



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

**EFEITOS DE DIFERENTES MODALIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO EM
INDIVÍDUOS TREINADOS SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES E
PLASMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INTENSIDADE DE EXERCÍCIO**

Aluna: Adriele Vieira de Souza

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Roland Teixeira

**UBERLÂNDIA – MG
2017**



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

**EFEITOS DE DIFERENTES MODALIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO EM
INDIVÍDUOS TREINADOS SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES E
PLASMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INTENSIDADE DE EXERCÍCIO**

Aluna: Adriele Vieira de Souza

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Roland Teixeira

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

UBERLÂNDIA - MG
2017

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

S729e
2018 Souza, Adriele Vieira de, 1993
Efeitos de diferentes modalidades de exercício físico em indivíduos treinados sobre biomarcadores salivares e plasmáticos de estresse oxidativo e intensidade de exercício [recurso eletrônico] / Adriele Vieira de Souza. - 2018.

Orientador: Foued Salmen Espindola.

Coorientadora: Renata Roland Teixeira.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.807>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. 2. Saliva. 3. Stress oxidativo. 4. Exercícios. I. Espindola, Foued Salmen, (Orient.). II. Teixeira, Renata Roland, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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

**EFEITOS DE DIFERENTES MODALIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO EM
INDIVÍDUOS TREINADOS SOBRE BIOMARCADORES SALIVARES E
PLASMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INTENSIDADE DE EXERCÍCIO**

ALUNA: Adriele Vieira de Souza

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Foued Salmen Espindola

Examinadores: Dr. Álvaro Reischak de Oliveira
Dr^a. Cláudia Regina Cavaglieri

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas.

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adriana e João, pelo amor incondicional, carinho, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos que me são concedidas.

Aos meus pais João Vieira Neto e Adriana Silva de Souza Vieira, pelo amor, apoio e incentivo, em tudo o que faço. Obrigada por tudo o que me ensinaram durante todos estes anos, amo muito vocês.

À toda a minha família que sempre me apoiou. Agradecimentos especiais ao meu irmão Hugo César Silva de Souza e minha avó Zenaide Silva e Souza, que amo tanto e sempre estão presentes em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela oportunidade no desenvolvimento deste trabalho e por todo o conhecimento compartilhado, que contribuíram muito para meu crescimento como pesquisadora.

À minha amiga Danielle Diniz Vilela, pelo enorme auxílio nas coletas, além da companhia e apoio na realização deste projeto e de tantos outros.

Ao Prof. Dr. Leonardo Gomes Peixoto, que sempre se disponibilizou a me ajudar no que fosse preciso, além de ser um grande amigo. Muito obrigada!

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Renata Roland Teixeira, por toda a dedicação que tem comigo durante todos estes anos de laboratório. Agradeço por toda ajuda e apoio desde sempre.

À minha amiga educadora física Jéssica Sanjulião Giolo e seu orientador Prof. Dr. Guilherme Morais Puga. O apoio de vocês neste trabalho foi fundamental, muito obrigada! Agradecimentos também aos alunos e técnicos do CENESP/UFU, que sempre me receberam bem e ajudaram no que fosse preciso.

À todos os voluntários que aceitaram participar desta pesquisa! Sei que não foi nada fácil o grande número de visitas, os exercícios exaustivos, quantidade de coletas e ainda o grande tempo de espera pós-exercício. Meu muito obrigada aos treze participantes que concluíram todos os testes, muitos dos quais se tornaram meus amigos.

Aos meus grandes amigos de laboratório, que são minha segunda família: Douglas Carvalho Caixeta, Larissa Pereira Caetano, Allisson Benatti Justino, Mariana Nunes Pereira, Heitor Cappato Guerra Silva, Júlia Silveira Queiroz e Rodrigo Rodrigues Franco. Pelos momentos de bancada, cheios de muito trabalho e estudo, porém cheios de muitas risadas também. Obrigada pela companhia e apoio sempre de vocês.

À Prof^a. Dr^a. Françoise Vasconcelos Botelho e todos os membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular.

Às minhas grandes amigas Jessica Brito de Souza, Lívia Martins Faria e Lorena Polloni, pela companhia e por todo o apoio prestado durante meu mestrado. Guardo vocês no meu coração.

À todos os colegas, professores e técnicos do Instituto de Genética e Bioquímica. Agradecimentos especiais à secretária Janaína de Souza Mota, que sempre nos ajuda com tudo o que precisamos, sempre com um sorriso no rosto.

À Universidade Federal de Uberlândia e aos órgãos de fomento FAPEMIG, CNPq e Capes, por toda a estrutura e apoio financeiro fornecidos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Voluntários	8
3.2. Desenho experimental.....	8
3.2.1. Coleta e processamento das amostras de sangue e saliva	10
3.2.2. Determinação dos biomarcadores salivares de intensidade de exercício.....	10
3.2.2.1. Atividade de amilase salivar.....	10
3.2.2.2. Concentração de proteína total.....	11
3.2.3. Concentração de Óxido Nítrico (NO) salivar	11
3.2.4. Determinação dos níveis de proteína carbonilada no plasma.....	11
3.2.5. Determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo plasmáticos e salivares.....	12
3.2.5.1. Capacidade Antioxidante Total (FRAP)	12
3.2.5.2. Níveis de Glutathiona reduzida (GSH).....	12
3.2.5.3. Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	12
3.2.5.4. Atividade de catalase (CAT)	13
3.2.5.5. Concentração de Ácido úrico	13
3.3. Análises estatísticas	13
4. RESULTADOS	14
4.1. Análise dos biomarcadores salivares de intensidade de exercício antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER	14
4.1.1. Atividade de amilase salivar.....	14
4.1.2. Concentração de proteína total.....	15
4.2. Concentração de Óxido Nítrico salivar antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER.....	15
4.3. Determinação dos níveis de proteína carbonilada no plasma antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER.....	16
4.4. Determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo plasmáticos e salivares antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER	17
4.4.1. Capacidade Antioxidante Total (FRAP)	17
4.4.2. Níveis de Glutathiona reduzida (GSH).....	17
4.4.3. Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	18
4.4.4. Atividade de catalase (CAT)	19
4.4.5. Concentração de Ácido úrico	19
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS	31

RESUMO

O aumento das respostas antioxidantes promovido pela prática de exercícios físicos está fortemente associado com a atenuação do estresse oxidativo crônico e à melhora da saúde cardiometabólica induzida pelo exercício. Assim, é importante compreender como diferentes tipos de exercício podem promover diferencialmente estas alterações bioquímicas. Neste trabalho, 13 indivíduos do sexo masculino fisicamente treinados foram submetidos a 3 diferentes protocolos agudos de exercício físico: HIIE - Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês High Intensity Interval Exercise, desempenhado em cicloergômetro, com 1 minuto de exercício a 100% do VO_{2max} seguido de 1 minuto de recuperação passiva a 40% do VO_{2max} até a exaustão voluntária); EC - Exercício Contínuo (realizado em cicloergômetro, consistindo em um exercício contínuo de 60 minutos com intensidade entre 50 e 60% do VO_{2max}); e ER - Exercício Resistido (3 séries de 12 repetições máximas dos exercícios resistidos de agachamento, leg press, mesa flexora e stiff). Amostras de sangue e saliva foram coletadas nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. Foram avaliados biomarcadores de estresse oxidativo (capacidade antioxidante total, conteúdo de proteína carbonilada, atividade de superóxido dismutase e catalase, níveis de glutathiona reduzida e ácido úrico), marcadores de intensidade de exercício (proteína total salivar e atividade de amilase), além da concentração de óxido nítrico salivar. Como resultado, todos os protocolos apresentaram aumento na concentração de proteína total e atividade de amilase salivar, indicando a similar e alta carga dos exercícios, que é caracterizada pela relação da intensidade e do volume dos testes. Também foi verificado o aumento nos níveis de óxido nítrico, que foi maior no momento 3 horas pós-exercício. O perfil de resposta antioxidante das amostras salivares mostrou-se muito similar ao plasma, indicando a saliva como uma ferramenta alternativa no estudo do estresse oxidativo em diferentes protocolos de exercício. De forma geral, a resposta antioxidante aumentou após os exercícios, de modo que a sessão de HIIE mostrou um padrão de resposta antioxidante similar ao EC, enquanto que o ER apresentou menores alterações. Dessa forma, sugere-se que as adaptações favoráveis que ocorrem em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo exercício possam ser alcançadas de forma relativamente rápida através da prática do treinamento intervalado de alta intensidade.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Exercício; Plasma; Saliva; Biomarcadores.

ABSTRACT

The increase in antioxidant responses promoted by physical exercise is strongly associated with the attenuation of chronic oxidative stress and the improvement of cardiometabolic health induced by exercise. Thus, it is important to understand how distinct types of exercises can promote these biochemical alterations. In this study, 13 physically trained male subjects were submitted to 3 different acute physical exercise protocols: HIIE - High Intensity Interval Exercise, performed on a cycle ergometer, with 1 minute of exercise at 100% of VO_{2max} followed by 1 minute of passive recovery at 40% of VO_{2max} until voluntary exhaustion); EC - Continuous Exercise (performed on a cycle ergometer, consisting of a continuous exercise of 60 minutes with intensity between 50 and 60% of VO_{2max}); ER - Resistance Exercise (3 sets of 12 maximum repetitions of resistance exercises of squat, leg press, flexor and stiff exercises). Blood and saliva samples were collected at the points: pre-exercise, post-exercise and 3 hours post-exercise. Biomarkers of oxidative stress (total antioxidant capacity, protein carbonylation, superoxide dismutase and catalase activities, levels of reduced glutathione and uric acid), markers of exercise intensity (salivary total protein and amylase activity) and salivary nitric oxide were evaluated. As a result, all exercise protocols showed increased protein concentration and salivary amylase activity at the post-exercise moment, indicating the similar and high load of the exercises, which is characterized by the intensity and volume ratio of the tests. An increase in nitric oxide levels was also observed, which was verified to be higher 3 hours after the protocols were performed. The antioxidant response profile of salivary samples was very similar to plasma, indicating saliva as an alternative tool in the study of oxidative stress in different exercise protocols. In general, antioxidant response was increased after exercise and it was found that a HIIE session exerts a similar pattern of antioxidant response compared to EC, while ER presented minor alterations. Thus, it is suggested that the favorable adaptations that occur in response to exercise-induced oxidative stress can be achieved relatively quickly through the practice of the high-intensity interval training.

Keywords: Oxidative stress; Exercise; Plasma; Saliva; Biomarkers.

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que a prática de exercício físico regular traz diversos benefícios para a saúde e representa uma forma de tratar e prevenir doenças crônico-degenerativas. Assim, indivíduos fisicamente ativos tendem a apresentar redução da pressão arterial, melhoras na tolerância à glicose e perfil lipídico, menores chances de desenvolvimento de obesidade, entre outros benefícios à saúde em geral (Adamu *et al.*, 2006; Ahlskog *et al.*, 2011). Entretanto, é fundamental compreender como os tipos, a intensidade, a duração e a frequência do exercício podem proporcionar os diferentes benefícios que a prática do mesmo pode proporcionar.

Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na resposta ao exercício físico, tais como modificações em mecanismos de sinalização celular e alteração da expressão gênica, de forma que os treinamentos resistido e aeróbio promovem diferentes perfis adaptativos (Coffey e Hawley, 2007; Egan e Zierath, 2013; Nielsen *et al.*, 2014). O primeiro está relacionado ao desenvolvimento de força e massa muscular, envolvendo diversos grupos musculares durante um determinado e constante período de tempo. Já o exercício aeróbio é caracterizado pela alta utilização de oxigênio para gerar energia nos músculos, fortemente relacionado com a melhora do sistema cardiovascular. Além disso, o aumento do tamanho das fibras musculares é fortemente relacionado ao exercício resistido, enquanto que o exercício aeróbio proporciona um maior estímulo mitocondrial (Holloszy e Booth, 1976; Fry, 2004; Egan e Zierath, 2013).

