 139 Suppl, p. 35s-40s.

Powers, S. K., and M. J. Jackson, 2008, Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production: *Physiol Rev*, v. 88, p. 1243-76.

Schneider, D. A., T. M. McLellan, and G. C. Gass, 2000, Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise: *Med Sci Sports Exerc*, v. 32, p. 608-13.

Silva, J. R., A. Rebelo, F. Marques, L. Pereira, A. Seabra, A. Ascensao, and J. Magalhaes, 2014, Biochemical impact of soccer: an analysis of hormonal, muscle damage, and redox markers during the season: *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 39, p. 432-8.

Walsh, N. P., J. C. Montague, N. Callow, and A. V. Rowlands, 2004, 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*, v. 49, p. 149-54.