Dentre as diferentes modalidades de treino existentes, o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT – do inglês “high-intensity interval training”) tem se mostrado um protocolo alternativo aos treinos tradicionais, promovendo adaptações fisiológicas similares ou até mesmo superiores a estes. Esse treino pode ser definido como a prática de exercícios caracterizados por breves explosões de atividade vigorosa, intercaladas por períodos de descanso ou exercício de baixa intensidade (Gibala *et al.*, 2012).

A prática do HIIT tem ganhado muita atenção pelo fato de promover melhoras na aptidão tanto aeróbia quanto anaeróbia (Ziemann *et al.*, 2011). Além

disso, compreende um método de treino que pode ser realizado em um curto período de tempo, o que melhora a aderência ao treinamento, uma vez que a disponibilidade de tempo é considerada uma grande barreira para a prática regular de exercício físico pela população (Stutts, 2002; Trost *et al.*, 2002; Kimm *et al.*, 2006). Evidências sugerem também que o HIIT seja um método de treino mais agradável de ser praticado quando comparado a um exercício contínuo de intensidade moderada (Bartlett *et al.*, 2011).

Vários efeitos benéficos da prática do HIIT associado à saúde também já foram observados, tais como melhoras no sistema vascular (Ramos *et al.*, 2015), cardiorrespiratório (Williams e Kraemer, 2015) e também sobre o metabolismo da glicose, onde apresentou melhora do controle glicêmico em humanos portadores de diabetes tipo 2, de forma comparável ao exercício contínuo (Liubaoerjijin *et al.*, 2016). Além disso, recentemente foi observado que a prática de uma única sessão de exercício intervalado de alta intensidade está relacionada com o aumento da sensibilidade a insulina em indivíduos obesos (Parker, L. *et al.*, 2016).

Sabe-se que a prática de exercícios físicos intensos é acompanhada pela produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (Finkler *et al.*, 2014). As ROS constituem os radicais livres ou ânions e moléculas reativas que contêm átomos de oxigênio, tais como o radical hidroxila (OH^{\cdot}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito (ONOO^-) (Floyd, 1999). Em organismos aeróbios saudáveis, existe um balanço entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Entretanto, o excesso de ROS pode alterar este equilíbrio, levando ao processo conhecido como estresse oxidativo (Halliwell, 2007).

As ROS podem provocar danos oxidativos às células principalmente através da inativação enzimática, peroxidação lipídica e alterações do DNA (Floyd, 1999). A peroxidação dos lipídios das membranas celulares está entre uma das mais importantes consequências do estresse oxidativo, de forma que pode induzir alterações na fluidez da membrana e interferir na permeabilidade de íons, comprometendo assim a capacidade de seletividade celular para a entrada e saída de diferentes compostos (Halliwell e Chirico, 1993).

Outra importante consequência do estresse oxidativo é o processo de oxidação proteica, que pode ser mensurado através da quantificação de proteínas carboniladas (Fedorova *et al.*, 2014). As ROS podem danificar as proteínas através da reação direta com elas ou por meio indireto, através de seus produtos secundários gerados por reações com outras moléculas, como os lipídeos e açúcares. Essas reações de oxidação promovem modificações que podem acarretar na perda da função estrutural ou catalítica da proteína, além de torná-las mais susceptíveis a degradação proteolítica (Levine e Stadtman, 2001; Fedorova *et al.*, 2014).

Com o objetivo de neutralizar estas ROS e atenuar os danos promovidos pelo estresse oxidativo, o organismo possui um sistema antioxidante com mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Michiels *et al.*, 1994; Sies, 1997). A enzima Superóxido dismutase (SOD) é responsável pela catálise da dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001). Este composto é então neutralizado pela enzima Catalase (CAT) (Ferro *et al.*, 2010) e pelo sistema glutaciona (Dringen, 2000). A Glutaciona peroxidase (GPx) é uma enzima capaz de reduzir o H_2O_2 a partir da oxidação da glutaciona reduzida (GSH), formando Glutaciona oxidada (GSSG). Além disso, a enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (Glc6PDH) também participa deste ciclo e é responsável por fornecer o NADPH necessário para a ação da Glutaciona redutase (GR), que regenera a GSH a partir da GSSG (Dringen, 2000; Huber *et al.*, 2008).

Além da GSH mencionada acima, tem-se também outros antioxidantes não enzimáticos endógenos e exógenos que vão exercer seu papel neutralizando as ROS por diferentes mecanismos, tais como o ácido úrico, ácido lipóico, vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), compostos fenólicos, além dos diferentes minerais como ferro, cobre, zinco e manganês, que atuam como cofatores para diferentes enzimas antioxidantes (Finaud *et al.*, 2006; Pisoschi e Pop, 2015).

Apesar das consequências negativas do estresse oxidativo e ao fato deste estar relacionado a diversas doenças (Gupta *et al.*, 2014; Ogura e Shimosawa, 2014), sabe-se que a produção de ROS é fundamental para diversos mecanismos

fisiológicos, tais como processos de sinalização celular que aumentam a capacidade oxidativa muscular e promovem o aumento da capacidade antioxidante (Sen, 2001). As ROS estão envolvidas por exemplo, no controle do fator nuclear kB (NF-kB), relacionado à expressão de genes relacionados a inflamação, respostas ao estresse e apoptose; e no aumento do fator respiratório nuclear 1 (NRF1) e do coativador alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), estimulando assim processos de biogênese mitocondrial (Ji *et al.*, 2006; Powers *et al.*, 2010). Além disso, a produção de ROS por células do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos, consiste em um importante mecanismo de defesa do sistema imunológico (Galli *et al.*, 2011) .

A prática regular de exercícios físicos leva então a um processo adaptativo no organismo, em que a constante produção de ROS promovida pelo exercício estimula o aumento de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Tal processo adaptativo faz com que os indivíduos fisicamente treinados sejam menos susceptíveis ao dano oxidativo crônico (Radak *et al.*, 2001).

O exercício físico aeróbio é considerado um importante agente indutor de estresse oxidativo principalmente devido ao aumento nos níveis de consumo de oxigênio, que vão levar a uma maior liberação de ânions superóxido pela cadeia transportadora de elétrons (Sjodin *et al.*, 1990). Em contrapartida, apesar do exercício anaeróbio envolver menor circulação de oxigênio quando comparado com o aeróbio, também pode gerar o aumento de ROS por diferentes mecanismos e vias, tais como a ativação de xantina oxidase (Koyama *et al.*, 1999) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase) (Hessel *et al.*, 2000), pela lesão de isquemia-reperfusão (Ji, 1995), aumento do catabolismo de purinas (Starling *et al.*, 1996), danos as proteínas contendo ferro, interrupção da homeostase de Ca^{2+} e auto-oxidação de catecolaminas, uma vez que há um grande aumento destas durante exercícios de alta intensidade (Zouhal *et al.*, 1998; Bloomer *et al.*, 2005). Assim, é importante compreender melhor como tais exercícios podem alterar diferencialmente os biomarcadores de estresse oxidativo nos diferentes fluidos biológicos.

Algumas evidências sugerem ainda que o exercício pode afetar os marcadores de estresse oxidativo de forma variável, conforme o nível e tipo de

treinamento da população estudada, além de variações conforme a duração e intensidade do exercício aplicadas (Leaf *et al.*, 1997; Bloomer *et al.*, 2007; Park e Kwak, 2016).

Apesar do aumento da popularidade na prática do HIIT, seus efeitos sobre o sistema antioxidante ainda são pouco explorados (Deminice, Trindade, *et al.*, 2010; Bogdanis *et al.*, 2013; Parker, Lewan *et al.*, 2016; Parker, L. *et al.*, 2016; Wadley *et al.*, 2016; Cipryan, 2017; Parker *et al.*, 2017). Além disso, pelo nosso conhecimento, nenhum trabalho avaliou biomarcadores de estresse oxidativo salivares nesta modalidade de exercício.

A saliva representa uma ferramenta interessante para a busca de biomarcadores na área de pesquisa e medicina esportiva, principalmente pela facilidade no procedimento de coleta, que não é invasivo, não necessita de profissional qualificado para execução, e não causa dor e nem incômodo, como ocorre nas coletas de sangue (Wong, 2006; Malamud, 2011).

Diversas análises em amostras salivares tem sido estudadas e aplicadas na área do exercício, tais como para o monitoramento de importantes marcadores de estresse crônico, como os hormônios cortisol e testosterona (Hayes *et al.*, 2015), biomarcadores da resposta imune, como a taxa de secreção de IgA salivar (Pacque *et al.*, 2007) e de função endotelial, através da análise dos níveis de óxido nítrico salivar (Diaz *et al.*, 2013).

O Óxido Nítrico (NO) corresponde a uma molécula gasosa simples, produzido por uma família de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintases (NOS) a partir da l-arginina (Moncada *et al.*, 1991). Este composto possui uma ampla ação biológica, sendo bem conhecida sua importante ação vasodilatadora, além de moduladora de repostas inflamatórias (Adams, 1996; Cerqueira e Yoshida, 2002). O metabolismo do NO gera como produto os ânions inorgânicos nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻), sendo estes mais comumente determinados em amostras biológicas (Flora Filho e Zilberstein, 2000; Lundberg *et al.*, 2008).

Além dos analitos mencionados, alguns biomarcadores salivares de intensidade do exercício também tem sido avaliados, tais como o lactato salivar,

atividade de amilase, concentração de proteína total e de cromogranina A (Bortolini *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2010; Bocanegra *et al.*, 2012).

Em relação ao estresse oxidativo promovido pelo exercício, pelo nosso conhecimento, apenas um trabalho comparou biomarcadores plasmáticos e salivares (Deminice, Sicchieri, *et al.*, 2010). Neste, ao avaliarem um protocolo de exercício resistido, nenhum marcador de estresse oxidativo além do ácido úrico é alterado na saliva, enquanto que no plasma são observados aumentos na peroxidação lipídica, oxidação proteica, ácido úrico e GSH. Tais resultados levaram estes pesquisadores a sugerir que os biomarcadores salivares não são adequados para avaliar o estresse oxidativo induzido por uma sessão de exercício resistido.

Contudo, alguns trabalhos já demonstraram a alteração de biomarcadores de estresse oxidativo salivares após diferentes modalidades agudas de exercício, tais como judô (Cavas *et al.*, 2005), corrida (Gonzalez *et al.*, 2008; Benitez-Sillero *et al.*, 2009) e caminhada (Zambrano *et al.*, 2009). Assim, torna-se necessário a melhor compreensão dos mecanismos de resposta ao estresse oxidativo em amostras salivares frente a diferentes protocolos de exercício físico e, além disso, comparar o perfil de resposta com amostras plasmáticas, uma vez que o plasma constitui o fluido mais estudado neste contexto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de diferentes sessões agudas de exercício físico (HIIE: exercício intervalado de alta intensidade; EC: exercício contínuo; e ER: exercício resistido) em indivíduos treinados sobre biomarcadores salivares e plasmáticos de estresse oxidativo e intensidade de exercício.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar como a intensidade promovida pelos protocolos de exercício (HIIE, EC e ER) pode modular os biomarcadores salivares de atividade de amilase e concentração de proteína total;
- Verificar como estes protocolos podem promover a modulação nos níveis de óxido nítrico, estimados através da concentração do nitrito salivar;
- Determinar o efeito destes exercícios sobre os níveis de proteína carbonilada plasmáticas;
- Analisar como estes diferentes protocolos alteram as respostas antioxidantes moduladas pelo exercício, comparando o perfil de resposta de amostras plasmáticas com amostras salivares em relação à diferentes biomarcadores de estresse oxidativo, como a análise da capacidade antioxidante total, níveis de glutathiona reduzida, atividades de superóxido dismutase e catalase, além dos níveis de ácido úrico;
- Avaliar o tempo de resposta e de recuperação dos biomarcadores analisados, através de mensurações realizadas nos tempos: antes, após e 3 horas após cada protocolo de exercício.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Voluntários

Participaram deste estudo treze indivíduos do sexo masculino, saudáveis e fisicamente treinados (idade: $27,62 \pm 1,28$ anos; altura: $174,20 \pm 2,14$ cm; peso: $72,07 \pm 1,77$ kg; IMC: $23,76 \pm 0,54$ kg.m⁻²; percentual de gordura: $15,16 \pm 0,99\%$; média \pm EPM).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (parecer nº: 1.908.151), e foram selecionados aqueles voluntários que se adequavam aos seguintes critérios de inclusão:

- Indivíduos saudáveis e não portadores de necessidades especiais;
- Fisicamente treinados em exercício aeróbio e resistido há pelo menos 6 meses;
- Idade entre 18 e 35 anos;
- Não fumante;
- Não usuário de medicamentos ou suplementos antioxidantes.

3.2. Desenho experimental

Após se adequarem aos critérios de inclusão e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os voluntários compareceram ao Laboratório de Fisiologia Cardiorrespiratória e Metabólica – LAFICAM da Faculdade de Educação Física – UFU. Cada voluntário realizou 5 visitas ao laboratório, de forma que na primeira foi realizado um teste de avaliação da aptidão aeróbia e na segunda a determinação da carga máxima na musculação, para assim se estabelecer as intensidades das sessões agudas experimentais.

A avaliação da aptidão aeróbia ($VO_{2máx}$) foi realizada através de teste incremental máximo em cicloergômetro de frenagem mecânica (Cefise, Campinas - SP) com carga inicial de 100W e incremento de 45w a cada 2 minutos. Todo o teste foi realizado com rotação de 90 rpm. Durante o teste foi avaliada a frequência

cardíaca (Polar RS800, Filand) e a Percepção Subjetiva de Esforço (PSE) através da escala de pontos de Borg (Borg, 1974). O critério de interrupção do teste foi a PSE de 20 associada a incapacidade de manutenção da rotação a 90 rpm e desistência voluntária por exaustão. A intensidade associada ao VO_{2max} (wVO_{2max}) foi considerada a do último estágio completo do teste incremental.

A intensidade de exercício resistido foi avaliada e prescrita baseada no teste de 12 repetições máximas (12RM). Após familiarização com os aparelhos de musculação, foi realizado o teste de 12RM em todos os exercícios utilizados no estudo para obtermos a carga máxima (em kg). Foram realizadas no máximo 5 tentativas por aparelho e a carga máxima de cada exercício foi determinada na mesma sequência dos exercícios realizados na sessão aguda experimental.

Posteriormente, os voluntários realizaram os três protocolos experimentais agudos de exercícios físicos em ordem randomizada, no formato *crossover* e separada por no mínimo 72 horas entre elas. Todos os exercícios foram orientados, acompanhados e devidamente esclarecidos por profissionais educadores físicos. Os voluntários foram instruídos a não realizarem exercícios físicos e a não consumirem bebidas alcoólicas ou cafeinadas nas 24 horas prévias a cada teste. Além disso, os participantes também foram orientados a realizarem um lanche uma hora antes da realização da sessão de exercício e a manter o mesmo lanche previamente às sessões experimentais seguintes. Os protocolos de exercício consistiram em:

- *Exercício Intervalado de Alta Intensidade – HIIE (do inglês High Intensity Interval Exercise)*: Desempenhado em cicloergômetro, consistindo na realização de 1 minuto de exercício a 100% do VO_{2max} seguido de 1 minuto de recuperação passiva a 40% do VO_{2max} até a exaustão voluntária;
- *Exercício Contínuo – EC*: Desempenhado em cicloergômetro, consistindo em um exercício contínuo de 60 minutos com intensidade entre 50 e 60% do VO_{2max} ;
- *Exercício Resistido – ER*: Desempenhado os exercícios resistidos de agachamento, *leg press*, mesa flexora e *stiff*, nessa ordem, 3 séries de 12

repetições máximas, com intervalo de dois minutos entre as séries e os exercícios.

Após a realização dos três exercícios acima, foi fornecido a todos os participantes um lanche padronizado (constituído por bolachas de sal e suco de pêssego light).

3.2.1. Coleta e processamento das amostras de sangue e saliva

Todas as amostras foram coletadas no período da manhã nos momentos: pré-exercício, pós-exercício e três horas pós-exercício em todas as três sessões agudas experimentais (HIIE, EC e ER).

As amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia antecúbital ou radial em tubos contendo EDTA e as amostras de saliva foram coletadas pelo método de cuspe. Todas as amostras foram mantidas a 4°C e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para a obtenção do sobrenadantes. Posteriormente as amostras de plasma e saliva foram armazenadas a -80° C até a realização das análises bioquímicas.

3.2.2. Determinação dos biomarcadores salivares de intensidade de exercício

3.2.2.1. Atividade de amilase salivar

Para a determinação da atividade da amilase salivar, 10 µL de saliva foram diluídos (1:200) em tampão MES (MES 50mM, NaCl 300mM, CaCl₂ 11 5mM, KSCN 140mM, pH 6.3). Dessa solução, 8 µL foram adicionados em microplaca seguido pela adição de 320 µL de substrato (2-cloro-4-nitrofenol- β-D galactopiranosilmaltosideo: GALG2-CNP) aquecido a 37°C. A densidade óptica foi mensurada a 405 nm durante três minutos a 37°C, com intervalo de um minuto entre cada leitura. (Granger *et al.*, 2007).

3.2.2.2. Concentração de proteína total

A determinação da concentração de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando como padrão a proteína de soro albumina bovina (BSA). As amostras foram incubadas com o reagente de Bradford em microplaca durante 10 minutos à temperatura ambiente e a leitura espectrofotométrica foi feita em 595 nm.

3.2.3. Concentração de Óxido Nítrico (NO) salivar

A concentração de óxido nítrico salivar foi determinada através da quantidade de nitrito formado. O nitrito foi mensurado pela reação das amostras com o reagente de Griess, por meio de um ensaio colorimétrico, realizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm (Tsikas, 2007).

3.2.4. Determinação dos níveis de proteína carbonilada no plasma

A detecção de grupos de proteínas carboniladas no plasma foi baseada na derivatização do grupo carbonila com o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), o que leva à formação do produto estável (DNP), quantificado espectrofotometricamente à 370 nm (Reznick e Packer, 1994). As amostras de plasma foram incubadas com DNPH 10 mM em HCl 2,5 N no escuro durante 1 hora e em seguida, foi adicionado TCA 20%. Após centrifugação à 9000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol – acetato de etila (1:1). Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições para a ressuspensão do pellet em guanidina 6 M solubilizada em HCl 2,5 N e aquecimento em banho-maria à 37 °C por 5 minutos. O produto formado teve sua leitura realizada a 370 nm.

3.2.5. Determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo plasmáticos e salivares

3.2.5.1. Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

A capacidade antioxidante total foi avaliada através da metodologia de FRAP. Esta se baseia na capacidade de redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pelo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ, de coloração azul intensa (Benzie e Strain, 1999). Foram adicionados 10 μL de amostra ao meio de reação contendo tampão acetato de sódio 300 mM pH 3.6, TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e cloreto férrico 20 mM (10:1:1, respectivamente). As amostras foram incubadas por 6 min à 37°C e a absorbância foi lida a 593 nm. A capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão de trolox.

3.2.5.2. Níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

Para a quantificação dos níveis de GSH, 150 μL de amostra foram adicionados a 150 μL de ácido metafosfórico e em seguida centrifugados a 7000 xg por 10 min. a 4°C (Browne e Armstrong, 1998). Foram retirados 30 μL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 185 μL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8.0, contendo EDTA 5mM e 15 μL de o-ftaldialdeído (1 mg/ml em metanol). Essa mistura foi incubada no escuro à temperatura ambiente por 15 min. e a fluorescência foi lida a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH foram calculadas utilizando uma curva padrão de GSH (0.001-0.1mM).

3.2.5.3. Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD é baseada na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo dependente do radical superóxido (Fernandes *et al.*, 2011). A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente analisada em espectrofotômetro a 420 nm, em um meio contendo tampão Tris 50 mM com EDTA 1 mM pH 8.2, 80 U/mL de catalase, pirogalol 0.38

mM e 15 µl de amostra. Uma curva de calibração foi realizada utilizando SOD purificada como padrão. A inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definida como uma unidade de SOD.

3.2.5.4. Atividade de catalase (CAT)

A atividade de catalase foi determinada baseada no monitoramento da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 240 nm, em um meio de reação contendo H₂O₂ 20 mM, tampão fosfato 10 mM (pH 7.0) e 10 uL de amostra (Aebi, 1984). A leitura cinética foi realizada aplicando um comprimento de onda de 240 nm durante 10 minutos.

3.2.5.5. Concentração de Ácido úrico

A mensuração das concentrações de ácido úrico foi realizada através de método colorimétrico enzimático, de acordo com as recomendações do fabricante do kit Labtest®.

3.3. Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média±erro padrão da média (EPM), utilizando o software GraphPadPrism (GraphPad Prism versão 7.0 para Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O teste de normalidade de D'Agostino-Pearson foi aplicado e as análises entre os grupos foram realizadas por análise de variância com medidas repetidas (ANOVA-RM), seguido do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos biomarcadores salivares de intensidade de exercício antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER

4.1.1. Atividade de amilase salivar

Foi observado um aumento da atividade da enzima alfa-amilase salivar em todos os protocolos nos tempos Pós comparado com o Pré-ex. 3 horas após os exercícios, os níveis de atividade enzimática diminuíram tanto nos HIIE e EC 3h pós comparado com o Pós ex. (Figura 1).

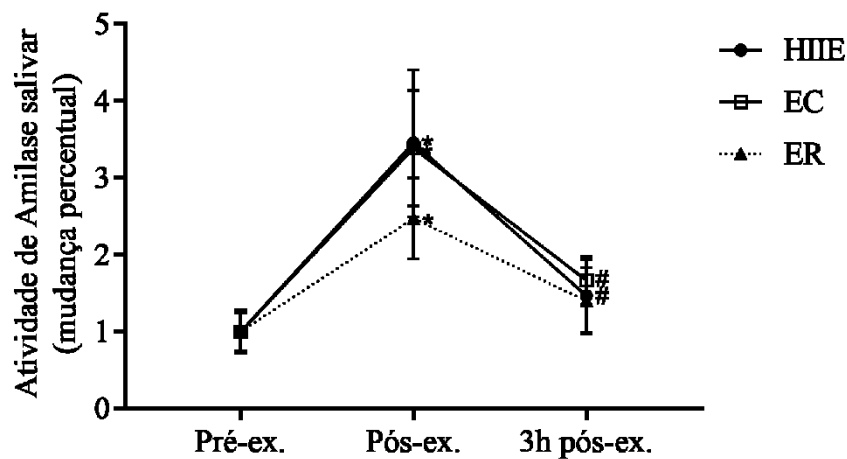


Figura 1: Atividade da enzima alfa-amilase salivar, nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.1.2. Concentração de proteína total

A concentração de proteína total na saliva aumentou no HIIE, EC e ER Pós-ex. comparado com o Pré-ex. Além disso, no tempo 3h Pós-ex. houve um retorno aos níveis basais no HIIE e ER (Figura 2).

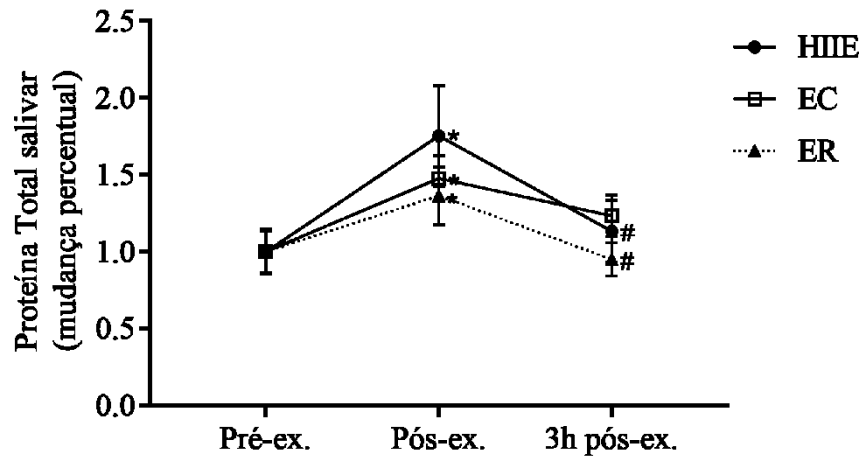


Figura 2: Concentração de proteína total nas amostras de saliva nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.2. Concentração de Óxido Nítrico salivar antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER

Em relação a concentração do óxido nítrico salivar foi observado um aumento no EC Pós comparado com o Pré-ex. Contudo, no tempo 3h Pós houve um aumento da concentração de NO salivar tanto no HIIE quanto no ER comparado com o Pós-ex, enquanto que o EC permaneceu aumentado (Figura 3).

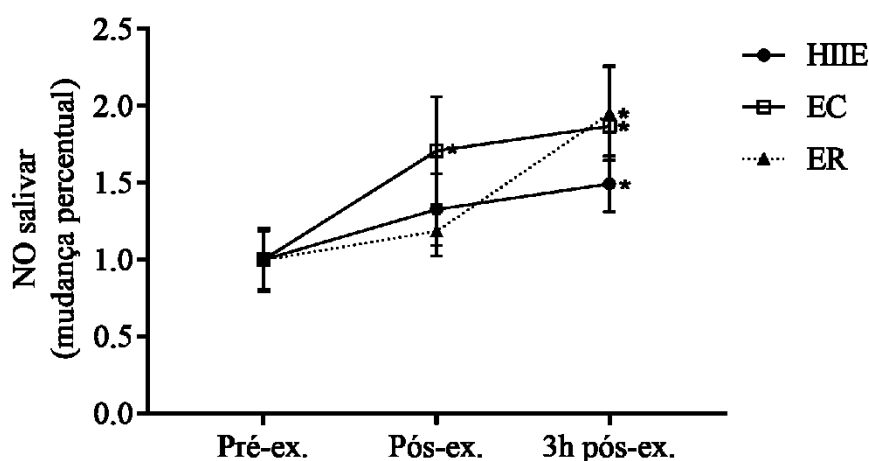


Figura 3: Concentração de óxido nítrico (nitrito) salivar, nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.3. Determinação dos níveis de proteína carbonilada no plasma antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER

Observou-se um aumento dos níveis de proteína carbonilada no HIIE e EC Pós comparado com o Pré-ex., com os níveis de carbonilação de proteínas permanecendo elevados 3 horas após apenas no grupo EC (Figura 4).

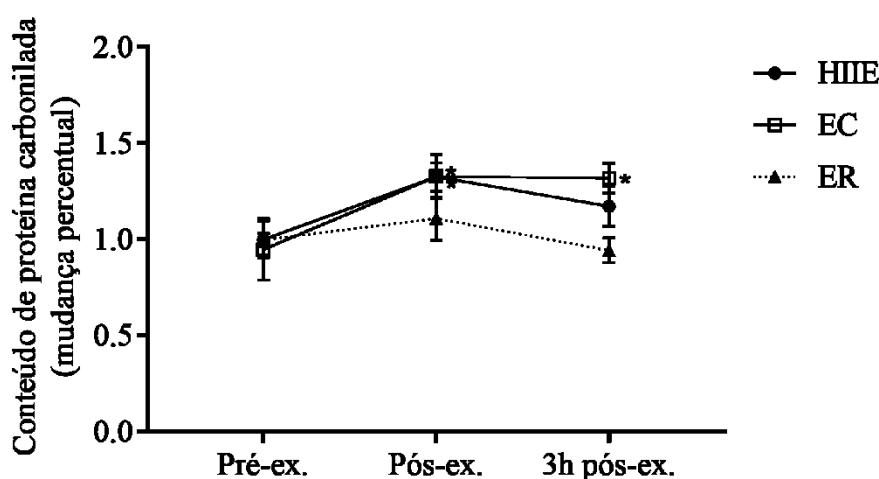


Figura 4: Conteúdo de proteína carbonilada nas amostras de plasma, nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.4. Determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo plasmáticos e salivares antes, após e 3 horas após os protocolos de HIIE, EC e ER

4.4.1. Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

Em relação a capacidade antioxidante total no plasma, foi observado um aumento em todos os protocolos HIIE, EC e ER pós-exercício comparado com o pré-exercício. No tempo 3h Pós-ex houve uma diminuição de FRAP no EC, comparando com Pós-ex, retornando aos valores basais (Figura 5-a). Além disso, a capacidade antioxidante na saliva apresentou resultados similares ao plasma. A Figura 5-b mostrou um aumento do FRAP em todos os protocolos pós-exercício (HIIE, EC e ER), contudo 3h Pós-ex. o FRAP diminuiu tanto no EC quanto no HIIE comparado com Pós-ex. No ER, a capacidade antioxidante salivar permaneceu elevada 3 horas pós-exercício (Figura 5-b).

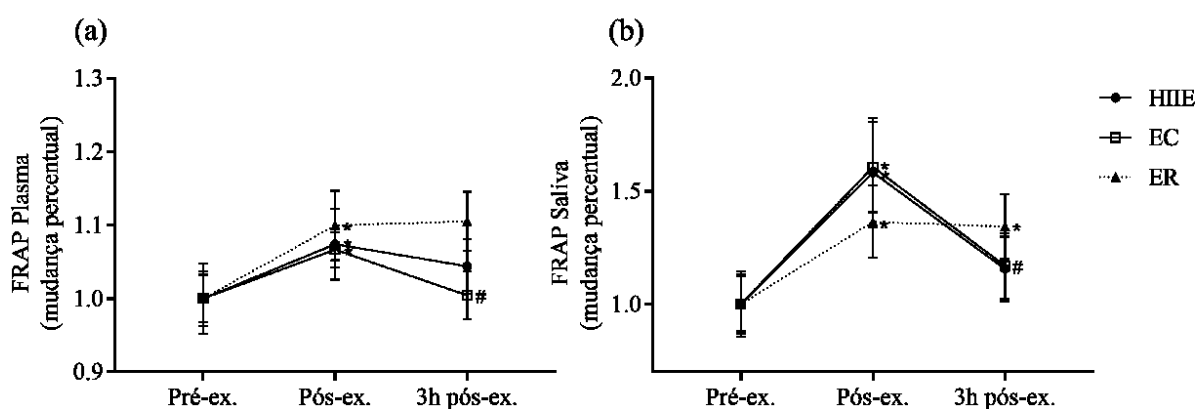


Figura 5: Capacidade antioxidante total nas amostras de plasma (a) e saliva (b) nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.4.2. Níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH plasmáticos aumentaram apenas no HIIE Pós-ex comparado com o Pré-ex. Nenhuma outra alteração deste parâmetro foi encontrada no plasma (Figura 6-a). Em relação aos níveis de GSH na saliva, houve um

aumento no HIIE e o EC Pós comparado com o Pré-ex, com o restabelecimento dos valores basais 3h Pós-ex. Nenhuma alteração foi observada no ER (Figura 6-b).

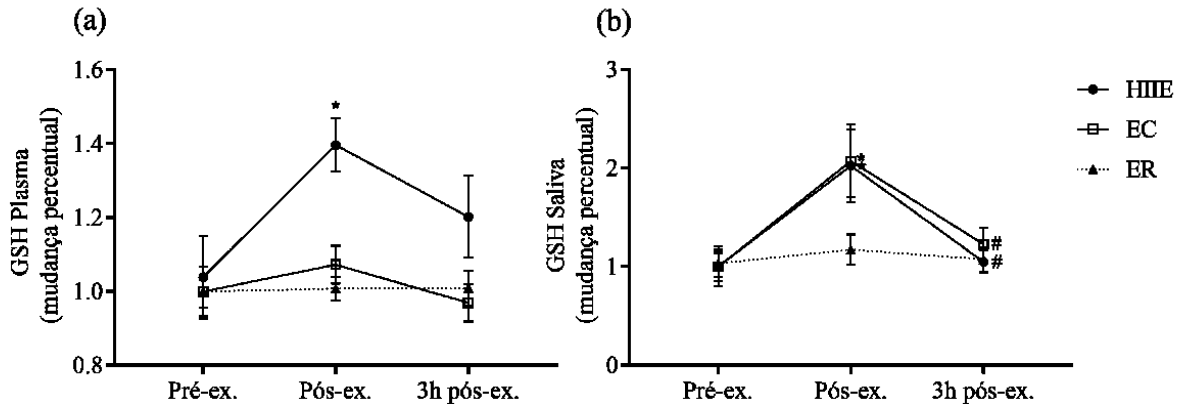


Figura 6: Níveis de Glutathiona reduzida (GSH) nas amostras de plasma (a) e saliva (b) nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.4.3. Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade de SOD no plasma diminuiu apenas no HIIE Pós comparado com o Pré-ex, retornando aos valores basais 3h pós-ex (Figura 7-a). Nas amostras de saliva a atividade de SOD diminuiu no HIIE e EC Pós comparado com o Pré-ex. A atividade da SOD salivar continuou baixa no HIIE 3 horas após o exercício (Figura 7-b).

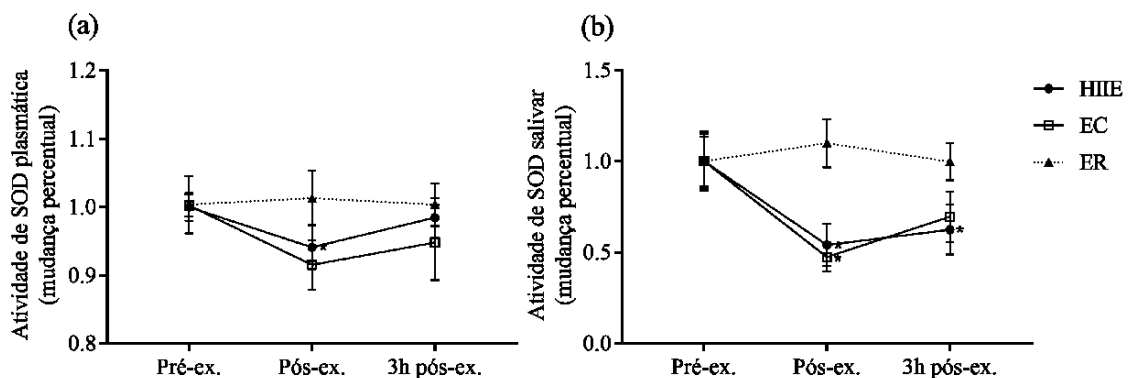


Figura 7: Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) nas amostras de plasma (a) e saliva (b) nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.4.4. Atividade de catalase (CAT)

A atividade da catalase plasmática aumentou no HIIE, EC e ER Pós comparado com o Pré-ex, retornando aos valores basais 3h Pós-ex tanto no HIIE quanto no EC (Figura 8-a). A atividade da catalase salivar também aumentou nos grupos HIIE, EC e ER Pós comparado com o Pré-ex, mantendo-se elevada 3 horas após no EC (Figura 8-b).

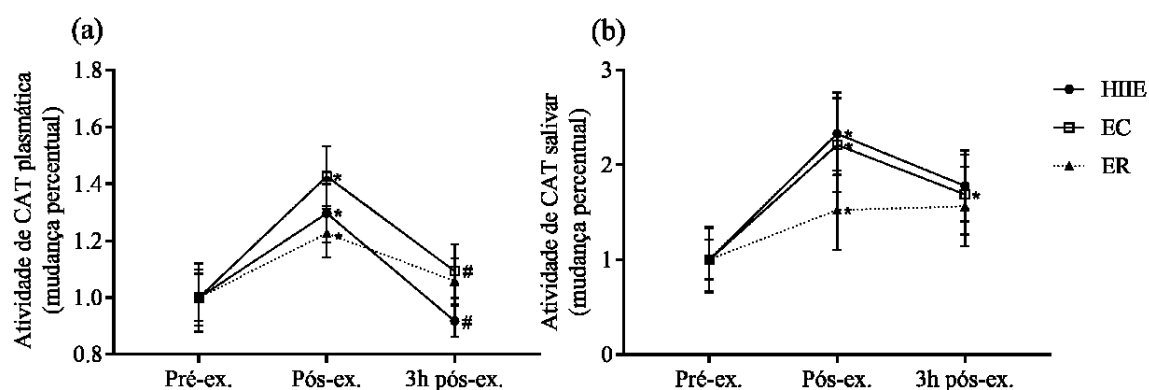


Figura 8: Atividade de Catalase (CAT) nas amostras de plasma (a) e saliva (b) nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p < 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

4.4.5. Concentração de Ácido Úrico

Não foram observadas alterações nas concentrações de ácido úrico nas amostras de plasma e saliva no Pós e 3h Pós comparado com o Pré-ex. em nenhum dos protocolos analisados (Figura 9).

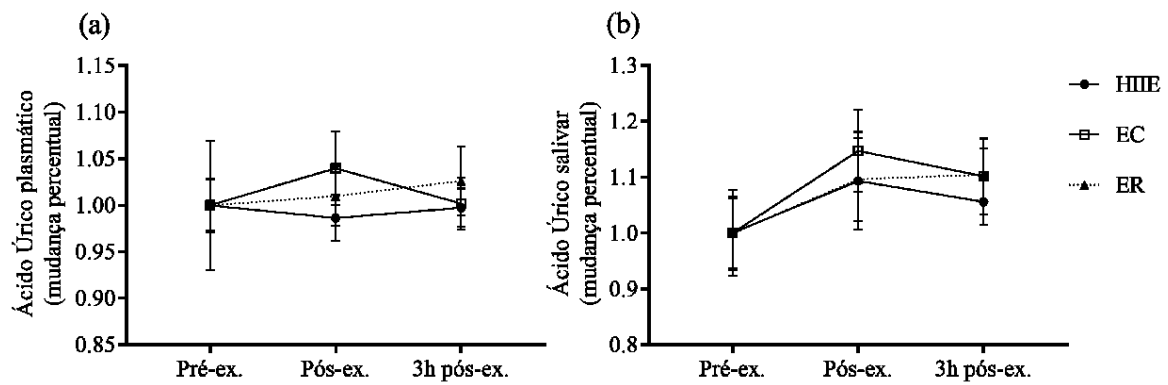


Figura 9: Concentração de ácido úrico nas amostras de plasma (a) e saliva (b) nos momentos pré-exercício, pós-exercício e 3 horas pós-exercício. HIIE: Exercício Intervalado de Alta Intensidade (do inglês *High Intensity Interval Exercise*); EC: Exercício Contínuo; ER: Exercício Resistido. Valores expressos como média percentual em relação ao pré-exercício \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ vs. Pré-ex.; # $p \leq 0.05$ vs. Pós-ex. (ANOVA-RM seguida do teste de Tukey, $n=13$).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi apresentado como diferentes protocolos de exercício aplicados em indivíduos treinados (HIIE: exercício intervalado de alta intensidade; EC: exercício contínuo; e ER: exercício resistido) podem alterar os níveis de proteína total e atividade de amilase salivar (marcadores de intensidade de exercício), além de verificar sua influência sobre a concentração de óxido nítrico. Mais importante, este estudo também mostrou como estes diferentes protocolos alteram as respostas antioxidantes moduladas pelo exercício, comparando o perfil de resposta de amostras plasmáticas com amostras salivares em relação a diferentes biomarcadores de estresse oxidativo, como a análise da capacidade antioxidante total, níveis de glutatona reduzida, atividades de superóxido dismutase e catalase, além dos níveis de ácido úrico.

A análise de amostras de saliva constitui uma ferramenta alternativa na determinação de importantes parâmetros relacionados ao exercício físico, como biomarcadores de intensidade (Calvo *et al.*, 1997; Chicharro *et al.*, 1998; Bortolini *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2010), análise de hormônios (Beaven *et al.*, 2008) e mecanismos de resposta ao estresse oxidativo (Cavas *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008; Deminice, Sicchieri, *et al.*, 2010).

Dentre os biomarcadores de intensidade de exercício, tem-se como destaque o monitoramento da alfa-amilase salivar, uma vez que sua atividade se correlaciona com o limiar de lactato (Calvo *et al.*, 1997; Chicharro *et al.*, 1998). Aqui, foi observado o aumento da atividade da enzima alfa-amilase salivar após a realização de todos os protocolos de exercício físico (HIIE, EC e ER). Estes resultados corroboram com outros estudos que também verificaram este aumento pós-exercício (Chatterton *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1999; Li e Gleeson, 2004; Leicht *et al.*, 2017).

Tal comportamento enzimático pode ser justificado pelo estímulo simpático promovido pelo exercício, com efeito direto sob as glândulas salivares pelas catecolaminas plasmáticas, como a norepinefrina (Green e Hughson, 1985; Chatterton *et al.*, 1996). Em relação a função, sugere-se que o aumento na

atividade de amilase com o exercício pode estar relacionado ao efeito protetor salivar contra infecções, uma vez que esta enzima pode inibir a aderência bacteriana às superfícies bucais (Scannapieco *et al.*, 1994).

Além da amilase, também já foi demonstrado que a concentração de proteína total salivar pode ser uma ferramenta útil na determinação do limiar anaeróbio, visto que se correlaciona com o lactato sanguíneo em testes de esforço (Bortolini *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2010). De Oliveira e colaboradores (2010) demonstraram ainda que os limiares de alfa-amilase, proteína total salivar e lactato sanguíneo correlacionam-se entre si. Assim, da mesma forma que o monitoramento da alfa-amilase salivar, a determinação da concentração de proteína total é uma ferramenta eficiente e um método alternativo para se determinar a intensidade de um exercício, além de menos invasivo do que o lactato sanguíneo.

Em relação à concentração de proteína total salivar avaliada neste estudo, observou-se o seu aumento após todos os protocolos de exercício (HIIE, EC e ER). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que também verificaram esta elevação após a realização de diferentes protocolos de exercício físico (Blannin *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1999; Bortolini *et al.*, 2009). Tal aumento na concentração de proteína total salivar é justificado pelo aumento na secreção de amilase e mucinas induzido pelo exercício, entre outras proteínas (De Oliveira *et al.*, 2010; Ligtenberg *et al.*, 2015).

Além disso, Ligtenberg e colaboradores (2015) mostraram que a concentração de proteína salivar aumentou após em um exercício aeróbio de alta intensidade, enquanto que ao avaliar um exercício aeróbio de intensidade moderada, o mesmo não ocorreu. Portanto, os dados observados neste estudo, com aumento de proteína total e de atividade de amilase salivar após a realização de todos os protocolos, sugerem a similar e alta carga dos exercícios, que é caracterizada pela relação da intensidade e do volume dos testes.

Tratando-se dos efeitos do exercício sobre os níveis de nitrito, foi observado que todos os protocolos promoveram o aumento de sua concentração nas amostras de saliva. A dosagem de nitrito salivar pode ser usada como uma representação da produção e disponibilidade total de óxido nítrico pelo organismo (Bryan, 2015) e a

sua avaliação é muito importante na medicina esportiva, visto que o óxido nítrico está fortemente associado aos benefícios da prática regular de exercício físico sobre a hipertensão arterial e doenças relacionadas (Korsager Larsen e Matchkov, 2016). Esta elevação da biodisponibilidade do óxido nítrico é atribuída principalmente ao aumento do “shear stress” ou estresse de cisalhamento induzido pelo exercício físico, que aumenta a produção de óxido nítrico e outras moléculas vasorrelaxantes, levando a redução da pressão arterial (Kingwell, 2000; Kuru, O. *et al.*, 2002; Kuru, Oktay *et al.*, 2002).

Poucos trabalhos avaliaram o efeito agudo do exercício físico sobre os níveis de nitrito salivares em indivíduos jovens saudáveis não suplementados (Gonzalez *et al.*, 2008; Zambrano *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2010). Gonzalez e colaboradores (2008) não verificaram diferenças nos níveis de nitrito salivar logo após um protocolo de exercício aeróbio contínuo, enquanto que Rahman e colaboradores (2010) observaram este aumento após um teste incremental, de forma que após 1 hora os níveis detectados foram ainda maiores. Nossos resultados mostraram o aumento dos níveis de nitrito logo após a realização do EC, enquanto que no HIIE e ER o mesmo foi verificado somente após 3 horas do término do teste. Estes dados juntamente com os de Rahman e colaboradores (2010) apontam para a importância do monitoramento dos níveis de nitrito em diferentes momentos após o exercício, uma vez que pico desta molécula pode ocorrer horas depois do estímulo. E assim contribuem para um melhor entendimento acerca dos efeitos do exercício sobre a modulação dos níveis de óxido nítrico salivares.

Em relação às análises de estresse oxidativo, foi observado o aumento do conteúdo de proteína carbonilada no plasma após os protocolos de HIIE e EC, enquanto nenhuma alteração foi observada no ER. Estes dados corroboram com outros trabalhos que também verificaram aumento dos níveis de proteína carbonilada no pós-exercício (Alessio *et al.*, 2000; Bloomer *et al.*, 2005; Bloomer *et al.*, 2007; Bogdanis *et al.*, 2013). Este aumento na carbonilação pós-exercício deve-se a oxidação das proteínas, principalmente a albumina e outras proteínas plasmáticas (Michailidis *et al.*, 2007). Estas biomoléculas possuem diversas funções nos sistemas biológicos, de forma que a sua conformação e estrutura estão

diretamente relacionadas a sua função e atividade. Assim, a carbonilação proteica, como consequência do estresse oxidativo induzido pelo exercício, pode ser responsável pela alteração da função de diversas proteínas no organismo (Chevion *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2010). Cabe ressaltar porém, que este dano é transitório e faz parte de um processo adaptativo. Vários estudos mostram que este é atenuado pelo treinamento tanto aeróbio quanto anaeróbio, que leva ao aumento da produção de antioxidantes endógenos e diminuição da geração de radicais livres (Bloomer e Goldfarb, 2004; Vollaard *et al.*, 2005).

Bloomer e colaboradores (2007) verificaram que a elevação de proteínas carboniladas no plasma promovida pelo exercício aeróbio é maior conforme mais longa for a duração do protocolo. Assim, aqui mostramos que o protocolo de HIIE (de curta duração) foi tão eficiente quanto o protocolo de EC (de mais longa duração), mostrando a relativa equivalência destas duas práticas em relação ao estresse oxidativo.

O estudo de biomarcadores de estresse oxidativo induzido pelo exercício agudo em amostras de saliva ainda é pouco explorado (Cavas *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008; Deminice, Sicchieri, *et al.*, 2010). Pelo nosso conhecimento, apenas um trabalho comparou o perfil de resposta entre amostras plasmáticas e salivares, onde Deminice, Sicchieri e colaboradores (2010) consideraram que a saliva não reflete adequadamente a resposta plasmática. Entretanto este estudo é limitante, visto que: apenas um tipo e protocolo de exercício é avaliado (resistido); nenhuma enzima antioxidante é mensurada; e apenas dois momentos de coleta são aferidos (pré e pós-exercício). Aqui nós analisamos os biomarcadores salivares e plasmáticos comparando diferentes protocolos de exercício, investigamos a atividade de enzimas antioxidantes e capacidade antioxidante total das amostras e ainda monitoramos os biomarcadores 3 horas após a realização dos exercícios.

Em relação à capacidade antioxidante total, foi observado que as amostras de plasma e saliva apresentaram um comportamento similar, com aumento da capacidade antioxidante total logo após a realização de todos os protocolos de exercício (HIIE, EC e ER). Tal resultado indica o aumento das defesas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e corrobora com o estudo de González e colaboradores (2008), que também mostraram aumento da

capacidade antioxidante salivar após um protocolo de exercício aeróbio contínuo. No plasma, diversos trabalhos também mostram o aumento da capacidade antioxidante total promovido pelo exercício (Child *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2005; Berzosa *et al.*, 2011; Wadley *et al.*, 2016). Child e colaboradores (1998) e González e colaboradores (2008) atribuem o aumento da capacidade antioxidante total principalmente aos níveis de ácido úrico. Neste estudo, nós acreditamos que este aumento na capacidade antioxidante total deva estar relacionado a outros componentes além do ácido úrico, como os elevados níveis de GSH e atividade de CAT observados, além de outras moléculas e enzimas antioxidantes não analisadas aqui.

Um estudo recente comparou o efeito de diferentes protocolos de HIIE sobre a capacidade antioxidante total plasmática e verificou que todos aumentavam pós-exercício e retornavam aos níveis basais 3 horas após o término (Cipryan, 2017). Aqui, o aumento também foi verificado nas amostras plasmáticas e salivares após o HIIE, entretanto o retorno aos níveis basais 3 horas após foi observado apenas nas amostras de saliva. Assim, nossos resultados mostram que apenas uma única sessão aguda de HIIE é capaz de aumentar a capacidade antioxidante total em amostras de saliva, de forma similar ao que ocorre no plasma. Além disso, o perfil de resposta na capacidade antioxidante total observado no HIIE foi similar ao EC. Estes resultados também estão de acordo com um recente trabalho que, ao avaliar um protocolo de HIIE e EC, verificou um aumento similar na capacidade antioxidante plasmática pós-exercício (Wadley *et al.*, 2016).

Neste trabalho foi observado um aumento dos níveis de GSH plasmáticos apenas após o HIIE, enquanto que na saliva os níveis de GSH aumentaram após o HIIE e o EC, de forma que o ER não mostrou alterações. A glutathione é um tripeptídeo, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, correspondente ao tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos e grande responsável pela defesa contra o estresse oxidativo. Essa molécula é considerada um antioxidante fisiológico chave, dada sua alta capacidade de doar elétrons, além de estar envolvida em processos como a modulação da proliferação celular e função imune (Ookhtens e Kaplowitz, 1998; Sen e Packer, 2000; Lu, 2013). O exercício físico pode influenciar no equilíbrio de GSH agindo principalmente no fígado, aumentando a sua liberação

para sangue e dessa forma garantindo seu suprimento adequado aos tecidos extra-hepáticos, como o músculo esquelético (Lew *et al.*, 1985; Ji *et al.*, 1998).

Nossos dados mostram o aumento de GSH plasmático seguido do HIIE, corroborando com um outro estudo que observou este aumento após um protocolo de HIIE em nadadores (Deminice, Trindade, *et al.*, 2010). Além disso, outros trabalhos também verificaram a elevação dos níveis de GSH plasmáticos após diferentes protocolos de exercício (Deminice, Sicchieri, *et al.*, 2010; Deminice, Trindade, *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016), enquanto que outros relatam a sua diminuição (Laaksonen *et al.*, 1999; Wiecek, Maciejczyk, Szymura, Szygula, *et al.*, 2015; Seifi-Skishahr *et al.*, 2016). Deminice, Sicchieri e colaboradores (2010) ao avaliarem o efeito de um protocolo de ER sobre os níveis de GSH, não observaram nenhuma alteração nas amostras de saliva, enquanto que no plasma o aumento de GSH foi observado. Apesar de nenhuma mudança na concentração dessa molécula ter sido observada após o protocolo de ER deste estudo, nossos dados mostram que a análise salivar se mostrou efetiva no monitoramento de GSH, uma vez que seus níveis foram alterados após o HIIE e o EC.

Em relação à análise das enzimas antioxidantes, foram avaliadas as atividades das enzimas SOD e CAT nas amostras de plasma e saliva. Foi verificada a diminuição da atividade da SOD no plasma após o HIIE e na saliva após o HIIE e EC. Este resultado de diminuição da atividade de SOD plasmática também foi recentemente observado em um estudo que avaliou três diferentes protocolos: HIIE, exercício intervalado de “sprint” e exercício contínuo de intensidade moderada (Parker *et al.*, 2017). Além disso, outros trabalhos também verificaram a redução da SOD após exercício (Groussard *et al.*, 2003; Estrela *et al.*, 2017). Entretanto, os mecanismos para tal comportamento enzimático não são bem elucidados. Aqui nós sugerimos que durante a execução do exercício, possa ter sido gerada grandes quantidades de H₂O₂ (baseado na alta atividade de catalase observada), o que pode ter promovido a inibição da SOD e conseqüentemente a diminuição da sua atividade observada no pós-exercício. Alguns estudos já verificaram este mecanismo de inibição da SOD promovida por H₂O₂ (Bray *et al.*, 1974; Goldstone *et al.*, 2006).

Apesar do monitoramento da atividade de SOD em resposta aos efeitos agudos do exercício ser bem menos explorado em amostras de saliva, alguns estudos mostram a elevação da sua atividade no pós-exercício (Cavas *et al.*, 2005; Damirchi *et al.*, 2015). Além disso, outros trabalhos também observaram este aumento pós-exercício em amostras de plasma (Schneider *et al.*, 2005; Berzosa *et al.*, 2011). Aqui, nós verificamos o mesmo comportamento de diminuição de atividade enzimática tanto nas amostras de plasma quanto nas de saliva, portanto as diferenças observadas por estes trabalhos com os dados aqui apresentados podem ser devido aos diferentes protocolos de exercício utilizados.

A atividade de CAT aumentou tanto nas amostras de plasma como nas de saliva após a realização de todos os protocolos de exercício (HIIE, EC e ER). Este resultado está de acordo com outros trabalhos que também verificaram o aumento da atividade de CAT pós-exercício em amostras salivares (Cavas *et al.*, 2005; Damirchi *et al.*, 2015) e plasmáticas (Berzosa *et al.*, 2011; Bogdanis *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2017). Tal aumento na atividade de CAT pode ser devido ao aumento da liberação desta enzima pelas células musculares e eritrócitos promovidos pelo exercício (Michailidis *et al.*, 2007).

No que se refere aos níveis de ácido úrico, nenhuma alteração foi observada após os protocolos. Apesar de alguns trabalhos relatarem o aumento de ácido úrico pós-exercício em plasma (Maxwell *et al.*, 1993; Aguilo *et al.*, 2005; Gul *et al.*, 2011; Kabasakalis *et al.*, 2014) e saliva (Gonzalez *et al.*, 2008; Arazi *et al.*, 2016), existem também estudos que verificaram a sua diminuição, além da não alteração nos níveis desta molécula no plasma (Quindry *et al.*, 2003; Wiecek, Maciejczyk, Szymura e Szygula, 2015). Os dados observados aqui diferem do estudo de Deminice, Sicchieri e colaboradores (2010), que ao avaliarem os níveis de ácido úrico em amostras de plasma e saliva após uma sessão de ER, verificaram um aumento dos mesmos, além de uma correlação positiva entre os dados. Além disso, aqui só foi observada correlação para ácido úrico entre plasma e saliva no ER no momento pré-exercício ($r=0,63$; $p=0,02$). Interessantemente, neste mesmo estudo de Deminice, Sicchieri e colaboradores (2010) nenhum outro parâmetro de estresse oxidativo foi observado nas amostras de saliva, além do ácido úrico. Os níveis inalterados desta molécula observados neste estudo sugerem que outras

moléculas antioxidantes estejam agindo como mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício.

Michailidis e colaboradores (2007) ao monitorarem em diversos tempos biomarcadores sanguíneos de estresse oxidativo após uma sessão de exercício aeróbio, verificaram que cada biomarcador apresenta picos e retornam ao baseline em tempos específicos, tornando difícil estabelecer um melhor tempo para a análise dos biomarcadores. Comparar estes tempos com a literatura se mostrou uma tarefa árdua, visto que cada biomarcador pode apresentar um tempo de resposta variável conforme o nível de treinamento da população estudada, além da intensidade, tipo e a duração dos protocolos de exercício.

De forma geral, foi visto que os biomarcadores apresentaram tempos de recuperação diferentes conforme o protocolo de exercício aplicado e também conforme o fluido biológico analisado. Entretanto, o tempo de recuperação de 3 horas possibilitou verificar o retorno ao baseline de alguns biomarcadores, como proteína total, capacidade antioxidante total, GSH, e atividades de SOD, CAT e amilase. Além disso, foi possível melhor compreender a relação de tempo do nitrito salivar e verificar alterações promovidas pelo exercício que não são tão transientes, como a carbonilação de proteínas plasmáticas.

O perfil de resposta antioxidante das amostras de saliva se mostrou muito similar ao plasma, frente a todos os protocolos: HIIE, EC e ER. Assim, nossos resultados sugerem que a coleta e análise de amostras de saliva pode ser uma excelente ferramenta alternativa para o estudo do estresse oxidativo em diferentes protocolos de exercício físico. O que é bastante interessante, visto que se trata de um método de coleta não-invasivo e com menores desconfortos, apresentando-se como um procedimento mais viável para aplicação em estudos com atletas e monitoramento de atividades que requerem um maior número de coletas.

Os efeitos crônicos do HIIE sobre o estresse oxidativo plasmático também já foram avaliados (Bogdanis *et al.*, 2013). Bogdanis e colaboradores (2013), ao avaliarem o efeito de um treinamento curto de HIIE durante 3 semanas, verificaram aumento da capacidade antioxidante total, aumento da atividade das enzimas

catalase e glutathione peroxidase, além de uma redução nos níveis de TBARS e proteínas carboniladas (anteriormente elevados na primeira sessão aguda).

O protocolo de ER empregado neste trabalho, diferentemente do HIIE e EC, não apresentou alterações nos níveis de proteína carbonilada, atividade de SOD e concentrações de GSH. Provavelmente a geração de ROS promovida por este tipo de exercício foi menor quando comparado aos outros. Shi e colaboradores (2007), ao avaliarem exercícios aeróbios e anaeróbios com cargas de trabalho similares, sugeriram que o exercício aeróbio parece gerar inicialmente mais ROS, enquanto que o exercício anaeróbio pode induzir uma geração mais prolongada destas espécies (Shi *et al.*, 2007).

Nosso estudo mostrou que uma única sessão de HIIE exerce um padrão de resposta antioxidante muito similar a uma sessão de EC, verificado tanto em amostras de plasma como de saliva. Os mecanismos pelos quais o treinamento intervalado apresentou resultados similares ao contínuo de longa duração podem estar relacionados ao aumento do estresse mecânico promovido no músculo esquelético (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009) e também pelo aumento nas flutuações metabólicas induzidas por este exercício (Combes *et al.*, 2015). Dessa forma, sugere-se que as adaptações favoráveis que ocorrem em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo exercício possam ser alcançadas de forma relativamente rápida através da prática do treinamento intervalado de alta intensidade.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que todas as sessões agudas de exercício (HIIE: exercício intervalado de alta intensidade; EC: exercício contínuo; e ER: exercício resistido) aplicados em indivíduos treinados, provocaram o aumento da concentração de proteína total, atividade de amilase e concentração de nitrito salivar, indicando a similar e alta carga dos exercícios, além de seu efeito modulador sobre os níveis de óxido nítrico.

Ao comparar biomarcadores de estresse oxidativo, foi visto o perfil de resposta antioxidante salivar se mostrou muito similar ao plasma, sugerindo então o uso da saliva como uma ferramenta alternativa para o estudo do estresse oxidativo em diferentes protocolos de exercício físico. Em relação às modalidades, foi verificado que o ER apresentou menores alterações das respostas antioxidantes quando comparado ao HIIE e EC. E que a sessão de HIIE, que é realizada em um intervalo de tempo menor comparado ao EC, exibiu um perfil antioxidante similar, verificado tanto nas amostras de plasma como nas de saliva. Assim, nós sugerimos que as adaptações favoráveis que ocorrem em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo exercício possam ser alcançadas de forma relativamente rápida através da prática do treinamento intervalado de alta intensidade.

7. REFERÊNCIAS

Adams, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Vet Med Assoc*, v. 209, n. 7, p. 1297-302, Oct 1 1996.

Adamu, B.; Sani, M. U.; Abdu, A. Physical exercise and health: a review. *Niger J Med*, v. 15, n. 3, p. 190-6, Jul-Sep 2006.

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v. 105, p. 121-6, 1984.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

Aguilo, A. et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*, v. 84, n. 1, p. 1-7, Jan 31 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.07.034>

Ahlskog, J. E. et al. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc*, v. 86, n. 9, p. 876-84, Sep 2011.
<https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0252>

Alessio, H. M. et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 32, n. 9, p. 1576-81, Sep 2000.
<https://doi.org/10.1097/00005768-200009000-00008>

Arazi, H.; Simaei, E.; Taati, B. Comparison of responses of salivary antioxidant markers to exhaustive aerobic exercise in smoker and non-smoker young girls. *J Sports Med Phys Fitness*, v. 56, n. 10, p. 1132-1138, Oct 2016.

Bartlett, J. D. et al. High-intensity interval running is perceived to be more enjoyable than moderate-intensity continuous exercise: implications for exercise adherence. *J Sports Sci*, v. 29, n. 6, p. 547-53, Mar 2011.
<https://doi.org/10.1080/02640414.2010.545427>

Beaven, C. M.; Gill, N. D.; Cook, C. J. Salivary testosterone and cortisol responses in professional rugby players after four resistance exercise protocols. *J Strength Cond Res*, v. 22, n. 2, p. 426-32, Mar 2008.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181635843>

Benitez-Sillero Jde, D. et al. Influence of intense exercise on saliva glutathione in prepubescent and pubescent boys. *Eur J Appl Physiol*, v. 106, n. 2, p. 181-6, May 2009.

<https://doi.org/10.1007/s00421-009-1004-y>

Benzie, I. F.; Strain, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, v. 299, p. 15-27, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)

Berzosa, C. et al. Acute Exercise Increases Plasma Total Antioxidant Status and Antioxidant Enzyme Activities in Untrained Men. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011

<https://doi.org/10.1155/2011/540458>

Blannin, A. K. et al. The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. *Int J Sports Med*, v. 19, n. 8, p. 547-52, Nov 1998.

<https://doi.org/10.1055/s-2007-971958>

Bloomer, R. J. et al. Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *Int J Sports Med*, v. 28, n. 1, p. 21-5, Jan 2007.

<https://doi.org/10.1055/s-2006-924140>

Bloomer, R. J.; Goldfarb, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol*, v. 29, n. 3, p. 245-63, Jun 2004.

<https://doi.org/10.1139/h04-017>

Bloomer, R. J. et al. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*, v. 19, n. 2, p. 276-85, May 2005.

Bocanegra, O. L. et al. Determination of the lactate threshold by means of salivary biomarkers: chromogranin A as novel marker of exercise intensity. *Eur J Appl Physiol*, v. 112, n. 9, p. 3195-203, Sep 2012.

<https://doi.org/10.1007/s00421-011-2294-4>

Bogdanis, G. C. et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans.

Food Chem Toxicol, v. 61, p. 171-7, Nov 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.046>

Borg, G. A. Perceived exertion. Exerc Sport Sci Rev, v. 2, p. 131-53, 1974.
<https://doi.org/10.1249/00003677-197400020-00006>

Bortolini, M. J. et al. Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. Res Q Exerc Sport, v. 80, n. 3, p. 604-10, Sep 2009.
<https://doi.org/10.1080/02701367.2009.10599599>

Bradford, M. M. 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, May 07 1976.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Bray, R. C. et al. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. Biochemical Journal, v. 139, n. 1, p. 43-48, 1974.
<https://doi.org/10.1042/bj1390043>

Browne, R. W.; Armstrong, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. Methods Mol Biol, v. 108, p. 347-52, 1998.

Bryan, N. S. The potential use of salivary nitrite as a marker of NO status in humans. Nitric Oxide, v. 45, p. 4-6, Feb 15 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.12.011>

Calvo, F. et al. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. Can J Appl Physiol, v. 22, n. 6, p. 553-61, Dec 1997.
<https://doi.org/10.1139/h97-035>

Cavas, L.; Arpinar, P.; Yurdakoc, K. Possible interactions between antioxidant enzymes and free sialic acids in saliva: a preliminary study on elite judoists. Int J Sports Med, v. 26, n. 10, p. 832-5, Dec 2005.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-837465>

Cerqueira, N. F.; Yoshida, W. B. Óxido nítrico: revisão. Acta Cirurgica Brasileira, v. 17, p. 417-423, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>

Chatterton, R. T., jr. et al. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol*, v. 16, n. 4, p. 433-48, Jul 1996.
<https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.1996.tb00731.x>

Chevon, M.; Berenshtein, E.; Stadtman, E. R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*, v. 33 Suppl, p. S99-108, Nov 2000.

Chicharro, J. L. et al. Saliva composition and exercise. *Sports Med*, v. 26, n. 1, p. 17-27, Jul 1998.
<https://doi.org/10.2165/00007256-199826010-00002>

Child, R. B. et al. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc*, v. 30, n. 11, p. 1603-7, Nov 1998.
<https://doi.org/10.1097/00005768-199811000-00008>

Cipryan, L. il-6, Antioxidant Capacity and Muscle Damage Markers Following High-Intensity Interval Training Protocols. *J Hum Kinet*, v. 56, p. 139-148, Feb 2017.
<https://doi.org/10.1515/hukin-2017-0031>

Coffey, V. G.; Hawley, J. A. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med*, v. 37, n. 9, p. 737-63, 2007.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200737090-00001>

Combes, A. et al. Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle. *Physiol Rep*, v. 3, n. 9, Sep 2015.
<https://doi.org/10.14814/phy2.12462>

Damirchi, A.; Saati Zareei, A.; Sariri, R. Salivary antioxidants of male athletes after aerobic exercise and garlic supplementation on: A randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Oral Biol Craniofac Res*, v. 5, n. 3, p. 146-52, Sep-Dec 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.001>

De Oliveira, V. N. et al. Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test. *Int J Sports Med*, v. 31, n. 6, p. 377-81, Jun 2010.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1248332>

Deminice, R. et al. Blood and salivary oxidative stress biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. *Int J Sports Med*, v. 31, n. 9, p. 599-603, Sep 2010.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1255107>

_____. Oxidative stress biomarkers response to high intensity interval training and relation to performance in competitive swimmers. *J Sports Med Phys Fitness*, v. 50, n. 3, p. 356-62, Sep 2010.

Diaz, M. M. et al. Salivary nitric oxide and alpha-amylase as indexes of training intensity and load. *Int J Sports Med*, v. 34, n. 1, p. 8-13, Jan 2013.

Dringen, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, v. 62, n. 6, p. 649-71, Dec 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00060-X)

Egan, B.; Zierath, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, v. 17, n. 2, p. 162-84, Feb 05 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>

ESTRELA, A. L. et al. Volume Exercise in Older Athletes Influences Inflammatory and Redox Responses to Acute Exercise. *J Aging Phys Act*, p. 1-33, Feb 09 2017.
<https://doi.org/10.1123/japa.2016-0219>

Fedorova, M.; Bollineni, R. C.; Hoffmann, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev*, v. 33, n. 2, p. 79-97, Mar-Apr 2014.
<https://doi.org/10.1002/mas.21381>

Fernandes, C. G. et al. Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats. *Cell Mol Neurobiol*, v. 31, n. 5, p. 775-85, Jul 2011.
<https://doi.org/10.1007/s10571-011-9675-4>

Ferro, C. D. O. et al. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 37, p. 031-038, 2010.

Finaud, J.; Lac, G.; Filaire, E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, v. 36, n. 4, p. 327-58, 2006.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>

Finkler, M.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. The relationship between oxidative stress and exercise. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, v. 25, n. 1, p. 1-11, Feb 2014.
<https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0082>

Fisher-Wellman, K.; Bloomer, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*, v. 8, p. 1, Jan 13 2009.
<https://doi.org/10.1186/1476-5918-8-1>

Flora Filho, R.; Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, p. 265-271, 2000.
<https://doi.org/10.1590/S0104-42302000000300012>

Floyd, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 222, n. 3, p. 236-45, Dec 1999.
<https://doi.org/10.1046/j.1525-1373.1999.d01-140.x>

Fry, A. C. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports Med*, v. 34, n. 10, p. 663-79, 2004.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200434100-00004>

Galli, S. J.; Borregaard, N.; Wynn, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, v. 12, n. 11, p. 1035-44, Oct 19 2011.
<https://doi.org/10.1038/ni.2109>

Gibala, M. J. et al. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol*, v. 590, n. 5, p. 1077-84, Mar 2012.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224725>

Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, v. 40, n. 8, p. 959-75, Jun 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00019-3)

Goldstone, A. B.; Liochev, S. I.; Fridovich, I. Inactivation of copper, zinc superoxide dismutase by H₂O₂ : mechanism of protection. *Free Radic Biol Med*, v. 41, n. 12, p. 1860-3, Dec 15 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.015>

Gonzalez, D. et al. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. *Res Sports Med*, v. 16, n. 2, p. 128-37, 2008.
<https://doi.org/10.1080/15438620802103700>

Granger, D. A. et al. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. *Physiol Behav*, v. 92, n. 4, p. 583-90, Nov 23 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.004>

Green, H. J.; Hughson, R. L. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. *Med Sci Sports Exerc*, v. 17, n. 5, p. 621-4, Oct 1985.
<https://doi.org/10.1249/00005768-198510000-00017>

Groussard, C. et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol*, v. 89, n. 1, p. 14-20, Mar 2003.
<https://doi.org/10.1007/s00421-002-0767-1>

Gul, I. et al. Oxidative stress and antioxidant defense in plasma after repeated bouts of supramaximal exercise: the effect of coenzyme Q10. *J Sports Med Phys Fitness*, v. 51, n. 2, p. 305-12, Jun 2011.

Gupta, R. K. et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 15, n. 11, p. 4405-9, 2014.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4405>

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, Nov 2007.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, v. 57, n. 5 Suppl, p. 715S-724S; discussion 724S-725S, May 1993.

Hayes, L. D. et al. Exercise-induced responses in salivary testosterone, cortisol, and their ratios in men: a meta-analysis. *Sports Med*, v. 45, n. 5, p. 713-26, May 2015.

<https://doi.org/10.1007/s40279-015-0306-y>

Hessel, E. et al. Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running? *Clin Chim Acta*, v. 298, n. 1-2, p. 145-56, Aug 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(00\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(00)00295-3)

Holloszy, J. O.; Booth, F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol*, v. 38, p. 273-91, 1976.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.38.030176.001421>

Huber, P. C.; Almeida, W. P.; Fátima, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>

Ji, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*, v. 18, n. 6, p. 1079-86, Jun 1995.

[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00212-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00212-3)

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

<https://doi.org/10.1196/annals.1354.061>

Ji, L. L. et al. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann N Y Acad Sci*, v. 854, p. 102-17, Nov 20 1998.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09896.x>

Kabasakalis, A. et al. Effects of endurance and high-intensity swimming exercise on the redox status of adolescent male and female swimmers. *J Sports Sci*, v. 32, n. 8, p. 747-56, 2014.

<https://doi.org/10.1080/02640414.2013.850595>

Kimm, S. Y. et al. Self-perceived barriers to activity participation among sedentary adolescent girls. *Med Sci Sports Exerc*, v. 38, n. 3, p. 534-40, Mar 2006.

<https://doi.org/10.1249/01.mss.0000189316.71784.dc>

Kingwell, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *Faseb j*, v. 14, n. 12, p. 1685-96, Sep 2000.
<https://doi.org/10.1096/fj.99-0896rev>

Korsager Larsen, M.; Matchkov, V. V. Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. *Medicina (Kaunas)*, v. 52, n. 1, p. 19-27, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.medici.2016.01.005>

Koyama, K. et al. Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, v. 80, n. 1, p. 28-33, Jun 1999.
<https://doi.org/10.1007/s004210050554>

Kuru, O. et al. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur J Appl Physiol*, v. 87, n. 2, p. 134-40, Jun 2002.
<https://doi.org/10.1007/s00421-002-0602-8>

_____. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *European Journal of Applied Physiology*, v. 87, n. 2, p. 134-140, 2002/06/01 2002.

Laaksonen, D. E. et al. Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. *Redox Rep*, v. 4, n. 1-2, p. 53-9, 1999.
<https://doi.org/10.1179/135100099101534648>

Leaf, D. A. et al. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med Sci Sports Exerc*, v. 29, n. 8, p. 1036-9, Aug 1997.
<https://doi.org/10.1097/00005768-199708000-00008>

LEICHT, C. A. et al. Salivary alpha amylase not chromogranin A reflects sympathetic activity: exercise responses in elite male wheelchair athletes with or without cervical spinal cord injury. In: (Ed.). *Sports Med Open*. Cham, v.3, 2017.

Levine, R. L.; Stadtman, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol*, v. 36, n. 9, p. 1495-502, Sep 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00135-8)

Lew, H.; Pyke, S.; Quintanilha, A. Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett*, v. 185, n. 2, p. 262-6, Jun 17 1985.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80919-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80919-4)

Li, F. et al. The impact of intermittent exercise in a hypoxic environment on redox status and cardiac troponin release in the serum of well-trained marathon runners. *Eur J Appl Physiol*, v. 116, n. 10, p. 2045-51, Oct 2016.
<https://doi.org/10.1007/s00421-016-3460-5>

Li, T. L.; Gleeson, M. The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling and circadian variation on saliva flow rate, immunoglobulin A and alpha-amylase responses. *J Sports Sci*, v. 22, n. 11-12, p. 1015-24, Nov-Dec 2004.
<https://doi.org/10.1080/02640410410001716733>

Ligtenberg, A. J. et al. The effect of physical exercise on salivary secretion of MUC5B, amylase and lysozyme. *Arch Oral Biol*, v. 60, n. 11, p. 1639-44, Nov 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.07.012>

Liubaoerjijin, Y. et al. Effect of aerobic exercise intensity on glycemic control in type 2 diabetes: a meta-analysis of head-to-head randomized trials. *Acta Diabetol*, v. 53, n. 5, p. 769-81, Oct 2016.
<https://doi.org/10.1007/s00592-016-0870-0>

Lu, S. C. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, v. 1830, n. 5, p. 3143-53, May 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>

Lundberg, J. O.; Weitzberg, E.; Gladwin, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 7, n. 2, p. 156-67, Feb 2008.
<https://doi.org/10.1038/nrd2466>

Malamud, D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am*, v. 55, n. 1, p. 159-78, Jan 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>

Maxwell, S. R. et al. Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. *Free Radic Res Commun*, v.

19, n. 3, p. 191-202, 1993.
<https://doi.org/10.3109/10715769309111602>

Michailidis, Y. et al. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, v. 39, n. 7, p. 1107-13, Jul 2007.
<https://doi.org/10.1249/01.mss.0b013e318053e7ba>

Michiels, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, v. 17, n. 3, p. 235-48, Sep 1994.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5)

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.

Nielsen, S. et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e87308, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087308>

Ogura, S.; Shimosawa, T. Oxidative stress and organ damages. *Curr Hypertens Rep*, v. 16, n. 8, p. 452, Aug 2014.
<https://doi.org/10.1007/s11906-014-0452-x>

Ookhtens, M.; Kaplowitz, N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis*, v. 18, n. 4, p. 313-29, 1998.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-1007167>

Pacque, P. F. et al. The effect of an ultra-endurance running race on mucosal and humoral immune function. *J Sports Med Phys Fitness*, v. 47, n. 4, p. 496-501, Dec 2007.

Park, S. Y.; Kwak, Y. S. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *J Exerc Rehabil*, v. 12, n. 2, p. 113-7, Apr 2016.
<https://doi.org/10.12965/jer.1632598.299>

Parker, L. et al. Acute High-Intensity Interval Exercise-Induced Redox Signaling Is Associated with Enhanced Insulin Sensitivity in Obese Middle-Aged Men. *Front Physiol*, v. 7, p. 411, 2016.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00411>

_____. Acute High-Intensity Interval Exercise-Induced Redox Signaling Is Associated with Enhanced Insulin Sensitivity in Obese Middle-Aged Men. *Frontiers in Physiology*, v. 7, p. 411.

_____. Exercise-intensity dependent alterations in plasma redox status do not reflect skeletal muscle redox-sensitive protein signaling. *J Sci Med Sport*, Jul 01 2017.

Pisoschi, A. M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, v. 97, p. 55-74, Jun 05 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Powers, S. K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*, v. 95, n. 1, p. 1-9, Jan 2010. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.050526>

Quindry, J. C. et al. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, v. 35, n. 7, p. 1139-45, Jul 2003. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000074568.82597.0B>

Radak, Z. et al. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*, v. 7, p. 90-107, 2001.

Rahman, Z. A. et al. Effect of acute exercise on the levels of salivary cortisol, tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Oral Sci*, v. 52, n. 1, p. 133-6, Mar 2010. <https://doi.org/10.2334/josnusd.52.133>

Ramos, J. S. et al. The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med*, v. 45, n. 5, p. 679-92, May 2015. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0321-z>

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, v. 233, p. 357-63, 1994. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879.

Scannapieco, F. A.; Solomon, L.; Wadenya, R. O. Emergence in human dental plaque and host distribution of amylase-binding streptococci. *J Dent Res*, v. 73, n.

10, p. 1627-35, Oct 1994.
<https://doi.org/10.1177/00220345940730100701>

Schneider, C. D. et al. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol*, v. 30, n. 6, p. 723-34, Dec 2005.
<https://doi.org/10.1139/h05-151>

Seifi-Skishahr, F. et al. Physical Training Status Determines Oxidative Stress and Redox Changes in Response to an Acute Aerobic Exercise. *Biochem Res Int*, v. 2016, p. 3757623, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/3757623>

Sen, C. K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, n. 3, p. 368-70, Mar 2001.
<https://doi.org/10.1097/00005768-200103000-00005>

Sen, C. K.; Packer, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*, v. 72, n. 2 Suppl, p. 653s-69s, Aug 2000.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.653S>

Shi, M. et al. Effects of anaerobic exercise and aerobic exercise on biomarkers of oxidative stress. *Environ Health Prev Med*, v. 12, n. 5, p. 202-8, Sep 2007.
<https://doi.org/10.1265/ehpm.12.202>

Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, v. 82, n. 2, p. 291-5, Mar 1997.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>

Sjodin, B.; Hellsten Westing, Y.; Apple, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*, v. 10, n. 4, p. 236-54, Oct 1990.
<https://doi.org/10.2165/00007256-199010040-00003>

Starling, R. D. et al. Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. *Med Sci Sports Exerc*, v. 28, n. 9, p. 1193-8, Sep 1996.
<https://doi.org/10.1097/00005768-199609000-00017>

Stutts, W. C. Physical activity determinants in adults. Perceived benefits, barriers, and self efficacy. *Aaohn j*, v. 50, n. 11, p. 499-507, Nov 2002.
<https://doi.org/10.1177/216507990205001106>

Suzuki, Y. J.; Carini, M.; Butterfield, D. A. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal*, v. 12, n. 3, p. 323-5, Mar 2010.
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887>

Trost, S. G. et al. Correlates of adults' participation in physical activity: review and update. *Med Sci Sports Exerc*, v. 34, n. 12, p. 1996-2001, Dec 2002.
<https://doi.org/10.1097/00005768-200212000-00020>

Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, May 15 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>

Veskoukis, A. S. et al. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med*, v. 47, n. 10, p. 1371-4, Nov 15 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.014>

Vollaard, N. B.; Shearman, J. P.; Cooper, C. E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*, v. 35, n. 12, p. 1045-62, 2005.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200535120-00004>

Wadley, A. J. et al. Low volume-high intensity interval exercise elicits antioxidant and anti-inflammatory effects in humans. *J Sports Sci*, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2016.
<https://doi.org/10.1080/02640414.2015.1035666>

Walsh, N. P. et al. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci*, v. 17, n. 2, p. 129-34, Feb 1999.
<https://doi.org/10.1080/026404199366226>

Wiecek, M. et al. Changes in oxidative stress and acid-base balance in men and women following maximal-intensity physical exercise. *Physiol Res*, v. 64, n. 1, p. 93-102, 2015.

_____. Changes in Non-Enzymatic Antioxidants in the Blood Following Anaerobic Exercise in Men and Women. *PLoS One*, v. 10, n. 11, p. e0143499, 2015.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143499>

Williams, B. M.; Kraemer, R. R. Comparison of Cardiorespiratory and Metabolic Responses in Kettlebell High-Intensity Interval Training Versus Sprint Interval Cycling. *J Strength Cond Res*, v. 29, n. 12, p. 3317-25, Dec 2015. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001193>

Wong, D. T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc*, v. 137, n. 3, p. 313-21, Mar 2006. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0180>

Zambrano, J. C. et al. Aerobic exercise reduced oxidative stress in saliva of persons with Down syndrome. *Res Sports Med*, v. 17, n. 3, p. 195-203, 2009. <https://doi.org/10.1080/15438620903120843>

Ziemann, E. et al. Aerobic and anaerobic changes with high-intensity interval training in active college-aged men. *J Strength Cond Res*, v. 25, n. 4, p. 1104-12, Apr 2011. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d09ec9>

Zouhal, H. et al. Adrenal medulla responsiveness to the sympathetic nervous activity in sprinters and untrained subjects during a supramaximal exercise. *Int J Sports Med*, v. 19, n. 3, p. 172-6, Apr 1998. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971899>